Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Honorata Kubisiak-Rzepczyk

Analiza porównawcza składu jakościowego oraz lekowrażliwości grzybów drożdżopodobnych izolowanych z jamy ustnej użytkowników protez płytowych i aparatów ortodontycznych

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Zygmunt Adamski

POZNAŃ, 2014

Mojemu Promotorowi
Panu Profesorowi Zygmuntowi Adamskiemu
z podziękowaniem za opiekę, życzliwość
oraz nieskończoną cierpliwość i wyrozumiałość

Moim Rodzicom
za to, że zawsze we mnie wierzyli
i wspierali w życiowych i zawodowych wyborach

Karolowi, Szymonowi i Antkowi
za „anielską" cierpliwość i pozytywną motywację

Pamięci mojego Taty
dr Zygmunta Kubisiaka

Spis treści

Spis rycin **IV**

Spis tabel **V**

Nazwy skrócone **VI**

1. Wstęp **1**
1.1. Anatomia i fizjologia jamy ustnej 1
1.1.1. Budowa błony śluzowej jamy ustnej 2
1.1.2. Funkcja błony śluzowej jamy ustnej 4
1.2. Gruczoły jamy ustnej 4
1.2.1. Funkcja gruczołów jamy ustnej — wydzielanie śliny 5
1.3. Ślina 6
1.3.1. Skład śliny 6
1.3.2. Funkcja śliny 7
1.4. Mikroflora jamy ustnej 8
1.5. Grzyby z rodzaju *Candida* 10
1.6. Zakażenie grzybami drożdżopodobnymi 12
1.6.1. Kolonizacja grzybami drożdżopodobnymi a kandydoza . . . 12
1.6.2. Mechanizmy obronne gospodarza 13
1.6.3. Czynniki predysponujące do zakażenia grzybiczego 15
1.6.4. Enzymy 17
1.6.5. Zakażenie grzybami *Candida* 18
1.6.6. Cechy patogenności *Candida* 19
1.6.7. Potencjalny wpływ *Candida* na zmiany strukturalne tkanek gospodarza 22
1.6.8. Tworzenie biofilmu *Candida* na powierzchni materiałów . . . 22
1.7. Wpływ przewlekle obecnych ciał obcych na błonę śluzową jamy ustnej 25
1.7.1. Stomatopatia protetyczna 26
1.7.1.1. Klasyfikacja stomatopatii protetycznych 28

2. Cel pracy **30**

3. Materiał i metody **32**
3.1. Charakterystyka badanej populacji 32
3.1.1. Grupa badana użytkowników ruchomych uzupełnień protetycznych z obecnością zmian zapalnych w obrębie jamy ustnej 33

3.1.1.1. Kryteria włączenia 33
3.1.1.2. Kryteria wyłączenia 34
3.1.2. Grupa badana użytkowników ruchomych uzupełnień protetycznych bez obecności zmian zapalnych w obrębie jamy ustnej 34
3.1.2.1. Kryteria włączenia 35
3.1.2.2. Kryteria wyłączenia 35
3.1.3. Grupa kontrolna dorosłych osób zdrowych 35
3.1.3.1. Kryteria włączenia 36
3.1.4. Grupa badana dzieci leczonych ortodontycznie z obecnością zmian zapalnych w jamie ustnej 36
3.1.4.1. Kryteria włączenia 37
3.1.4.2. Kryteria wyłączenia 37
3.1.5. Grupa badana dzieci leczonych ortodontycznie bez zmian zapalnych w jamie ustnej 38
3.1.5.1. Kryteria włączenia 38
3.1.5.2. Kryteria wyłączenia 38
3.1.6. Grupa kontrolna dzieci zdrowych 39
3.1.6.1. Kryteria włączenia 39
3.2. Zgoda na badanie 40
3.3. Zakres badań 40
3.3.1. Badanie kliniczne 40
3.3.2. Pobieranie materiału 41
3.3.3. Badanie mikologiczne 41
3.3.4. Ocena aktywności enzymatycznej za pomocą testu API ZYM firmy bioMérieux 43
3.3.5. Ocena biotypu *C. albicans* na podstawie aktywności enzymatycznej 44
3.3.6. Oznaczanie lekowrażliwości *in vitro* grzybów z rodzaju *Candida* 45
3.3.7. Analiza statystyczna 46

4. Wyniki **47**
4.1. Charakterystyka badanej grupy 47
4.1.1. Opis liczebności i demografia pacjentów 47
4.1.2. Weryfikacja dopasowania grup kontrolnych pod względem płci i wieku 48
4.2. Określenie grup o zwiększonym odsetku pozytywnych hodowli . . . 49
4.2.1. Pozytywne hodowle w grupach badanych i kontrolnych . . . 50
4.2.2. Porównanie obecności pozytywnych hodowli w grupach z zapaleniami jamy ustnej lub ich brakiem 51
4.3. Częstość występowania w hodowli poszczególnych gatunków grzybów drożdżopodobnych 52
4.3.1. Występowanie *C. albicans* 53
4.4. Zakażenia wielowalentne 53
4.5. Analiza oporności grzybów na leki przeciwgrzybicze 54
4.5.1. Lekowrażliwość grzybów drożdżopodobnych 54
4.5.2. Charakterystyka skuteczności poszczególnych leków przeciwgrzybiczych 55
4.5.2.1. Lekowrażliwość *C. albicans* 57

4.5.2.2. Lekowrażliwość *C. glabrata* 58
4.5.2.3. Lekowrażliwość *C. tropicalis* 59
4.5.2.4. Lekowrażliwość *C. inconspicua* 60
4.5.2.5. Lekowrażliwość *C. krusei* 61
4.5.2.6. Lekowrażliwość *C. parapsilosis* 62
4.6. Analiza aktywności enzymatycznej grzybów drożdżopodobnych . . . 62
4.6.1. Różnice w aktywności enzymów *C. albicans* między grupą dzieci i dorosłych pacjentów 66
4.6.2. Różnice w aktywności enzymów *C. albicans* u dzieci stosujących aparaty ortodontyczne i ze zmianami zapalnymi w jamie ustnej a dziećmi bez zmian zapalnych 66
4.6.3. Różnice w aktywności enzymów *C. albicans* u dzieci stosujących aparaty ortodontyczne i ich grupy kontrolnej 66
4.6.4. Różnice aktywności enzymów *C. albicans* między pacjentami stosującymi i nie stosującymi protez płytowych 67
4.6.5. Różnice w aktywności enzymów *C. albicans* między pacjentami stosującymi protezy i ze zmianami zapalnymi w jamie ustnej a grupą bez zmian 67
4.7. Częstość występowania biotypów *C. albicans* w grupach badanych . 69
4.7.1. Występowanie biotypów *C. albicans* w całej populacji badanej 70

5. Dyskusja **72**

6. Wnioski **79**

Streszczenie **81**

Bibliografia **84**

Spis rycin

1.1. Obraz mikroskopowy preparatu *C. albicans* w powiększeniu 200 razy. 11
1.2. Jama ustna pacjenta małoletniego zaopatrzonego w szczękowy aparat ortodontyczny 26
1.3. Stomatopatia protetyczna I°. 28
1.4. Stomatopatia protetyczna III°. 29
1.5. Stomatopatia protetyczna związana z zakażeniem *Candida spp.* . . . 29

3.1. Wzrost kolonii *C. albicans* na podłożu Sabouraud dextrose agar z chloramfenikolem 42
3.2. Wzrost kolonii *C. parapsilosis* na podłożu Sabouraud dextrose agar z chloramfenikolem 43
3.3. Oznaczenie lekooporności grzybów drożdżopodobnych metodą Fungitest (*Bio-Rad*) 46

4.1. Wiek dzieci grup badanych, leczonych ortodontycznie i grupy kontrolnej 48
4.2. Wrażliwość wszystkich szczepów na leki przeciwgrzybicze 56
4.3. Wrażliwość na leki przeciwgrzybicze *C. albicans* 57
4.4. Wrażliwość na leki przeciwgrzybicze *C. glabrata* 58
4.5. Wrażliwość na leki przeciwgrzybicze *C. tropicalis* 59
4.6. Wrażliwość na leki przeciwgrzybicze *C. inconspicua* 60
4.7. Wrażliwość na leki przeciwgrzybicze *C. krusei* 61
4.8. Wrażliwość na leki przeciwgrzybicze *C. parapsilosis* 62
4.9. Aktywność enzymatyczna hydrolaz szczepów *C. albicans* 63
4.10. Aktywność enzymatyczna hydrolaz szczepów *C. glabrata* 63
4.11. Aktywność enzymatyczna hydrolaz szczepów *C. tropicalis* 64
4.12. Aktywność enzymatyczna hydrolaz szczepów *C. krusei* 64
4.13. Aktywność enzymatyczna hydrolaz szczepów *C. inconspicua* 65
4.14. Aktywność enzymatyczna hydrolaz szczepów *C. parapsilosis* 65

Spis tabel

1. Czynniki predysponujące do zakażenia grzybiczego wg. Oddsa . . . 16

2. Opis grup utworzonych w badaniu 40
3. Oceniane enzymy hydrolityczne i ich substraty. 45

4. Charakterystyka wieku w poszczególnych grupach badanych 47
5. Charakterystyka wieku w grupie mężczyzn i kobiet 48
6. Istotność statystyczna w poszczególnych hipotezach dla pozytywnych i negatywnych hodowli w zależności od miejsca pobrania materiału 49
7. Relatywne częstości występowania pozytywnych hodowli mikologicznych u pacjentów określonych grup z uwzględnieniem miejsca pobrania materiału. 50
8. Częstość występowania pozytywnych hodowli próbek pobranych z ciała obcego w zależności od obecności zmian zapalnych w jamie ustnej pacjenta 51
9. Częstość występowania w hodowli wielu szczepów grzybów chorobotwórczych izolowanych od pacjenta w zależności od obecności zmian zapalnych w jamie ustnej pacjenta. 52
10. Liczba rozpoznanych gatunków grzybów w hodowli mikologicznej u wszystkich pacjentów objętych badaniem. 52
11. Opis stosowanych skrótów nazw leków w rycinach 4.3–4.8. 55
12. Prawdopodobieństwo testowe dla testu U Manna-Whitneya obrazujące istotne różnice w aktywności enzymów *C. albicans* w poszczególnych grupach badanych 69
13. Liczba rozpoznanych biotypów *C. albicans* w grupach badanych . . 71

Nazwy skrócone

HLA	Ludzkie Antygeny Leukocytarne, (*ang.* **H**uman **L**eukocyte **A**antigens)
HSP	Białka Szoku Cieplnego, (*ang.* **H**eat **S**hock **P**rotein)
EPS	(*ang.* **E**xtracellular **P**olimeric **S**ubstance)
SD	Odchylenie Standardowe, (*ang.* **S**tandard **D**eviation)
YNB	(*ang.* **Y**east **N**itrogen **B**ase)
BPZ	grupa **B**adana stosująca **P**rotezy, z **Z**apaleniem jamy ustnej
BP	grupa **B**adana stosująca **P**rotezy
KP	grupa **K**ontrolna dla pacjentów stosujących **P**rotezy płytowe
BAZ	grupa **B**adana stosująca **A**paraty ortodontyczne, z **Z**apaleniem jamy ustnej
BA	grupa **B**adana stosująca **A**paraty ortodontyczne
KA	grupa **K**ontrolna dla pacjentów stosujących **A**paraty ortodontyczne

Rozdział 1

Wstęp

Użytkowanie dentystycznych protez ruchomych jest głównym czynnikiem miejscowym sprzyjającym powstawaniu zakażeń grzybiczych błony śluzowej jamy ustnej [1]. Grzyby drożdżopodobne izoluje się od 50–100% pacjentów ze zmianami podłoża protetycznego [2]. Różnice w częstości występowania mogą być związane z miejscem pobrania materiału oraz zastosowaną metodą badań mikologicznych. Niepodważalny jest natomiast fakt występowania w jamie ustnej grzybów z rodzaju *Candida*, a w szczególności gatunku *C. albicans*. Zaleganie resztek pokarmowych spowodowane niedostateczną higieną jamy ustnej oraz protezy/aparatu może doprowadzić do namnażania się grzybów i bakterii w obrębie płytki protezy i aparatu tworząc biofilm [3].

Osoby użytkujące ruchome uzupełnienia protetyczne czy aparaty ortodontyczne powinny być świadome konieczności zgłaszania się na badania kontrolne dla wczesnej oceny stanu błony śluzowej jamy ustnej, wczesnego podjęcia leczenia i ewentualnej profilaktyki przeciwgrzybiczej [4].

1.1 Anatomia i fizjologia jamy ustnej

Granice jamy ustnej tworzą: wargi, policzki, podniebienie, język i okolica podjęzykowa. Dziąsłami nazywana jest błona śluzowa przylegająca do wyrostków

zębodołowych szczęki i do części zębodołowej żuchwy [5].

1.1.1 Budowa błony śluzowej jamy ustnej

Błona śluzowa jamy ustnej wysłana jest nabłonkiem wielowarstwowym płaskim podobnym do nabłonka pokrywającego skórę [6]. U człowieka, w przeciwieństwie do zwierząt, nabłonek ten nie ulega zrogowaceniu. Komórki nabłonka wielowarstwowego płaskiego złuszczają się zawsze w dużych ilościach i zawsze występują w ślinie [7]. W komórkach warstwy środkowej i powierzchownej nabłonka znajduje się glikogen co może mieć znaczenie w etiopatogenezie zakażeń grzybami drożdżopodobnymi [8].

Wewnętrzna strona czerwieni wargowej zawiera wiele wysokich brodawek. Błona śluzowa podniebienia miękkiego posiada nabłonek wielowarstwowy płaski, wysokie brodawki i gruczoły typu śluzowego. Ten sam rodzaj błony pokrywa także tylny brzeg podniebienia miękkiego i ciągnie się w kierunku powierzchni nosowej. Na tej powierzchni w różnych odległościach od brzegu tylnego, nabłonek wielowarstwowy zastąpiony jest przez nabłonek wielorzędowy urzęsiony spoczywający na grubej błonie podstawnej. Język pokryty jest przez mocno przylegającą błonę śluzową. Dolna powierzchnia języka jest gładka, a powierzchnia grzbietowa szorstka. W przedniej części języka występuje mnóstwo małych wyniosłości zwanych brodawkami. Wyróżnia się trzy rodzaje brodawek: nitkowate, grzybowate i okolone. Na bocznej powierzchni znajdują się parzyste brodawki liściaste. W jamie ustnej znajdują się liczne ujścia gruczołów ślinowych. Gruczoły języka dzieli się ze względu na umiejscowienie, według schematu [9]:

1. gruczoły, których ujścia znajdują się w przedsionku jamy ustnej (ślinianka przyuszna, gruczoły policzkowe),
2. gruczoły, których ujścia znajdują się na dnie jamy ustnej pomiędzy językiem a żuchwą (ślinianki podżuchwowa, podjęzykowa większa i mniejsza),
3. gruczoły języka (gruczoł językowy przedni i tylny),

4. gruczoły podniebienne.

Wyróżnia się trzy typy błony śluzowej pokrywającej jamę ustną [10]:

1. ruchoma, wyścielająca — wyściela ona policzki, wargi, dno przedsionka, dolną powierzchnię języka, dno jamy ustnej i podniebienie miękkie, pokryta nierogowaciejącym nabłonkiem, przez który przeświecają naczynia krwionośne,
2. żująca — pokrywa dziąsło i podniebienie twarde, pokryta nabłonkiem rogowaciejącym, narażona na ucisk,
3. specjalną — wyściela grzbiet języka i czerwień wargi, pokryta nabłonkiem częściowo zrogowaciałym, cienkim, prześwietlającym.

Błona śluzowa jamy ustnej składa się z:

- nabłonka,
- błony śluzowej właściwej (blaszki właściwej),
- błony podśluzowej.

Nabłonek składa się najczęściej z trzech warstw: podstawnej, kolczystej i płaskiej — rogowej, niekiedy występuje warstwa czwarta: ziarnista.

Błona śluzowa właściwa jest zbitą tkanką łączną zawierającą elementy włókniste (pęczki włókien klejodajnych i nieliczne włókna elastyczne) i komórkowe (fibroblasty, fibrocyty, limfocyty, komórki plazmatyczne) [11].

Błona podśluzowa jest luźną tkanką łączną zawierającą gruczoły surowiczo-śluzowe, sploty naczyń krwionośnych, chłonnych oraz tkankę tłuszczową [12].

1.1.2 Funkcja błony śluzowej jamy ustnej

W warunkach fizjologicznych błona śluzowa jamy ustnej jest wilgotna, gładka i lśniąca. Spełnia szereg ważnych czynności [12]:

- czynność osłaniającą — nieuszkodzony nabłonek wielowarstwowy płaski pokrywający jamę ustną jest praktycznie nieprzepuszczalny dla drobnoustrojów;
- czynność obronną — obecność włókien klejodajnych i sprężystych w błonie śluzowej chroni jamę ustną przed urazami mechanicznymi. Poza nieuszkodzoną błoną śluzową, czynność obronną spełnia ślina. Prawidłowa jej ilość powoduje spłukanie drobnoustrojów z powierzchni błony śluzowej;
- czynność wchłaniania — przez błonę śluzową wchłaniane są niektóre związki chemiczne, głównie rozpuszczalne w tłuszczach oraz alkohol, nikotyna, nitrogliceryna i inne;
- czynność smakową — bodźce smakowe są odbierane przez kubki smakowe, rozmieszczone w brodawkach okolonych, grzybowatych i liściastych języka, w błonie śluzowej podniebienia;
- czynność wydzielniczą — w całej powierzchni błony śluzowej jamy ustnej rozmieszczone są drobne gruczoły ślinowe, które ją zwilżają, zabezpieczając przed wysychaniem i urazami.

1.2 Gruczoły jamy ustnej

Dużymi gruczołami ślinowymi są:

- ślinianka przyuszna
- ślinianka podżuchwowa
- ślinianka podjęzykowa.

Ślinianka składa się głównie z pęcherzyków gruczołowych, połączonych rozgałęzionym układem cewek tworzących drogi wprowadzające ślinę do jamy ustnej [13]. Pęcherzyki gruczołowe z układem cewek tworzą końcowy odcinek wydzielniczy, będący jednostką czynnościową gruczołów ślinowych, zwaną salivonem. Salivon wytwarza wydzielinę pierwotną, której skład zmienia się podczas przepływu przez układ cewek. W cewkach tworzy się ślina ostateczna, wydalana do jamy ustnej [14].

1.2.1 Funkcja gruczołów jamy ustnej — wydzielanie śliny

Wydzielanie śliny odbywa się ustawicznie i jest wynikiem pobudzania układu nerwowego. Gruczoły ślinowe są unerwione czuciowo przez nerw uszno-skroniowy, współczulnie przez zwój szyjny zewnętrzny i przywspółczulnie przez nerw językowo-gardłowy i nerw twarzowy, które poprzez, neuromediatory wywołują reakcję wydzielniczą. Na podkreślenie zasługuje fakt niewspółmiernie dużej objętości wydzielanej śliny w stosunku do masy tkanki gruczołowej (ślinianka przyuszna waży 20–30 gramów, podjęzykowa 3–5 gramów, podżuchwowa 100–150 gramów [5].

Wydzielanie podstawowe tzw. śliny spoczynkowej (niestymulowanej) wynosi średnio 0,33–0,55 ml/min i waha się znacznie u poszczególnych osób, nawet w warunkach fizjologicznych. Na ten proces mają wpływ zmysły powonienia, smaku i wzroku [15]. Po silnym pobudzeniu, np. pod wpływem bodźca pokarmowego, wydzielanie śliny tzw. stymulowanej może wzrosnąć do 1,5–2,3 ml/min., a po działaniu środków farmakologicznych, np. pilokarpiny lub metacholiny osiąga wartość nawet 5,0 ml/min. Pewien efekt wydzielniczy można zaobserwować po zastosowaniu niektórych polipeptydów, jak substancja P, bradykinina, czy prostaglandyny. Dobowa objętość wydzielanej śliny wynosi przeciętnie 1–2 litry i zależy między innymi od częstości i rodzajów posiłków, działania bodźców emocjonalnych oraz długości trwania odpoczynku, snu, wieku i płci [16]. Wydzielanie śliny stosunkowo niewielkie u noworodków wzrasta między 3 a 5 rokiem życia i osiąga szczyt przed końcem 10 roku życia. Po 30 roku życia wydzielanie śliny maleje.

Nieco większe wydzielanie śliny obserwuje się u mężczyzn niż u kobiet, z zaznaczoną większą zawartością w niej sodu, wapnia i fosforu. Tłumaczyć ten fakt mogą różne stężenia niektórych hormonów u mężczyzn i kobiet [17].

1.3 Ślina

Ślina (salina) jest wydzieliną trawienną wytwarzaną przez trzy pary gruczołów ślinowych, zwanych śliniankami oraz przez liczne mniejsze gruczoły rozsiane w błonie śluzowej.

Ślina jest substancją, która w warunkach naturalnych chroni przed próchnicą. Ślina zdrowego człowieka ma odczyn słabo kwaśny a jej pH wynosi 5,75–7,05 [18]. Składa się w 99% z wody, a pozostały 1% to związki organiczne (głównie białka włącznie z glikoproteinami) oraz elektrolity (sód, chlorek, dwuwęglany, wapń i fosforany).

1.3.1 Skład śliny

Woda stanowi 99% śliny, resztę natomiast stanowią składniki nieorganiczne i organiczne [18]. Do składników organicznych zaliczamy:

- białka egzo- i endogenne,
- niebiałkowe substancje azotowe (mocznik, kwas moczowy, azotyny, rodanki, aminokwasy, kreatynina),
- węglowodany (glukozę, fruktozę, galaktozę, galaktozaminę),
- lipidy, (wolne kwasy tłuszczowe, cholesterol, lecytynę i fosfolipidy),
- hormony (kortykosteroidy, estrogeny, progesteron, testosteron),
- witaminy.

Gruczoły ślinowe produkują wiele enzymów. Najważniejszym jest amylaza [19]. Wymienić należy również inne, jak: renina, kalikreina, peroksydazy, transaminazy, galaktopeptydazy, lizozym, dehydrogenazy, anhydrazę węglanową i peptydazę. Z kolei spośród białek egzogennych należy wymienić: albuminy, transferyny, betalipoproteiny, ceruloplazminę, orozomukoid, beta-makroglobuliny i gammaglobuliny (IgA, IgM, IgG) [20].

Zawartość składników nieorganicznych w ślinie jest stała. Występują one w postaci jonowej. Są to kationy: sodowy (Na^+, potasowy (K^+), wapniowy (Ca^+), magnezowy ($Mg2^+$) oraz aniony: chlorkowy (Cl^-), fluorkowy (F^-), jodowy (I^-), wodorowęglanowy (HCO_3^-) i fosforanowe ($PO_4^{3-}, H_2PO_4^-, HPO_4^{2-}$).

Osmolalność śliny jest zwykle niższa niż osocza i zależy od stopnia aktywności wydzielniczej. Ślina zebrana na czczo jest hipotoniczna, a przy maksymalnym wydzielaniu staje się izotoniczna w stosunku do osocza krwi [21].

Ze względu na skład chemiczny, ślinę dzieli się na: surowiczą, śluzową i mieszaną. Ślina surowicza jest wydzielana przez gruczoły ślinowe zawierające komórki surowicze. Ślina śluzowa wydzielana jest przez gruczoły ślinowe zawierające komórki śluzowe. Ślina mieszana jest mieszaniną śliny wydzielanej przez wszystkie gruczoły ślinowe jamy ustnej. Ślina zawiera oprócz wydzielin gruczołów ślinowych również resztki pokarmowe, złuszczony nabłonek, białe ciałka krwi i liczną florę bakteryjną [22].

1.3.2 Funkcja śliny

Ślina odgrywa trzy główne funkcje ochronne (przeciwpróchnicze) — woda rozpuszcza i wymywa cukry z zalegających resztek pokarmowych, dwuwęglany neutralizują i zabezpieczają przed kwasami z osadu nazębnego, a jony wapnia i fosforu przyczyniają się do remineralizacji wczesnych zmian próchniczych. Poza tym ślina ma wiele innych funkcji polegających na ułatwianiu trawienia czy zapewnieniu ochrony jamy ustnej przez utrzymywanie błony śluzowej w stanie wilgotnym [23]. Ślina nie jest niezbędna do życia, ale jej brak powoduje wiele konsekwencji [24].

Ślina pełni wiele ważnych funkcji w organizmie człowieka. Wydzielina śluzowa, zwłaszcza drobnych gruczołów, pokrywa cienką, galaretową warstwą zarówno błonę śluzową jamy ustnej jak i zęby, chroniąc je przed wysuszeniem oraz zranieniem w czasie żucia [25]. Ślina zwilża pokarm, umożliwia żucie, ułatwia uformowanie i przełknięcie kęsa pokarmowego oraz ułatwia odczuwanie smaku. Dzięki niej możliwe jest także mechaniczne oczyszczenie jamy ustnej z resztek pokarmowych, złuszczonych komórek nabłonka i bakterii. Ślina pomaga utrzymać jamę ustną w czystości [22].

Niezwykle ważna funkcja obronna śliny związana jest z zawartością w niej enzymów, takich jak: lizozym, laktoferryna i sialoperoksydaza, które ograniczają kolonizację bakterii na powierzchni błony śluzowej i zębach, a także glikoprotein, potrzebnych do agregacji bakterii oraz immunoglobulin, które ograniczają adhezję bakterii do błony śluzowej jamy ustnej, indukują aglutynację oraz hamują działanie enzymów odgrywających istotną rolę w metabolizmie bakterii [26]. Swoiste mechanizmy obronne wiążą się także z ilością przeciwciał oraz leukocytów [23].

Bardzo ważną funkcję buforową spełniają w ślinie układy: kwas węglowy – wodorowęglan i kwas fosforowy – fosforan, które utrzymują równowagę kwasowo-zasadową poprzez neutralizację kwasów organicznych zawartych w pokarmach oraz produkowanych przez bakterie próchnicotwórcze [27]. Poza tym ślina i zawarte w niej składniki mineralne biorą udział w tzw. dojrzewaniu szkliwa, hamowaniu demineralizacji [28]. Należy również wspomnieć o roli trawiennej śliny, pełnionej przez zawartą w niej amylazę (ptialinę), zapoczątkowującą rozkład wielocukrów [20].

1.4 Mikroflora jamy ustnej

Jama ustna stanowi niejednolite środowisko bytowania drobnoustrojów. Zarówno wargi, policzki, dziąsła, podniebienie, język jak i zęby tworzą unikalną niszę dla rozwoju mikroorganizmów. Każde z nich charakteryzuje odrębne zbiorowisko drobnoustrojów [29]. Twarde, niezłuszczające się powierzchnie tworzące zęby, wyspecjalizowane powierzchnie błony śluzowej (brodawkowaty grzbiet języka, zrogowaciała

powierzchnia podniebienia lub niezrogowaciały nabłonek wielowarstwowy), ślina i płyn dziąsłowy wyróżniają jamę ustną wśród innych części ciała.

Podobnie jak w innych siedliskach, również w jamie ustnej wyróżnia się mikroflorę przejściową i stałą (rezydentna, rodzima). Skład ilościowy i jakościowy mikroflory stałej i przejściowej może być zależny od wielu czynników pochodzenia egzogennego i endogennego. Czynniki wpływające na skład jakościowy i ilościowy mikroflory jamy ustnej [30]:

- Uwarunkowania genetyczne (płeć, rasa, HLA)
- Warunki środowiskowe i geograficzne (dieta, zbiorowiska ludzkie: szpitale, koszary, przedszkola, szkoły, żłobki; higiena jamy ustnej)
- Wiek (noworodki, dzieci, dorośli, ludzie starzy [31])
- Ciąża (wzrost progesteronu i estradiolu, odwapnienie zębów)
- Choroby zakaźne lub pasożytnicze
- Wydaliny i wydzieliny organizmu (ślina, śluz, złuszcznaie nabłonka, stężenie hormonów we krwi, lizozym itd.)
- Choroby nowotworowe i metaboliczne
- Antybiotykoterapia
- Chemioterapia i radioterapia nowotworów
- Defekty odpornościowe wrodzone lub/i nabyte (agammaglobulinemia, hipoglobulinemia, układu dopełniacza, immunosupresja, neutropenia i inne np.: białaczki, HIV)
- Protezy i implanty stomatologiczne
- Choroby zębów i przyzębia

1.5 Grzyby z rodzaju *Candida*

Grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Candida* są wszechobecne [32]. Dotychczas opisano ich ponad 200 gatunków. Niektóre gatunki stanowią część naszej naturalnej flory i jedynie niewielki procent tych gatunków grzybów drożdżopodobnych jest odpowiedzialnych za pojawienie się objawów chorobowych [33].

Są to grzyby jednokomórkowe, które rozmnażają się na drodze wegetatywnej wytwarzając przez pączkowanie zarodniki tzw. blastospory. Wiele gatunków charakteryzuje się zdolnością do tworzenia pseudostrzępek, czyli ułożonych łańcuszkowato zarodników, nieoddzielonych od komórki wegetatywnej [34]. Jedynie pojedyncze gatunki rodzaju *Candida* wytwarzają strzępki i grzybnię prawdziwą (mycelium) [35].

Większość gatunków rodzaju *Candida* ma zdolności fermentacyjne niektórych węglowodanów oraz wykorzystywania węgla z różnych związków. Cecha ta ma praktyczne zastosowanie w identyfikacji gatunkowej [36].

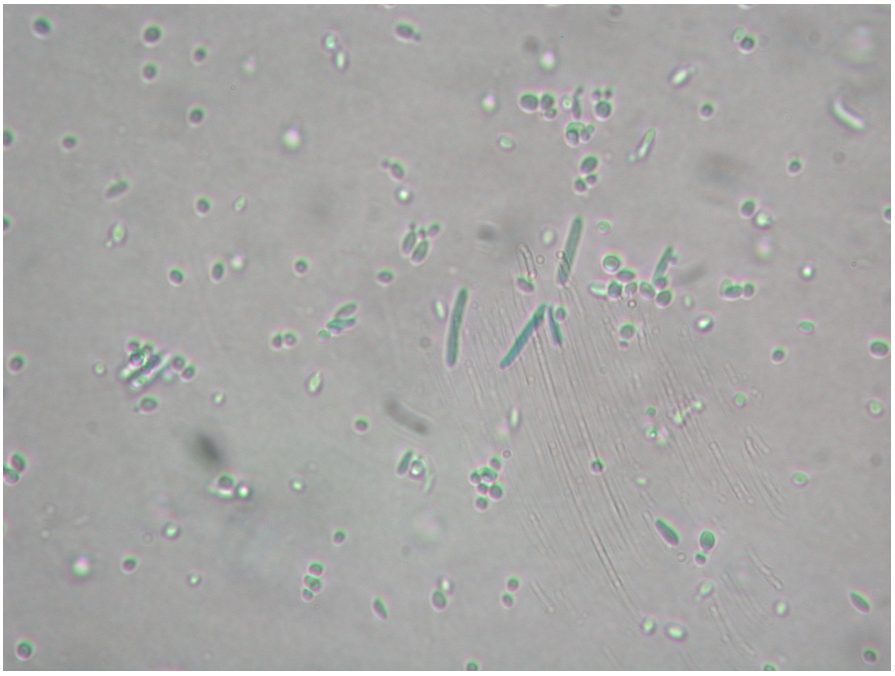
Najbardziej rozpowszechnionym gatunkiem jest *Candida* albicans [37]. Jest on częścią prawidłowej mikroflory przewodu pokarmowego. Kolonizuje również błonę śluzową pochwy. Ma też największe znaczenie w patogenezie chorób u ludzi. W latach osiemdziesiątych *C. albicans* stanowiła główny patogen układowych zakażeń grzybiczych — 75% zakażeń. W latach dziewięćdziesiątych częstość zakażeń wywołanych tym gatunkiem zdawała się mieć tendencję spadkową [37].

Cechy makroskopowe kolonii *C. albicans*:

- kremowe, o gładkiej powierzchni, nieznacznie wypukła ponad agar,
- w miarę starzenia powierzchnia ulega pofałdowaniu,
- maksymalna temperatura wzrostu: 43–46^{o}C,
- wzrost w hodowli stymulowany jest przez biotynę.

Obraz mikroskopowy:

- komórka pączkująca kulista, owalne lub cylindryczne, o wymiarach 2,5–7,2 x 2,9–14,4 µm,
- wytwarza blastospory średniej długości 2,6 µm oraz pseudostrzępki szerokości 3-4 µm,
- w pseudogrzybni niekiedy występują rakietowate twory oraz grubościenne chlamydospory,
- w mikrohodowli (germ tube test) można wykazać filamentację czyli kiełkowanie drożdżaka po inkubacji z surowicą w 37^{o}C.



Rycina 1.1: Obraz mikroskopowy preparatu *C. albicans* w powiększeniu 200 razy.

Właściwości biochemiczne:

- fermentuje glukozę, galaktozę i maltozę, a niektóre szczepy także sacharozę;
- asymiluje: glukozę, 2-keto-D-glukonian, D-ksylozę, adonitol, ksylitol, galaktozę, sorbitol, maltozę, sacharozę i trehalozę;
- w enzymogramie szczepów wzorcowych wykazano: fosfatazę zasadową, esterazę-C4, lipazę esterazową-C8, arylamidazę leucynową i walinową, fosfatazę kwaśną, fosfohydrolazę naftolową AS-B [38].

1.6 Zakażenie grzybami drożdżopodobnymi

C. albicans jest głównym gatunkiem wśród grzybów drożdżopodobnych zasiedlających jamę ustną. Kolonizacja jamy ustnej tym gatunkiem grzybów jest wynikiem powstawania sprzyjających warunków zależnych od właściwości komórek grzyba, komórek nabłonka błony śluzowej oraz czynników ogólnych i miejscowych sprzyjających namnażaniu się grzybów i ich właściwości chorobotwórczych [39].

1.6.1 Kolonizacja grzybami drożdżopodobnymi a kandydoza

C. albicans, patogen powszechnie występujący w populacji nie zawsze daje objawy zakażenia. Patogeneza zakażeń tym grzybem jest złożona i opiera się na interakcji pomiędzy mechanizmami zakażenia grzybów a procesami obronnymi żywiciela. Cannon *et al.* [40] wyróżniają następujące czynniki wspomagające zakażenie *C. albicans*:

1. skuteczność przylegania
2. awidność antygenów grzyba
3. tempo wzrostu.

Po wystąpieniu kolonizacji grzybami drożdżopodobnymi tylko u niektórych pacjentów obserwuje się cechy ostrej infekcji. Przemiana *Candida* z komensala w organizm patogenny związana jest nie tylko z czynnikami patogenności samego grzyba ale również (i być może w większej mierze) zależy od stanu pacjenta. Farah *et al.* [41] za czynniki mogące zwiększać prawdopodobieństwo wystąpienia objawów kandydozy uważają:

- stosowanie środków farmaceutycznych — antybiotyki o szerokim spektrum działania, leki immunomodulujące oraz leki mające działanie wysuszające błony śluzowe;

- nowotwory układu krwiotwórczego — zarówno same choroby jak i ich terapia stanowią poważny czynnik obciążający;
- braki w podstawowych makro i mikroelementach — braki witamin, żelaza i folianów mogą wpłynąć na integralność błon śluzowych umożliwiając penetrację grzybów w głąb tkanek;
- cukrzyca — wyższe poziomy glukozy obniżają pH w jamie ustnej, zmniejszają przepływ śliny i promują wzrost komórek grzybów;
- zaburzenia immunologiczne — zmniejszają możliwość obrony przed infekcją i eliminację patogenów;
- obniżenie przepływu śliny — kserostomia, nadmierne spożycie alkoholu, kawy obniżają zdolność do usuwania *Candida*.

Najczęściej do ujawnienia zakażenia dochodzi podczas upośledzenia mechanizmów obronnych pacjenta. Uważa się, że mechanizmy te pozostają w stanie zbalansowanym (co nazywamy kolonizacją) dopóki u gospodarza nie pojawią się kliniczne objawy zakażenia i możemy wtedy mówić o kandydozie [42].

1.6.2 Mechanizmy obronne gospodarza

Rozwój każdego zakażenia wywołanego przez grzyby drożdżopodobne zależy zarówno od patogenności szczepu zakażającego jak i od sił obronnych gospodarza. Osiedlanie się grzybów wywołuje szereg reakcji ze strony układu immunologicznego. W odpowiedzi na zakażenie uaktywniają się dwie linie obrony gospodarza: miejscowa i ogólna. Mechanizm „pierwszej linii" stanowi bariera lokalnych warunków środowiskowych we wrotach zakażenia [43]. W skład tej bariery wchodzą:

- ciągłość skóry i błon śluzowych,
- mechaniczne usuwanie grzybów poprzez złuszczanie nabłonka,
- wydzielanie śluzu, łez, czy odkrztuszanie plwociny.

Ponadto organizm gospodarza produkuje szereg substancji będących pomocnymi w walce z zakażeniem, takich jak lizozym, laktoferyna laktoperoksydaza, S-IgA, glikoproteiny śluzu oraz żelazo. Do innych mechanizmów obronnych pierwszej linii należą reakcje grzybów z innymi drobnoustrojami np. bakteriami, które hamują adherencję grzyba przez zajmowanie powierzchni receptorów nabłonka [44].

Gdy zawiedzie pierwsza lina obrony, zakażany organizm dysponuje mechanizmami obrony swoistej, w zakres której wchodzą odporność humoralna i komórkowa, oraz obrony nieswoistej. W nieswoistych mechanizmach obrony przeciwgrzybiczej biorą udział systemy fagocytarny i siateczkowo-śródbłonkowy jak również układ dopełniacza, a zwłaszcza jego składniki C3a i C5 [45].

Neutrofile odgrywają istotną rolę w procesie obronnym organizmu poprzez funkcję niszczenia grzybów drożdżopodobnych *Candida*, które odbywa się wewnątrzkomórkowo. Ważną rolę w tym procesie odgrywają związki uwalniane z ziarnistości granulocytów obojętnochłonnych. Do związków tych zaliczamy białka kationowe, mieloperoksydazę i lizozym, a także enzymy takie jak proteazy obojętne i hydrolazy kwaśne [46].

W swoistej odpowiedzi immunologicznej kluczową rolę odgrywa odporność komórkowa. Właśnie u osób z zaburzeniami funkcji limfocytów T rozwijają się najczęściej przewlekłe i nawracające zakażenia grzybicze [47]. To właśnie komórki T CD4+ stymulują uwalnianie cytokin — IL-2,IL-4, INF-γ i GM-CSF, które aktywują komórki żerne oraz indukują wytwarzanie swoistych przeciwciał.

Wyniki badań z ostatnich lat sugerują jednak, iż odpowiedź humoralna ma istotny wpływ na przebieg zakażenia grzybami drożdżopodobnymi *Candida*. Wiadomo bowiem, że przeciwciała wspomagają fagocytozę, hamują adherencję, a także aglutynują komórki grzybów. I tak przeciwciała klasy G biorą udział w mechanizmie cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał (ADCC) [48]. Przeciwciała klasy A natomiast wspomagają układ odpornościowy błon śluzowych poprzez udział w aglutynacji mikroorganizmów i zapobieganiu w ich przyleganiu do nabłonka [49]. Ponadto przeciwciała zapobiegają przekształceniu zakażenia drożdżakowego powierzchownego w kandydozę rozsianą lub układową [40].

1.6.3 Czynniki predysponujące do zakażenia grzybiczego

W przypadku zaistnienia sprzyjających warunków dochodzi do zachwiania równowagi między grzybem a gospodarzem, doprowadzając do rozwoju zakażenia. Czynniki predysponujące mogą być różnorakie, dotyczące zaburzeń w mechanizmach obronnych gospodarza lub środowiska w określonych okolicach ciała. Wszelkie niedobory immunologiczne, zarówno wrodzone jak i nabyte, obejmujące defekty neutrofilów, jak w przypadku ostrych białaczek, a także zaburzenia funkcji i liczby limfocytów T oraz komórek fagocytujących, sprzyjają grzybicom [40]. Paradoksalnie wiele spośród czynników predysponujących ma ścisły związek ze znacznym postępem i osiągnięciami medycyny. Powszechne stosowanie antybiotyków powoduje zaburzenie równowagi fizjologicznej flory bakteryjnej na błonach śluzowych jamy ustnej, przewodu pokarmowego i pochwy. Także wszelkiego rodzaju zabiegi chirurgiczne i diagnostyczne, które powodują przerwanie ciągłości skóry i błon śluzowych, odżywianie parenteralne oraz sama hospitalizacja, zwłaszcza długotrwała lub na oddziale intensywnej terapii sprzyjają zakażeniom grzybiczym. Nowoczesna terapia obejmująca radioterapię i chemioterapię, steroidoterapia, oraz wzrastająca populacja ludzi z immunosupresją w tym zakażonych wirusem HIV to najistotniejsze czynniki mające bezpośredni wpływ na obserwowany bardzo szybki wzrost zachorowań na rozmaitego typu grzybice, zwłaszcza endogenne. Już w 1979 roku Odds podzielił te czynniki na 6 podstawowych grup [50] (przedstawionych w tabeli 1).

Dwa podstawowe mechanizmy umożliwiające grzybom drożdżopodobnym inwazję w głąb tkanek to umiejętność przylegania do nabłonków oraz zdolność do produkcji enzymów. Ponadto, istotną rolę odgrywają także złożoność budowy ściany komórkowej grzybów, dimorfizm, mimikra antygenowa i zmienność fenotypowa, które pomagają drożdżakom *Candida* ominąć ludzkie mechanizmy obronne [51].

Dimorfizm to zdolność *C. albicans*, jako jedynego gatunku, do wzrostu w dwóch fazach [52]. W zależności od warunków środowiskowych i szczepu grzyb ten przyjmuje postać blastospory (faza drożdżowa) lub mycelium czyli strzępek prawdziwych (faza nitkowata). Dodatkowo *C. albicans* wytwarza pseudostrzępki, które

Tabela 1: Czynniki predysponujące do zakażenia grzybiczego wg. Oddsa

Czynniki immunologiczne:	niedobór neutrofilów we krwi obwodowej ostra białaczka deficyt limfocytów T fagocytów jednojądrzastych (AIDS) defekt układu siateczkowo-śródbłonkowego splenektomia, defekt wrodzony
Chemioterapia i radioterapia	leki immunosupresyjne cytostatyki antybiotyki kortykosteroidy
Przerwanie ciągłości tkanek	urazy skóry lub błony śluzowej miejscowa okluzja lub maceracja tkanek
Zabiegi chirurgiczne	wprowadzenie narzędzi do tkanek wprowadzenie protez do naczyń
Czynniki fizjologiczne	infekcje, choroby wyniszczające ciąża okres noworodkowy
Czynniki żywieniowe	dieta bogata w węglowodany niedobór witamin

są wydłużonymi formami komórek drożdżowych. Przez pewien czas panowało wśród badaczy wiele sprzecznych poglądów dotyczących zależnością pomiędzy fazami a patogennością. Obecnie uważa się, iż wczesne stadia infekcji są związane z formą blastospory, która jest oporna na działanie bójcze fagocytów [52].

Przyleganie czyli adherencja to wstępny etap poprzedzający kolonizację tkanek i narządów a w konsekwencji prowadzący do zakażenia [53]. Najsilniejszymi właściwościami adhezyjnymi charakteryzuje się *C. albicans*, która jednocześnie jest najbardziej patogennym gatunkiem [54]. Grzyby drożdżopodobne *Candida* mają zdolność przyczepiania się do różnych komórek gospodarza, w tym też do komórek nabłonka i fagocytów. Jednak do zjawiska przylegania grzyba może dojść tylko wtedy jeśli na powierzchni jego komórki są adhezyny, które odpowiadają receptorom gospodarza [53].

Budowa ściany grzyba ma duże znaczenia dla adherencji. Ściana komórkowa grzybów drożdżopodobnych *Candida* składa się z licznych wielocukrów, przy czym

przeważają polimery glukanu i mannanu z białkiem, natomiast w głębszych warstwach jest chityna. Większość badaczy sugeruje, iż adhezyną grzybów drożdżopodobnych *Candida* jest mannoproteina [55].

1.6.4 Enzymy

Dla grzybów chorobotwórczych bardzo istotną jest umiejętność produkcji enzymów, które rozkładają makrocząsteczki do prostych związków chemicznych. W organizmie gospodarza aktywność produkowanych enzymów kierowana jest przeciwko jego własnym tkankom, służąc nie tylko zdobyciu substancji odżywczych, ale również inwazji grzybów w głąb tkanek [56]. Grzyby patogenne (zarówno dermatofity, grzyby drożdżopodobne, jak i pleśnie) wydzielają enzymy hydrolityczne. Według nomenklatury *Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* z 1992 roku [57] wśród hydrolaz wyróżniamy:

- esterazy (hydrolizujące estry grupy karboksylowej — lipaza i fosfolipaza A, estry fosforowe — fosfataza kwaśna i alkaliczna oraz estry siarkowe — sulfataza),
- glukozydazy (glukozydaza, mannozydaza),
- peptydazy (aminopeptydazy, arylamidazy, proteinazy, elastazy),
- ureazy.

Najistotniejsze znaczenie dla chorobotwórczości *C. albicans* mają enzymy proteolityczne oraz fosfolipazy. Zdolność do produkcji określonych enzymów stała się podstawą do opracowania klasyfikacji biotypowych. Pierwszy tego dokonał w 1986 roku Williamson, wyróżniając osiem biotypów: od A do H [58]. Natomiast w Polsce Kurnatowska i Kurnatowski opisali dodatkowe biotypy: od I do N [59].

Najlepiej poznanymi enzymami są enzymy proteolityczne. Proteinazy hydrolizują wiązania peptydowe rozkładając białka do polipeptydów. Enzymy te odpowiedzialne są m.in. za degradację keratyn i kolagenu, przyczyniając się w ten sposób

do uszkodzenia komórek nabłonka. Wyróżniamy proteinazy: kwaśną i obojętną. Proteaza kwaśna (aspartylowa) występuje w formie 10 izoenzymów, kodowanych przez geny SAP-10 [60]. Wydzielanie kwaśnych proteinaz ma chronić *Candida* przed fagocytozą. Istnieje też korelacja między zdolnością grzybów drożdżopodobnych do przylegania a aktywnością enzymatyczną. Im większa aktywność proteinaz tym większa wirulencja dla człowieka i tym większa śmiertelność dla myszy lub zdolność do kolonizacji tkanek [61].

Aktywność fosfolipazy u grzybów drożdżopodobnych *C. albicans* została odkryta już w 1966. Obecnie zidentyfikowano 4 fosfolipazy: A, B, C i D, a także lizofosfolipazę [62]. Zadaniem tej grupy enzymów jest hydrolizowanie fosfolipidów, które są składnikami niemal wszystkich błon komórkowych. Produkcja fosfolipazy towarzyszy wzrostowi grzybów a także inwazji tkanek gospodarza i wywoływaniu zakażenia [63]. Zjawisko to jest potwierdzeniem roli tych enzymów jako determinant patogenności. Aktywność fosfolipazy różni się pomiędzy poszczególnymi szczepami [64].

1.6.5 Zakażenie grzybami *Candida*

Grzyby drożdżopodobne z rodziny *Cryptococcacae* stanowią częsty składnik ontocenozy jamy ustnej. U osób z wydolnym układem odpornościowym, pozostając w stanie czasowej równowagi biologicznej, nie wywołują zmian klinicznych [65]. Nie wyjaśniono jednoznacznie znaczenia grzybów z rodzaju *Candida* w ontocenozie jamy ustnej. Część autorów sądzi, że w zdrowej jamie ustnej bytują one na zasadzie komensalizmu i uznaje je za składnik mikroflory fizjologicznej, inni uważają je za patogeny będące punktem wyjścia do rozwoju grzybic narządowych, w tym także jamy ustnej [66–68]. Spośród patogenów izolowanych z jamy ustnej najliczniej występuje *C. albicans*. Mniej licznie reprezentowane są *C. tropicalis, C. glabrata, C. krusei, C. parapsilosis, C.gulliermondii, C. incospicua* [66].

Patogenne właściwości *C. albicans* ujawniają się przez zmienność morfologiczną i antygenową zdolność adhezji do nabłonka, produkcję enzymów hydrolitycznych

oraz działalność immunomodulacyjną [69]. Wciąż trudno rozstrzygnąć kiedy obecność *C. albicans* to jeszcze nosicielstwo, a kiedy już inwazja, oraz od którego momentu zastosować terapię przeciwgrzybiczą.

Użytkowanie protez ruchomych jest głównym czynnikiem miejscowym sprzyjającym powstawaniu zakażeń grzybiczych błony śluzowej jamy ustnej. Płyta protezy stwarza niefizjologiczne warunki w jamie ustnej, prowadzi do zaburzeń w metabolizmie tkankowym, ogranicza dostęp tlenu, utrudnia samooczyszczanie przez ślinę a wzrost temperatury i wilgotności sprzyja rozwojowi bakterii i grzybów. Wśród innych czynników wymienianych jako przyczyny zmian w obrębie jamy ustnej wyróżnić można czynniki miejscowe: złą higieną jamy ustnej, dysplazję nabłonka jamy ustnej oraz ogólne: choroby nowotworowe, nikotynizm, cukrzycę, immunosupresję, przewlekłą steroidoterapię i antybiotykoterapię oraz pierwotne i wtórne niedobory immunologiczne [70]. Różnorakość tych przyczyn powoduje, że kandydoza jest najczęściej obserwowaną patologią błony śluzowej jamy ustnej.

Odrębny problem stanowi kolonizacja błony śluzowej jamy ustnej. Zdolność adhezji grzybów do powierzchni błony śluzowej oraz do podłoża protetycznego jest podstawowym czynnikiem wywołującym infekcję grzybiczą [71]. Zakażenie grzybami z rodzaju *Candida* cechuje się różnorodnością objawów klinicznych i stwarza problemy terapeutyczne w związku z narastającą opornością na leki przeciwgrzybicze. Istnieje ciągła konieczność oceny częstości występowania infekcji wywołanych przez grzyby z rodzaju *Candida* w jamie ustnej oraz poznawania czynników etiologicznych tych zakażeń.

1.6.6 Cechy patogenności *Candida*

O rozwoju infekcji *Candida*, poza czynnikami ryzyka decydują również pewne cechy wirulencji pozwalające przetrwać grzybom w organizmie gospodarza.

Spośród tych cech, mających wpływ na patogenność *Candida* największy udział w wirulencji mają mieć przyleganie do nabłonków oraz produkcja enzymów proteolitycznych i hydrolitycznych. Inne determinanty patogenności takie jak mimikra

antygenowa i zmienność fenotypowa pomagają *Candida* uniknąć rozpoznania, jako obcych antygenów przez układu immunologiczny gospodarza. Poniżej przedstawiono podstawowe cechy patogenności *Candida*: zdolność do przylegania komórek grzyba do komórek nabłonka gospodarza, aktywność enzymatyczna grzyba, dimorfizm, złożoność budowy ściany komórkowej grzyba, mimikra molekularna i zdolność do zmienności fenotypowej.

- Przyleganie (adherencja) — komórki *Candida* mogą przyczepiać się do komórek gospodarza, w tym do komórek nabłonka i fagocytów. Przyleganie jest etapem wstępnym, poprzedzającym kolonizację tkanek i narządów, który jest niezbędny do rozwoju zakażenia, a głównymi czynnikami biorącymi udział w tym procesie są adhezyny [72].

- Aktywność enzymatyczna — związana jest ze zdolnością do wydzielania szeregu enzymów ułatwiających inwazję w głąb tkanek. *Candida* wydzielają znaczną liczbę enzymów, m.in. lipazę, fosfolipazy, fosfomannoesterazę, kwaśne proteinazy [69].

- Dimorfizm — komórki *Candida* występują w formie blastospor (w fazie drożdżopodobnej — forma Y) i w formie nitkowatej — strzępki (mycelium — forma M) [73]. Wczesne fazy infekcji są związane z formą drożdżopodobną Wytwarzając wypustki nitkowate, komórki grzyba mają zdolność mechanicznego przebicia się, ucieczki przed mechanizmami obrony organizmu oraz zajęcia innych tkanek przez co strzępki mają być bardziej inwazyjne niż komórki drożdżopodobne [52].

- Ściana komórkowa grzyba — zbudowana jest z wielocukrów chityny (polimer N-acetylo-D-glukozaminy), mannanu (polimer mannozy), glukanu (polimer glukozy) oraz białek i lipidów. Na powierzchni komórki *Candida* obecne są delikatne fibryle z glikoprotein [74]. Są one niezbędne w mechanizmie przylegania grzyba do komórek gospodarza. Otoczka śluzowa *Candida* bierze udział w penetracji w głąb tkanek. Uważana jest za najbardziej zewnętrzną warstwę komórki i zawiera polisacharydy oraz enzymy. Powierzchnia komórki grzyba odgrywa podstawową rolę w adherencji *Candida* do komórek

gospodarza, uczestniczy w rozmnażaniu i wpływa na system obronny gospodarza [75].

Proteinazy wydzielane przez *Candida* mają wspomagać proces adherencji do nabłonków gospodarza. Przyczyniają się do uszkodzenia komórek nabłonka przełamania pierwszej linii obrony gospodarza poprzez degradację keratyny kolagenu [56]. Wydzielanie natomiast kwaśnych proteaz ma chronić *Candida* przed fagocytozą przez komórki zapalne gospodarza [56].

Enzymy lipolityczne uważane są za istotny element zjadliwości *Candida*, szczególnie we wczesnym okresie zakażenia. Poprzez degradację lipidów stanowią cenne źródło węgla niezbędnego do wzrostu i namnażania grzyba w początkowym etapie infekcji [76].

Enzymy hydrolityczne są odpowiedzialne między innymi za katalizowanie hydrolizy wiązań C–O, C–N, C–C [77], co ma ułatwiać grzybom kolonizację. Poprzez chemiczne i fizyczne oddziaływanie na środowisko, hydrolazy zapewniają przetrwanie grzybom w tkankach i uczestniczą bezpośrednio w degradacji białek organizmu gospodarza [78].

- Mimikra molekularna — zjawisko polegające na wytwarzaniu przez *Candida* antygenów podobnych do antygenów gospodarza. Podobieństwo to chroni grzyb przed odpowiedzią immunologiczną organizmu gospodarza i rozpoznaniem antygenów grzyba jako obce. Ułatwia to przeżycie *Candida* [79].

- Zmienność fenotypowa — obejmuje możliwość występowania fenotypów w obrębie tego samego gatunku. Poszczególne fenotypy różnią się między sobą zdolnościami adhezyjnymi i produkcją endotoksyn i enzymów [80].

1.6.7 Potencjalny wpływ *Candida* na zmiany strukturalne tkanek gospodarza

Grzyby obecne w organizmie człowieka, również na błonach śluzowych mogą w różny sposób oddziaływać na organizm „gospodarza". Mogą wpływać immunosupresyjnie [81], alergizująco [82], a także pogarszać ogólny stan chorego nawet bez wywoływania objawów grzybicy. Sama obecność *Candida*, poprzez l3-glukan ściany komórkowej grzyba może modulować miejscową odpowiedź immunologiczną organizmu gospodarza.

Wydzielane przez *Candida* fosfolipazy mają uszkadzać komórki błon śluzowych gospodarza, przez co ułatwiają grzybom penetrację w głąb tkanek. Kwaśne proteinazy degradują komórki nabłonka oraz białka gospodarza takie jak kolagen, keratynę, mucynę, przeciwciała, białka komplementu oraz cytokiny [83].

1.6.8 Tworzenie biofilmu *Candida* na powierzchni materiałów

Biofilmem określa się złożone skupisko bakterii przylegających do powierzchni lub do siebie nawzajem. Bakterie osadzone są w macierzy (matrix) zbudowanej z substancji zewnątrzkomórkowych [66, 67]. W naturze większość bakterii żyje w bliskim połączeniu z powierzchniami, tworząc kompleks zwany błoną biologiczną, w której bakterie posiadają zupełnie inne właściwości niż ich odpowiednie formy planktoniczne [84]. Bakterie wolno występujące w środowisku wodnym, zwane mikroorganizmami planktonicznymi, są konieczne do formowania się biofilmów. Takie biofilmy mogą się tworzyć na jakiejkolwiek organicznej czy nieorganicznej powierzchni, w pobliżu której żyją mikroorganizmy planktoniczne w roztworze wodnym. Biofilm może być zbudowany z bakterii, grzybów, organizmów jednokomórkowych [85].

Badania biofilmu przeszły długą drogę. Wprowadzającą charakterystykę biofilmu zapoczątkował Antoni van Leeuwenhoek, który już w XVII w. badał płytkę

bakteryjną pokrywającą własne zęby. Nazwa biofilm powstała w oparciu o makroskopowe obserwacje tej struktury, wyglądającej jak cienka warstwa śluzu [86]. Ma on wyraźną architekturę składającą się z wieżo- i grzybokształtnych mikrokolonii zamkniętych w uwodnionej macierzy zbudowanej z zewnątrzkomórkowych substancji (polisacharydów i protein, które są produkowane przez mikroorganizmy znajdujące się w biofilmie) [87].

Pierwszym etapem powstania biofilmu jest przyleganie komórki bakteryjnej do powierzchni i zmniejszenie jej ruchliwości. Bakterie mogą przejściowo łączyć się ze sobą lub z powierzchnią stałą. Po wytworzeniu stałego połączenia z powierzchnią tworzą mikrokolonie poprzez podział oraz wytwarzają chemoatraktanty (związki organiczne lub nieorganiczne indukujące procesy chemotaksji dodatniej w komórkach posiadających zdolność do ruchu lub innej spolaryzowanej odpowiedzi na bodźce) i egzopolisacharydy [88]. Biofilm to kompleks z trójwymiarowymi strukturami złożonymi ze zgrupowań komórek bakterii, między którymi tworzą się kanały, a przez nie następuje wymiana substancji odżywczych i metabolitów bakteryjnych [87]. W tej strukturze międzykomórkowa komunikacja zachodzi przez substancje sygnałowe, które dyfundują z jednej komórki do drugiej [89].

Biofilm jest dynamicznym środowiskiem zorganizowanym optymalnie dla komórek w nim występujących [90]. Większa biomasa osiągana przez bakterie, które łączą się w grupy i kooperują przy rozkładzie cząstek używając uzupełniających się profili enzymów zewnątrzkomórkowych, powoduje to, że bakterie funkcjonujące razem są w stanie rozłożyć duże cząstki odżywcze, które nie mogłyby być rozłożone przez pojedynczą bakterię [90].

Drobnoustroje wchodzące w skład biofilmu wykazują różny poziom transkrypcji genów, a w zależności od fazy wzrostu wykazują zmienność fenotypową [91]. Strukturalna adaptacja i wewnętrzna zależność w biofilmie może być odpowiedzialna za ekspresję genów, które w rezultacie zmieniają całkowicie fenotyp od form tych bakterii występujących w postaci planktonicznej [90].

Pewne gatunki bakterii wykazują nową, większą wirulencję oraz zwiększoną odporność na czynniki antybakteryjne w porównaniu z ich formami planktonicznymi

[92]. Rozważane są różne mechanizmy, które mogą to powodować, m.in. macierz biofilmu może oddziaływać jak filtr zatrzymujący działanie czynników przeciwbakteryjnych. Inną teorią jest spowolniony wzrost bakterii w biofilmie. Ogólnie wiadomo, że czynniki antybakteryjne nie działają tak skutecznie na biofilm jak na formy planktoniczne bakterii [93]. Jednogatunkowe lub wielogatunkowe biofilmy zbudowane w jamie ustnej występują również w postaci planktonicznej oraz biofilmów. Najlepiej poznanym i zbadanym jest biofilm zapoczątkowujący powstanie płytki nazębnej [94]. W tym wypadku bakterie występujące w ślinie są głównym źródłem powstania tej specyficznej błony biologicznej.

Szczepy bakterii i mikroorganizmów bytujące w dynamicznym środowisku jamy ustnej to społeczność zwana biofilmem, powstająca pierwotnie na twardych powierzchniach tkanki takich jak szkliwo zęba. Formowanie się biofilmu możemy podzielić na kilka faz [95]. Pierwsza faza charakteryzuje się powstaniem błony na powierzchni zęba, zawierającej makromolekuły i zaczątki bakterii, wiele z nich służy jako receptory, do których przyczepiają się bakterie. Bakteria „osadnicza" bądź też wcześni „osadnicy" tacy jak paciorkowce przyczepiają się całym gronem do wytworzonej błony.

Kolejne fazy to rozrost kolonii bakterii i ich podział w wyniku czego produkują zewnątrzkomórkową strukturę przyciągającą kolejne bakterie. Podczas gdy kolonie bakterii rozrastają się i cała biomasa płytki nazębnej zwiększa się i dojrzewa, zwarta struktura biofilmu staje się znacznie trudniejsza do usunięcia. Aby uniknąć rozwoju biofilmu należy pamiętać o regularnej higienie jamy ustnej.

Biofilm jest wielokomórkowym tworem złożonym z drobnoustrojów. Komórki tworzące biofilm wytwarzają dość cienką polimeryczną macierz zawierającą polisacharydy, kwasy nukleinowe i białka. Macierz ma określoną strukturę i przylega do powierzchni struktur organicznych i nieorganicznych [96]. W takiej zwartej strukturze, otoczonej śluzem, istnieją warunki, w których komórki drobnoustrojów chronione są przed niekorzystnymi czynnikami zewnętrznymi [97]. Z punktu widzenia podłoża molekularnego za ochronę komórek przed skutkami wynikającymi z warunków stresowych odpowiada szereg białek z grupy sHSP (małych

białek szoku termicznego). Proteiny te usuwają zagregowane termicznie białka z komórek oraz chronią przed aktywnością enzymatyczną rekombinowanych białek produkowanych w komórkach bakteryjnych i tworzących ciała inkluzyjne. Takie mechanizmy obronne mikroorganizmów mają duży związek z opornością przed szkodliwym działaniem różnego typu preparatów antyseptycznych i dezynfekcyjnych. Dlatego też ważne jest dokładne poznanie wszelkich procesów i czynników na nie wpływających, które mają znaczenie w powstawaniu biofilmu.

Mikroorganizmy przylegają do powierzchni w wilgotnych środowiskach poprzez wydzielanie kleistej substancji. Miejscem adhezji np. bakterii mogą być różnego typu materiały — najczęściej o charakterze polimerów o dosyć nierównej powierzchni. U człowieka znakomitym przykładem w aspekcie medycznym są wszelkiego rodzaju cewniki czy też implanty chirurgiczne [98].

Struktura gatunkowa biofilmu nie tylko może być stworzona przez pojedynczy gatunek bakteryjny. Wszelkie komórki są ze sobą związane tzw. pozakomórkową substancją polimeryczną (EPS — Extracellurar Polymeric Substance). EPS nadaje nie tylko wyjątkową stabilność w przywiązaniu do podłoża, ale również oznacza się podobną właściwością do komórek budujących biofilm.

1.7 Wpływ przewlekle obecnych ciał obcych na błonę śluzową jamy ustnej

Błona śluzowa pod płytą aparatu/protezy często ulega przerostowi bądź zanikowi, a także rogowaceniu. Często dochodzi do powstawania nadżerek, odleżyn, aft oraz anemizacji błony śluzowej pola protetycznego [99].

Duże znaczenie ma traumatyzujące działanie samej protezy czy aparatu ortodontycznego na błonę śluzową pola protetycznego. Powierzchniowe, jak również głębokie uszkodzenia nabłonka pod płytą protezy lub aparatu mogą sprzyjać zaleganiu i rozrostowi grzybów drożdżopodobnych [100].

Sprzyjające infekcji grzybiczej błony śluzowej jamy ustnej działanie płyty protezy akrylowej zostało stwierdzone przez wielu autorów [101, 102]. Polega ono między innymi na braku możliwości samooczyszczania przez ślinę, podwyższonej temperaturze, wytwarzaniu pod powierzchnią płyty wąskiej przestrzeni o niskim pH, małym dostępie tlenu i nagromadzeniu złuszczonych komórek nabłonka [103]. Niewiele jest natomiast doniesień na temat wpływu użytkowania aparatów ortodontycznych na stan błony śluzowej jamy ustnej pacjentów oraz wpływu na rozwój infekcji grzybiczej w obrębie jamy ustnej.

Rycina 1.2: Jama ustna pacjenta małoletniego zaopatrzonego w szczękowy aparat ortodontyczny

1.7.1 Stomatopatia protetyczna

Stomatopatia protetyczna jest to zespół objawów patologicznych, zarówno obiektywnych, jak i subiektywnych, wywołanych głównie użytkowaniem ruchomych protez stomatologicznych całkowitych i częściowych, zwłaszcza wykonanych z tworzywa akrylowego. Najczęstszą formą reakcji tkanek podłoża na stosowane uzupełnienia protetyczne jest stan zapalny błony śluzowej pokrytej płytą protezy [104].

Mianem stomatopatii protetycznej określa się zmiany w błonie śluzowej jamy ustnej związane przyczynowo z użytkowaniem protez stomatologicznych najczęściej ruchomych częściowych i całkowitych, wykonanych z tworzywa akrylowego. Stomatopatia protetyczna może być również, chociaż znacznie rzadziej, wywołana obecnością w jamie ustnej stałych uzupełnień protetycznych lub wypełnień ubytków zębowych.

W piśmiennictwie zagranicznym, mianem stomatopatii protetycznej określa się prawie wyłącznie zmiany w błonie śluzowej jamy ustnej występujące w obecności protez ruchomych, płytowych. W 1989 r. Pietrzak-Bilińska wprowadziła nazwę stomatopatii ortodontycznej dla określenia zmian w błonie śluzowej występujących u dzieci i młodzieży użytkujących ruchome aparaty ortodontyczne wykonane z tworzywa akrylowego [105].

Można wyróżnić trzy główne przyczyny powstawania stomatopatii protetycznych:

- uraz mechaniczny,
- infekcja grzybami drożdżopodobnymi,
- oddziaływanie płytki protez.

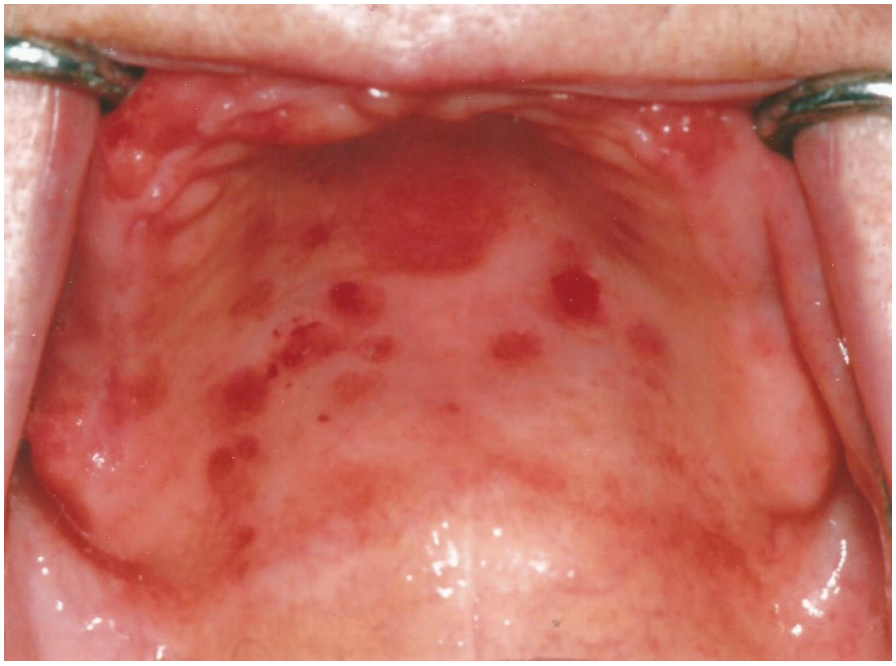
Mniejsze znaczenie przypisuje się infekcji bakteryjnej, niefizjologicznym warunkom, jakie stwarza płyta protezy, czynnikom chemiczno-toksycznym, i w bardzo rzadkich przypadkach uczuleniu na tworzywo protezy [106]. Ogólny stan zdrowia użytkownika protezy stomatologicznej może mieć istotny wpływ zarówno na powstawanie, jak i rozwój stomatopatii protetycznej. Należy jednak dodać, że zwykle więcej niż jeden czynnik jest przyczyną omawianego schorzenia i postawienie właściwego rozpoznania warunkuje skuteczność zastosowanej metody leczenia [107].

1.7.1.1 Klasyfikacja stomatopatii protetycznych

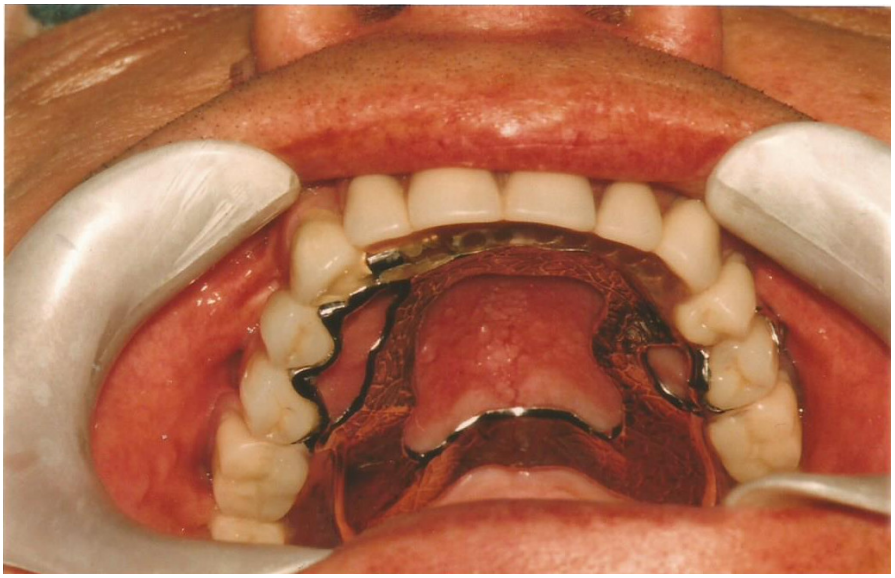
W określeniu stopnia zmian wywołanych przewlekłą obecnością ciał obcych w jamie ustnej stosuje się klasyfikację Newtona. Obraz kliniczny stomatopatii protetycznych można dzięki niej podzielić na trzy stadia:

- Stadium I – punktowe przekrwienia błony śluzowej;
- Stadium II – rozlany rumień — uogólniony stan zapalny całej błony śluzowej pokrytej płytą protezy;
- Stadium III – przerostowe ziarninujące zapalenie błony śluzowej.

Spiechowicz *et al.* wprowadzili do tej klasyfikacji stadium „0", w którym błona śluzowa klinicznie jest nie zmieniona, a pacjent ma wrażenia pieczenia, kłucia lub suchości jamy ustnej [108].



Rycina 1.3: Stomatopatia protetyczna I°. Pod płytą protezy całkowitej widoczne zmiany rumieniowe. (Fot. Dzięki uprzejmości dr hab. E. Szponar Klinika Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej UM Poznań)



Rycina 1.4: Stomatopatia protetyczna III°. Na podniebieniu widoczne zmiany rumieniowe z brodawkującą powierzchnią. (Fot. Dzięki uprzejmości dr hab. E. Szponar Klinika Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej UM Poznań)

Rycina 1.5: Pod płytą protezy całkowitej w szczęce widoczne białe zmiany z ostrym zakażeniem *Candida spp.* (Fot. Dzięki uprzejmości dr hab. E. Szponar Klinika Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej UM Poznań)

Rozdział 2

Cel pracy

Celem pracy jest ocena składu jakościowego oraz lekowrażliwości grzybów drożdżopodobnych izolowanych z jamy ustnej pacjentów użytkujących aparaty ortodontyczne i ruchome protezy płytowe.

Dla realizacji powyższego celu wykonano następujące zadania cząstkowe:

1. Dokonanie oceny częstości występowania i składu jakościowego grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida* zasiedlających błonę śluzową jamy ustnej użytkowników ruchomych uzupełnień protetycznych oraz użytkowników aparatów ortodontycznych.

2. Ocenę aktywności enzymów hydrolitycznych wyizolowanych szczepów grzybów drożdżopodobnych jako głównej determinanty patogenności oraz określenie ich lekowrażliwości wobec powszechnie stosowanych antymikotyków.

3. Wykazanie zależności pomiędzy użytkowaniem protez ruchomych lub aparatów ortodontycznych, a częstością występowania grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida* na błonach śluzowych jamy ustnej.

4. Ocenę aktywności enzymatycznej szczepów *C. albicans* u dzieci i dorosłych oraz wykazanie zależności pomiędzy wiekiem pacjenta a aktywnością enzymów hydrolitycznych.

5. Porównanie pomiędzy grupami badanymi aktywności enzymatycznej szczepów *Candida* jako głównej determinanty patogenności szczepu.

Rozdział 3

Materiał i metody

Badanie przeprowadzono jako „case control study".

Pracę pod względem metodologicznym przygotowano przy współpracy Zakładu Mikologii Lekarskiej i Dermatologii oraz Kliniki Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

3.1 Charakterystyka badanej populacji

Do badania włączono 300 osób. Stanowili oni dwie odrębne wiekowo grupy:

- 100 dorosłych powyżej 18 r.ż użytkujących ruchome uzupełnienia protetyczne i 50 w grupie kontrolnej oraz
- 100 dzieci poniżej 18 r.ż. użytkujących ruchome aparaty ortodontyczne i 50 w grupie kontrolnej osób zdrowych poniżej 18 r.ż.

W grupie dorosłych wyodrębniono 3 podgrupy:

1. Grupa badana BPZ — użytkownicy ruchomych uzupełnień protetycznych z obecnością zmian zapalnych w obrębie jamy ustnej — 50 osób.

2. Grupa badana BP — użytkownicy ruchomych uzupełnień protetycznych bez obecności zmian zapalnych w obrębie jamy ustnej — 50 osób.

3. Grupa kontrolna KP — nie zaopatrzona w uzupełnienia protetyczne oraz bez zmian zapalnych w obrębie jamy ustnej — 50 osób.

W grupie dzieci wyodrębniono 3 podgrupy:

1. Grupa badana BAZ — użytkownicy ruchomych aparatów ortodontycznych z obecnością zmian zapalnych w obrębie jamy ustnej — 50 osób.

2. Grupa badana BA — użytkownicy ruchomych aparatów ortodontycznych bez obecności zmian zapalnych w obrębie jamy ustnej — 50 osób.

3. Grupa kontrolna KA — nie zaopatrzona w aparaty ortodontyczne oraz bez zmian zapalnych w obrębie jamy ustnej — 50 osób.

3.1.1 Grupa badana użytkowników ruchomych uzupełnień protetycznych z obecnością zmian zapalnych w obrębie jamy ustnej

Grupę badaną użytkowników ruchomych uzupełnień protetycznych z obecnością zmian zapalnych w obrębie jamy ustnej stanowiło 50 chorych przyjętych na badanie mikologiczne w Zakładzie Mikologii Lekarskiej i Dermatologii UM w Poznaniu po uprzedniej konsultacji w Klinice Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej UM w Poznaniu.

3.1.1.1 Kryteria włączenia

- Posiadanie ruchomej protezy akrylowej.

- Chorzy, u których występowały subiektywne objawy kliniczne w obrębie jamy ustnej takie jak: pieczenie, uporczywy palący ból, utrata smaku.

- Obecność aktywnych zmian zapalnych w obrębie jamy ustnej klasyfikowanych w Klinice Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej UM w Poznaniu jako stomatopatia protetyczna I°, II° lub III°.

3.1.1.2 Kryteria wyłączenia

- Wiek niższy niż 18 lat ze względu na dobór grup wiekowych z zachowaniem proporcji płci i porównywalności wieku.
- Osoby chorujące na choroby przewlekłe stanowiące grupy ryzyka infekcji *Candida*, takie jak: cukrzyca, nowotwory, choroby związane z zaburzeniami funkcji układu immunologicznego.
- Pacjenci przyjmujący leki wewnętrzne lub zewnętrzne mogące wpływać na stan odporności organizmu (leki immunosupresyjne, kortykosteroidy, cytostatyki, antybiotyki).
- Chorzy stosujący zewnętrzne leki przeciwgrzybicze 7-10 dni przed badaniem mikologicznym oraz ogólne leki przeciwgrzybicze w okresie 3 miesięcy poprzedzających badanie mikologiczne.

3.1.2 Grupa badana użytkowników ruchomych uzupełnień protetycznych bez obecności zmian zapalnych w obrębie jamy ustnej

Grupę użytkowników ruchomych uzupełnień protetycznych bez obecnością zmian zapalnych w obrębie jamy ustnej stanowiło 50 chorych przyjętych do badań mikologicznych w Zakładzie Mikologii Lekarskiej i Dermatologii UM w Poznaniu po uprzedniej konsultacji w Klinice Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej UM w Poznaniu.

3.1.2.1 Kryteria włączenia

- Posiadanie ruchomej protezy akrylowej.
- Chorzy, u których nie występowały subiektywne objawy kliniczne w obrębie jamy ustnej takie jak: pieczenie, palący ból, utrata smaku.
- Brak aktywnych zmian zapalnych w obrębie jamy ustnej. Oceny klinicznej dokonano w Klinice Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej UM w Poznaniu.

3.1.2.2 Kryteria wyłączenia

- Wiek niższy niż 18 lat ze względu na dobór grup wiekowych z zachowaniem proporcji płci i porównywalności wieku
- Osoby chorujące na choroby przewlekłe stanowiące grupy ryzyka infekcji *Candida*, takie jak: cukrzyca, nowotwory, choroby związane z zaburzeniami funkcji układu immunologicznego.
- Pacjenci przyjmujący leki wewnętrzne lub zewnętrzne mogące wpływać na stan odporności organizmu (leki immunosupresyjne, kortykosteroidy, cytostatyki, antybiotyki).
- Chorzy stosujący zewnętrzne leki przeciwgrzybicze 7–10 dni przed badaniem mikologicznym oraz ogólne leki przeciwgrzybicze w okresie 3 miesięcy poprzedzających badanie mikologiczne.
- Pacjenci, u których występowała potwierdzona badaniem mikologicznym grzybica o innej niż jama ustna lokalizacji.

3.1.3 Grupa kontrolna dorosłych osób zdrowych

Grupę kontrolną dorosłych osób zdrowych stanowiło 50 osób w dobrym stanie klinicznym. Pacjenci ci byli rekrutowani z ogólnej populacji osób biorących udział

w akcji profilaktycznej w zakresie grzybic skóry i paznokci prowadzonej przez Zakład Mikologii Lekarskiej i Dermatologii UM w Poznaniu. U wyżej wymienionych osób wykonano diagnostykę mikologiczną w kierunku grzybicy dermatofitowej skóry i paznokci palców stóp — uzyskano wynik negatywny.

3.1.3.1 Kryteria włączenia

- Wiek powyżej 18 lat.
- Osoby, które nie posiadały żadnych uzupełnień protetycznych w jamie ustnej i odznaczały się całkowitym stałym uzębieniem, dopuszczając brak 1–4 zębów w żuchwie i szczęce łącznie.
- Osoby, u których aktualnie nie stwierdzono zmian klinicznych w obrębie błony śluzowej jamy ustnej.
- Osoby aktualnie zdrowe z ujemnym wywiadem w kierunku chorób przewlekłych (cukrzyca, nowotwory, choroby związane z zaburzeniami funkcji układu immunologicznego).
- Osoby nie leczone lekami przeciwgrzybiczymi, steroidami i antybiotykami w czasie ostatnich 3 miesięcy.
- Osoby z wynikiem negatywnym badań mikologicznych w kierunku grzybicy skóry i paznokci stóp.

3.1.4 Grupa badana dzieci leczonych ortodontycznie z obecnością zmian zapalnych w jamie ustnej

Grupę badaną dzieci leczonych ortodontycznie z obecnością zmian zapalnych w jamie ustnej stanowiło 50 chorych przyjętych na badanie mikologiczne w Zakładzie Mikologii Lekarskiej i Dermatologii UM w Poznaniu po uprzedniej konsultacji w Specjalistycznym Gabinecie Ortodontycznym.

3.1.4.1 Kryteria włączenia

- Posiadanie ruchomego aparatu ortodontycznego czynnościowego (biomechanicznego) aktywatory pobudzające mięśnie typu monoblok lub czynnego aparatu mechanicznego — płytki Schwarza.
- Chorzy, u których występowały subiektywne objawy kliniczne w obrębie jamy ustnej takie jak: pieczenie, uporczywy palący ból, utrata smaku.
- Obecność aktywnych zmian zapalnych w obrębie jamy ustnej klasyfikowanych w Specjalistycznym Gabinecie Ortodontycznym.
- Osoby, które przed rozpoczęciem leczenia ortodontycznego w obrębie zębów szczęki oraz żuchwy nie posiadały ubytków próchniczych.
- Kontrola stomatologiczna stanu jamy ustnej pod kątem powstawania nowych ubytków próchniczych podczas leczenia ortodontycznego.

3.1.4.2 Kryteria wyłączenia

- Wiek powyżej 18 lat ze względu na dobór grup wiekowych z zachowaniem proporcji płci i porównywalności wieku.
- Osoby chorujące na choroby przewlekłe stanowiące grupy ryzyka infekcji *Candida*, takie jak: nowotwory, cukrzyca, choroby związane z zaburzeniami funkcji układu immunologicznego.
- Chorzy przyjmujący leki wewnętrzne lub zewnętrzne mogące wpływać na stan odporności organizmu (antybiotyki, leki immunosupresyjne, kortykosteroidy, cytostatyki).
- Pacjenci stosujący zewnętrzne leki przeciwgrzybicze 7-10 dni przed badaniem mikologicznym oraz ogólne leki przeciwgrzybicze w okresie 3 miesięcy poprzedzających badanie mikologiczne.

3.1.5 Grupa badana dzieci leczonych ortodontycznie bez zmian zapalnych w jamie ustnej

Grupę badaną dzieci leczonych ortodontycznie bez zmian zapalnych w jamie ustnej stanowiło 50 chorych przyjętych do badań mikologicznych w Zakładzie Mikologii Lekarskiej i Dermatologii UM w Poznaniu po uprzedniej konsultacji w Specjalistycznym Gabinecie Ortodontycznym.

3.1.5.1 Kryteria włączenia

- Posiadanie ruchomego aparatu ortodontycznego czynnościowego (biomechanicznego), aktywatory pobudzające mięśnie typu monoblok lub czynnego aparatu mechanicznego—płytki Schwarza.
- Chorzy, u których nie występowały subiektywne objawy kliniczne w obrębie jamy ustnej takie jak: pieczenie, palący ból, utrata smaku.
- Brak aktywnych zmian zapalnych w obrębie jamy ustnej. Oceny klinicznej dokonano w Specjalistycznym Gabinecie Ortodontycznym.
- Kontrola stomatologiczna stanu jamy ustnej pod kątem powstawania nowych ubytków próchniczych w trakcie trwania leczenia ortodontycznego.

3.1.5.2 Kryteria wyłączenia

- Wiek powyżej 18 lat ze względu na dobór grup wiekowych z zachowaniem proporcji płci i porównywalności wieku.
- Osoby chorujące na choroby przewlekłe stanowiące grupy ryzyka infekcji *Candida*, takie jak: nowotwory, cukrzyca, choroby związane z zaburzeniami funkcji układu immunologicznego.
- Chorzy przyjmujący leki wewnętrzne lub zewnętrzne mogące wpływać na stan odporności organizmu (antybiotyki, leki immunosupresyjne, kortykosteroidy, cytostatyki).

- Pacjenci stosujący zewnętrzne leki przeciwgrzybicze 7-10 dni przed badaniem mikologicznym oraz ogólne leki przeciwgrzybicze w okresie 3 miesięcy poprzedzających badanie mikologiczne.
- Osoby, które przed rozpoczęciem leczenia ortodontycznego w obrębie szczęki oraz żuchwy posiadały ubytki próchnicze.

3.1.6 Grupa kontrolna dzieci zdrowych

Grupę kontrolną dzieci zdrowych stanowiło 50 osób w dobrym stanie klinicznym. Pacjenci ci byli rekrutowani z ogólnej populacji osób zgłaszających się do Poradni Ortodontycznej celem diagnostyki oraz ewentualnego rozpoczęcia leczenia wad zgryzu za pomocą aparatów ortodontycznych. Materiał do badań mikologicznych był pobierany na pierwszej wizycie poprzedzającej założenie aparatu ortodontycznego.

3.1.6.1 Kryteria włączenia

- Wiek poniżej18 lat.
- Osoby, które nie użytkowały aparatów ortodontycznych stałych i ruchomych w jamie ustnej.
- Osoby, u których aktualnie nie stwierdzono ubytków próchniczych w obrębie zębów szczęki i żuchwy.
- Osoby, u których aktualnie nie stwierdzono zmian klinicznych w obrębie błony śluzowej jamy ustnej.
- Chorzy, u których nie występowały subiektywne objawy kliniczne w obrębie jamy ustnej takie jak: pieczenie, uporczywy palący ból, utrata smaku.
- Osoby aktualnie zdrowe z ujemnym wywiadem w kierunku chorób przewlekłych (cukrzyca, nowotwory, choroby związane z zaburzeniami funkcji układu immunologicznego).

Tabela 2: Opis grup utworzonych w badaniu

Grupa	Proteza /aparat	Zmiany zapalne	Objawy subiek-tywne	Choroby ogólno-ustrojowe	Próchnica	Wiek (lata)
BPZ	+	+	+	-	-	>18
BP	+	-	-	-	-	>18
KP	-	-	-	-	-	>18
BAZ	+	+	+	-	-	<18
BA	+	-	-	-	-	<18
KA	-	-	-	-	-	<18

BPZ — grupa użytkowników protez ze zmianami zapalnymi jamy ustnej, BP — grupa użytkowników protez bez zmian zapalnych jamy ustnej, KP — grupa kontrolna dorosłych, BAZ — grupa użytkowników aparatów ortodontycznych ze zmianami zapalnymi jamy ustnej, BA — grupa użytkowników aparatów ortodontycznych bez zmian zapalnych jamy ustnej, KA — grupa kontrolna dzieci.

- Osoby nie leczone lekami przeciwgrzybiczymi, steroidami i antybiotykami w czasie ostatnich 3 miesięcy.

3.2 Zgoda na badanie

Wszystkie osoby badane zostały poinformowane o zasadach i celu prowadzenia badania oraz zostały zakwalifikowane po wyrażeniu zgody na udział w nim. W przypadku osób małoletnich zgodę uzyskano od ich prawnego opiekuna (matka, ojciec). Protokół badania uzyskał wcześniejszą zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym m. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (zgoda nr: 667/06).

3.3 Zakres badań

3.3.1 Badanie kliniczne

Chorzy zakwalifikowani do badania, po uzyskaniu ich pisemnej zgody, poddani zostali rutynowemu badaniu klinicznemu, które obejmowało:

1. Badanie podmiotowe, ze szczególnym uwzględnieniem przebiegu i objawów choroby, czynników ryzyka zakażenia *Candida* oraz chorób współistniejących.

2. Badanie przedmiotowe z oceną stanu błony śluzowej jamy ustnej. Badania kliniczne zostały wykonane przez wykwalifikowany personel Kliniki Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej UM w Poznaniu oraz Specjalistyczny Gabinet Ortodontyczny.

3.3.2 Pobieranie materiału

U wszystkich zakwalifikowanych do badania chorych pobrano wymazy z błon śluzowych jamy ustnej. Materiał pobrano za pomocą jałowej wymazówki zwilżonej fizjologicznym roztworem NaCl 0,9%. W braku możliwości wykonania bezpośredniego posiewu na podłoża mikologiczne wymazy były pobierane za pomocą wymazówek ze standardowym podłożem transportowym, po uprzednim zwilżeniu NaCl 0,9%, i w okresie do 4 godzin od pobrania posiewane na podłoże do diagnostyki mikologicznej. Wymazy były pobierane w godzinach rannych, na czczo, po 12 godzinach od ostatniego standardowego mycia zębów. Materiał pobierano z trzech miejsc:

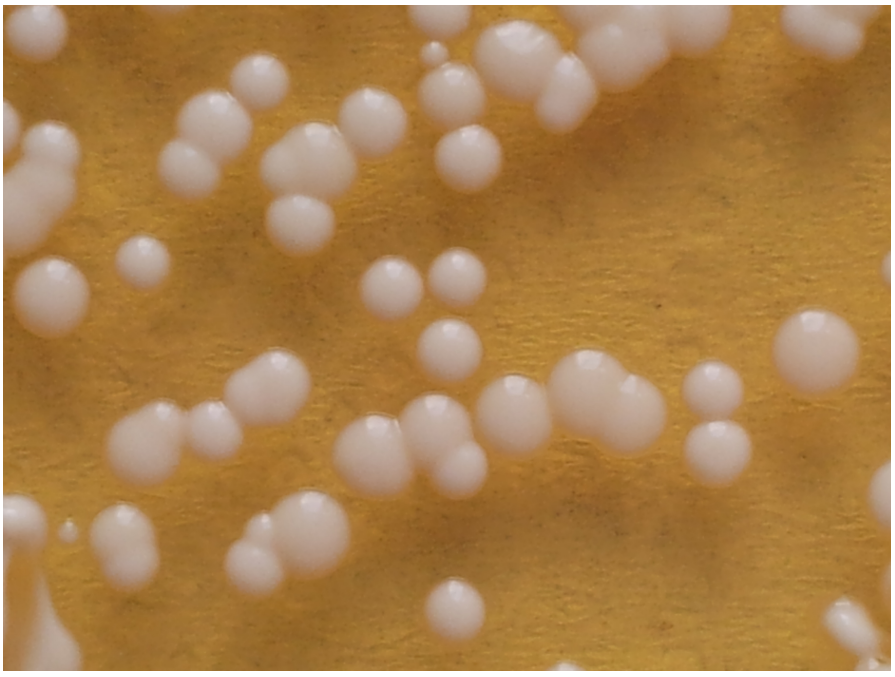
1. wymaz z powierzchni grzbietowej języka,

2. wymaz z podniebienia,

3. wymaz z powierzchni wewnętrznej policzków lub w zależności od grupy badanej z powierzchni podniebiennej protezy lub aparatu ortodontycznego.

3.3.3 Badanie mikologiczne

Dotyczyło izolacji i identyfikacji patogenu, oznaczenia aktywności enzymatycznej wyhodowanych szczepów grzybów drożdżopodobnych oraz oznaczenia ich lekowrażliwości *in vitro*.

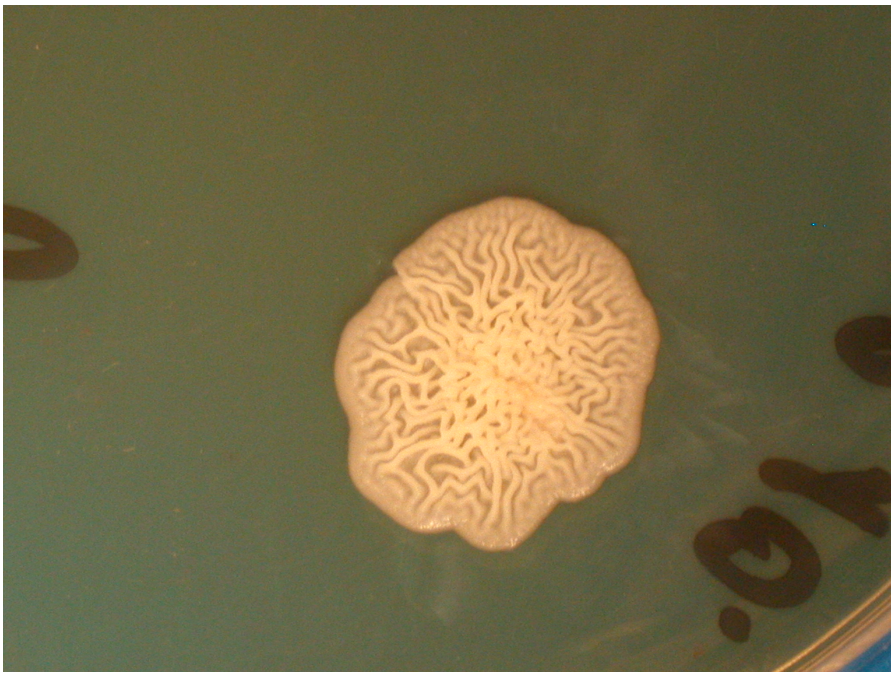


Rycina 3.1: Wzrost kolonii *C. albicans* na podłożu Sabouraud dextrose agar z chloramfenikolem

1. Ocena mikroskopowa preparatu bezpośredniego niebarwionego i barwionego metodą Grama.

2. Hodowla *in vitro* na podłożu Sabourauda (GRASO) o składzie 4% glukozy, 1% peptonu, 1,8% agaru, pH podłoża wynosiło 5,6. Dodatkiem do podłoża był chloramfenikol. Hodowlę prowadzono 24–72 godziny w temperaturze 37°C. Następnie kontynuowano hodowlę przez 14 dni w temperaturze 25°C w celu izolacji ewentualnej flory pleśniowej.

Identyfikację grzybów z rodzaju *Candida* przeprowadzono za pomocą standardowych podłoży chromogennych „ChromAgar *Candida*" (GRASO) a w dalszym etapie z użyciem standardowych testów ID 32 C firmy bioMérieux. Opierają się one na ocenie zdolności przyswajania węgla przez grzyby z rodzaju *Candida*. Do oceny wyników stosowana była baza danych firmy bioMérieux pozwalająca na ocenę grzybów zarówno z rodzaju *Candida*, jak i *Cryptococcus, Geotrichum, Rhodotorula, Saccharomyces, Sporobolomyces i Trichosporon*. Przeprowadzenie testu wymaga:



Rycina 3.2: Wzrost kolonii *C. parapsilosis* na podłożu Sabouraud dextrose agar z chloramfenikolem

1. Przygotowania zawiesiny kolonii grzybów z podłoża Sabourauda w wodzie destylowanej o gęstości 2 w skali McFarland (gęstość zawiesiny oceniono za pomocą densytometru).

2. Dodania 250 µl zawiesiny grzybów do C Medium i delikatnego wymieszania.

3. Dodania 135 µl z „C Medium" do każdej studzienki paska testowego, przykrycie pokrywą.

4. Inkubacji 24-48-72 godziny w temperaturze 37°C.

5. Odczytu automatycznego w systemie ATB Reader po 24, 48 i 72 godzinach.

3.3.4 Ocena aktywności enzymatycznej za pomocą testu API ZYM firmy bioMérieux

Badanie aktywności hydrolitycznej za pomocą testu API ZYM firmy bioMérieux jest półilościową mikrometodą, pozwalającą na określenie aktywności hydrolitycznej m.in. grzybów drożdżopodobnych. Zawiera substraty służące do identyfikacji

19 hydrolaz. Oceniane enzymy i ich substraty przedstawiono w tabeli 3.

Do badania użyto szczepy *Candida* z 24-godzinnej hodowli. Z tych szczepów przy użyciu densytometru przygotowano zawiesinę w wodzie destylowanej, o gęstości 5 w skali McFarlanda. 65 µl tej zawiesiny przenoszono do miseczek pasków testu „API ZYM". Paski nakrywano pokrywką i inkubowano w temperaturze 37°C przez 4 godziny. Po inkubacji dodano po 1 kropli „ZYM A" (o składzie: trihydroksymetyl-amino-metan 15 g, kwas chlorowodorowy 21 ml, siarczan laurowy 10 g, woda destylowana do 100 ml) oraz „ZYM B" (o składzie: Fast Blue BB 0,33 g, 2-metoksyetanol do 100 ml) do miseczek i pozostawiono na 5 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie dokonywano odczytu według intensywności skali barwnej. Zgodnie z zaleceniem producenta stosowano skalę 6-stopniową (od 0 do 5 stopni): 0 — 0 nmol, 1 — 5 nmol, 2 — 10 nmol, 3 — 20 nmol, 4 — 30 nmol, 5 — powyżej 40 nmol. Przyjęte przedziały nasilenia reakcji:

- (śr$\leq$ 2) — aktywność niska,
- (2 $<$ śr $<$ 3) — aktywność średnia,
- (śr $\geq$ 3) — aktywność wysoka.

3.3.5 Ocena biotypu *C. albicans* na podstawie aktywności enzymatycznej

Posługując się wytycznymi opisującymi biotypy szczepów *C. albicans* na podstawie aktywności pięciu enzymów hydrolitycznych postanowiono określić występowanie następujących biotypów *C. albicans*:

- A–H opisane przez Williamsona [58],
- I–J opisane przez Kurnatowską i Kurnatowskiego [59],
- O–T opisane przez Krajewską-Kułak *et al.* [109].

3.3.6 Oznaczanie lekowrażliwości *in vitro* grzybów z rodzaju *Candida*

Oznaczenie lekowrażliwości przeprowadzono metodą dyfuzyjno-krążkową na podłożu YNB (Yeast Nitrogen Base) wg. metodyki producenta. Oznaczono wrażliwość wyizolowanych grzybów z rodzaju *Candida* na 10 podstawowych antymikotyków: amfoterycyna-B, 5-fluorocytozyna, nystatyna, pimarycyna, klotrimazol, mikonazol, ketokonazol, tiokonazol, flukonazol, itrakonazol. Badanie przeprowadzono metodą dyfuzyjno-krążkową ze względu na możliwość oznaczenia lekowrażliwości nystatyny — najczęściej stosowanej w stomatologii. Równocześnie prowadzono ocenę lekowrażliwości za pomocą testu „Fungitest" (firmy *Bio-Rad*).

Tabela 3: Oceniane enzymy hydrolityczne i ich substraty.

Nr	Nazwa enzymu	Hydrolizowany substrat
E1	Fosfataza zasadowa	2-naftylofosforan
E2	Esteraza (C4)	2-naftylomaślan
E3	Lipaza esterazowa (C8)	2-naftylokapronian
E4	Lipaza (C14)	2-naftylomirystylan
E5	Arylamidaza leucylowa	L-leucylo-2-naftyloamid
E6	Arylamidaza walinowa	L-walino-2-naftyloamid
E7	Arylamidaza cystynowa	L-cystynylo-2-naftyloamid
E8	Trypsyna	N-benzylo-DL-arginino-2-naftyloamid
E9	α-chymotrypsyna	N-glutarylo-fenyloalanino-2-naftyloamid
E10	Fosfataza kwaśna	2-naftylofosforan
E11	Fosfohydrolaza naftolowa-AS-BI	Naftolo-AS-BI-fosforan
E12	α-galaktozydaza	6-Br-2-naftylo-α-D-galaktopiranoza
E13	β-galaktozydaza	2-naftylo-β-D-glukopiranoza
E14	β-glukuronidaza	Naftolo-AS-BI- β-D-glukuronid
E15	α-glukozydaza	2-naftylo-α-D-glukopiranoza
E16	β-glukozydaza	6-Br-2-naftylo- β-D-glukopiranoza
E17	N-acetyl-β-glukozaminidaza	1-naftylo-N-acetylo-β-glukozyloamid
E18	α-mannozydaza	6-Br-2-naftylo-α-mannopyranozydaza
E19	α-fukozydaza	2-naftylo-α-L-fukopiranoza

Rycina 3.3: Oznaczenie lekooporności grzybów drożdżopodobnych metodą Fungitest (*Bio-Rad*)

3.3.7 Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej wykorzystano program Statistica 6.0 PL dla Windows firmy StatSoft Inc. Wartości obliczane dla zmiennych na skalach interwałowych przedstawiono jako średnią arytmetyczną z odchyleniem standardowym (SD). Analizę porównawczą między cechami na skali ordynalnej przeprowadzono za pomocą testu U Manna-Whitneya. Do oceny zależności zmiennych określonych na skalach nominalnych użyto testu Chi^2. Za znamienne statystycznie przyjęto zmiany przy poziomie istotności $p < 0{,}05$.

Rozdział 4

Wyniki

4.1 Charakterystyka badanej grupy

4.1.1 Opis liczebności i demografia pacjentów

Badaniem objęto 300 pacjentów, w tym 189 kobiet i 111 mężczyzn. Tabela 4 przedstawia średnie wartości wieku dla każdej z grup utworzonych zgodnie z założeniami określonymi w metodologii w rozdziale 3.1.

Tabela 4: Charakterystyka wieku w poszczególnych grupach badanych

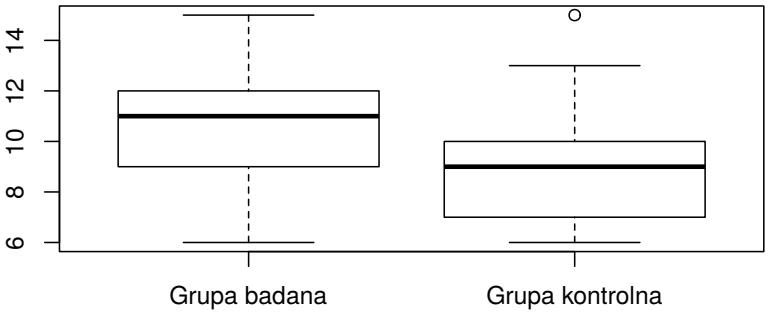
Grupa	n	Średnia
Pacjenci stosujący płytki protetyczne, z obecnością zmian zapalnych w jamie ustnej	50	65,1 ± 10,8
Pacjenci stosujący płytki protetyczne, bez zmian zapalnych w jamie ustnej	50	64,6 ± 12,4
Pacjenci nie stosujący protez	50	62,9 ± 13,2
Pacjenci stosujący aparaty ortodontyczne, z obecnością zmian zapalnych w jamie ustnej	50	10,9 ± 1,8
Pacjenci stosujący aparaty ortodontyczne, bez zmian zapalnych w jamie ustnej	50	10,6 ± 1,8
Pacjenci nie stosujący aparatów ortodontycznych	50	9,1 ± 2

4.1.2 Weryfikacja dopasowania grup kontrolnych pod względem płci i wieku

Grupa badana pacjentów z protezami płytowymi nie różniła się istotnie pod względem wieku (p = 0,3602) i płci (p = 0,0947) od grupy kontrolnej pacjentów zdrowych. W grupie dzieci stosujących aparaty i odpowiadającej jej grupie kontrolnej także nie było istotnych różnic pod względem płci (p = 0,8607). Biorąc pod uwagę wiek — dzieci w grupie badanej były statystycznie istotnie starsze o średnio rok względem grupy kontrolnej (p < 0,0001). Powyższe porównania ilustruje tabela 5. Rycina 4.1 pokazuje na wykresie skrzynkowym różnice wieku pomiędzy wspomnianymi grupami.

Tabela 5: Charakterystyka wieku w grupie mężczyzn i kobiet

Grupa	*n*	Średnia i SD
Ogółem		
Kobiety	189	38,8 ± 27,9
Mężczyźni	111	34,5 ± 29,2
Dorośli		
Kobiety	102	63,2 ± 11,9
Mężczyźni	48	66,4 ± 12,5
Dzieci		
Płeć żeńska	87	10,2 ± 2
Płeć męska	63	10,1 ± 2,1



Rycina 4.1: Wiek dzieci grup badanych, leczonych ortodontycznie i grupy kontrolnej

4.2 Określenie grup o zwiększonym odsetku pozytywnych hodowli

Z pobranych do badania próbek, z języka, podniebienia oraz (zależnie od badanej grupy) aparatu ortodontycznego lub płytki protetycznej czy też policzka (u pacjentów grupy kontrolnej) wyhodowano 404 pozytywnych preparatów co stanowiło 44,89% wszystkich pobranych próbek. Tabela 6 przedstawia wartość p testu Chi^2 dla pozytywnych hodowli w określonych grupach.

Różnice istotne statystycznie w ilości pozytywnych hodowli były obserwowane między grupami badanymi i kontrolnymi bez względu na miejsce pobrania materiału. Grupa stosująca aparaty ortodontyczne, podobnie jak grupa stosująca protezy płytowe znacznie częściej miała pozytywne wyniki hodowli próbek pobranych z jamy ustnej niż pacjenci z odpowiedniej grupy kontrolnej.

Można zauważyć, że nie obserwowano istotnych różnic w częstości występowania pozytywnych hodowli między grupą dzieci i dorosłych. Podobnie — między grupami kobiet i mężczyzn także nie było istotnych różnic. Dalsza analiza tych obserwacji znajduje się w sekcji 4.2.1.

Tabela 6: Istotność statystyczna w poszczególnych hipotezach dla pozytywnych i negatywnych hodowli w zależności od miejsca pobrania materiału

Porównanie w grupie:	Język	Podniebienie	Aparat, proteza lub policzek
dzieci i dorosłych	0,105	0,4841	0,9077
kobiet i mężczyzn	0,7975	0,3625	0,4449
stosującej aparat i kontroli	0,0003	0,0005	0
stosującej protezy i kontroli	0,013	0,0045	0,0031

Wszystkie wartości „p” podane w tabeli obliczone są za pomocą testu Chi^2.

4.2.1 Pozytywne hodowle w grupach badanych i kontrolnych

W tabeli 7 uwidoczniono relatywne wartości pozytywnych hodowli grzybiczych u pacjentów w poszczególnych grupach. Nie zaobserwowano istotnych różnic w grupach dzielonych według płci i wieku, lecz w grupach badanych istotnie częściej występowały pozytywne hodowle niż w odpowiadających im grupach kontrolnych. Grupy badane rozumiano w tym ujęciu bez rozróżnienia na obecność zmian zapalnych czy też ich brak w jamie ustnej.

Tabela 7: Relatywne częstości występowania pozytywnych hodowli mikologicznych u pacjentów określonych grup z uwzględnieniem miejsca pobrania materiału.

Język	Grupa wiekowa	Dorośli 51,33%	Dzieci 41,33%	
	Płeć	Kobiety 45,5%	Mężczyźni 47,75%	
	Pacjenci z ap. ortodontycznymi	Badana 52%	Kontrolna 20%	*
	Pacjenci z pł. protetycznymi	Badana 59%	Kontrolna 20%	*
Podniebienie	Grupa wiekowa	Dorośli 45,33%	Dzieci 40,67%	
	Płeć	Kobiety 40,74%	Mężczyźni 46,85%	
	Pacjenci z ap. ortodontycznymi	Badana 51%	Kontrolna 20%	*
	Pacjenci z pł. protetycznymi	Badana 54%	Kontrolna 28%	*
Aparat/proteza	Grupa wiekowa	Dorośli 46%	Dzieci 44,67%	
	Płeć	Kobiety 43,39%	Mężczyźni 48,65%	
	Pacjenci z ap. ortodontycznymi	Badana 61%	Kontrolna 12%	*
	Pacjenci z pł. protetycznymi	Badana 55%	Kontrolna 28%	*

∗W ostatniej kolumnie symbolem gwiazdki określono, które różnice częstości w określonych grupach są istotne statystycznie

Najbardziej prominentne różnice obserwowano w grupie dzieci. Te które stosowały aparaty ortodontyczne miały istotnie częściej pozytywne hodowle mikologiczne.

4.2.2 Porównanie obecności pozytywnych hodowli w grupach z zapaleniami jamy ustnej lub ich brakiem

Porównując grupę pacjentów posiadających przewlekle ciała obce w jamie ustnej wydzielono dwie grupy: z obecnością zmian zapalnych w jamie ustnej i bez makroskopowo widocznych zmian zapalnych w jamie ustnej. W porównaniu tym zauważono, iż istotnie częściej w grupie pacjentów z widocznymi zmianami zapalnymi obserwowano pozytywne wyniki hodowli preparatów pobranych zarówno z języka ($p = 0{,}0044$), z podniebienia ($p = 0{,}0474$) jak i ciała obcego ($p = 0{,}0003$). Tabela 8 ilustruje rozkład obserwowanych wartości w określonych grupach badanych.

Tabela 8: Częstość występowania pozytywnych hodowli próbek pobranych z ciała obcego w zależności od obecności zmian zapalnych w jamie ustnej pacjenta

	Brak zmian zapalnych	Zmiany zapalne obecne
Hodowla negatywna	57	30
Hodowla pozytywna	45	71

Porównano również występowanie liczby odrębnych szczepów obserwowanych w pozytywnych hodowlach. Próbki pobrane od pacjentów z zapaleniami w jamie ustnej istotnie częściej w hodowli prezentowały florę mieszaną składającą się z więcej niż jednego organizmu sprawczego ($p = 0{,}0002$). W tabeli 9 zilustrowano rozkład wielowalentnych hodowli (w sumie 26 incydentów) u pacjentów z grupy badanej w zależności od obserwowanych zmian zapalnych w jamie ustnej.

Tabela 9: Częstość występowania w hodowli wielu szczepów grzybów chorobotwórczych izolowanych od pacjenta w zależności od obecności zmian zapalnych w jamie ustnej pacjenta.

	Brak zmian zapalnych	Zmiany zapalne obecne
Pojedynczy szczep	53	53
2 lub więcej szczepów	2	24

4.3 Częstość występowania w hodowli poszczególnych gatunków grzybów drożdżopodobnych

W badaniu 300 pacjentów u 139 rozpoznano co najmniej jeden gatunek grzyba chorobotwórczego w hodowli preparatów pobranych z trzech miejsc w jamie ustnej. Innymi słowy nosicielami grzybów drożdżopodobnych było 46,33% pacjentów.

Badaniem mikologicznym, poprzez hodowlę kolonii, rozpoznano 9 różnych gatunków grzybów chorobotwórczych. Najczęściej rozpoznawanym grzybem był *C. albicans* (128) i stanowił 78,53% wszystkich pozytywnych rozpoznań mikologicznych. Opis częstości rozpoznanych gatunków grzybów drożdżopodobnych znajduje się w tabeli 10.

Tabela 10: Liczba rozpoznanych gatunków grzybów w hodowli mikologicznej u wszystkich pacjentów objętych badaniem.

Gatunek	Liczba rozpoznań	Frakcja pozytywnych rozpoznań*
C. albicans	128	78,53%
C. glabrata	22	13,5%
C. tropicalis	19	11,66%
C. inconspicua	14	8,59%
C. krusei	18	11,04%
C. parapsilosis	16	9,82%
C. stellatoidea	7	4,29%
C. kefyr	4	2,45%
C. guillermondi	2	1,23%

*U niektórych pacjentów rozpoznano więcej niż jeden szczep grzyba (zob. sekcję 4.4).

Preparaty, których hodowla wykazała obecność dwóch szczepów opisano w sekcji 4.4.

4.3.1 Występowanie *C. albicans*

C. albicans rozpoznano u 128 pacjentów. Nie wykazano istotnych różnic w występowaniu *C. albicans* u dzieci i dorosłych (p = 0,7262). W grupie płci męskiej i żeńskiej (bez uwzględnienia kryterium różnicującego — wieku) także rozkład pozytywnych próbek pod względem wyhodowania *C. albicans* był podobny (p = 0,6049). Dopiero kiedy podzielono tę grupę na dzieci i dorosłych zauważono, że u dziewczynek *C. albicans* hodowano istotnie rzadziej niż u chłopców (p = 0,0034).

Porównując grupy badane (czyli zarówno pacjentów stosujących protezy jak i aparaty ortodontyczne, bez rozróżnienia na występowanie zmian zapalnych) z grupami kontrolnymi zaobserwowano, iż istotnie częściej *C. albicans* rozpoznawano u pacjentów z grup badanych niż tych z grup kontrolnych (p = 0,00002). Między grupami badanymi także występowały istotne różnice. Zarówno w grupie stosującej aparaty ortodontyczne (p = 0,0013) jak i stosującej protezy (p = 0,0089) stwierdzono istotnie częstsze występowanie *C. albicans* w hodowli próbek pobranych z trzech miejsc w jamie ustnej.

W grupie pacjentów z klinicznymi objawami zapalenia w jamie ustnej stosujących aparaty ortodontyczne znacznie częściej obserwowano pozytywne wyniki hodowli *C. albicans* (p = 0,0164). Podobnie było w grupie pacjentów stosujących protezy płytkowe (p = 0,0093).

4.4 Zakażenia wielowalentne

U 33 pacjentów opisano więcej niż jeden grzyb chorobotwórczy w hodowli, co stanowiło 11% wszystkich pacjentów lub 23,74% pozytywnych rozpoznań (wartość

opisana w rozdziale 4.3). W grupie tej było 18 (54,55%) kobiet i 15 (45,45%) mężczyzn.

Również 14 dorosłych i 19 dzieci uzyskało wyniki hodowli próbek informujące o zakażeniu wieloma szczepami.

Najczęściej występującą parą grzybów chorobotwórczych w próbkach z języka, podniebienia i ciał obcych była *C. albicans* z *C. glabrata*, która to wystąpiła u 8 pacjentów.

4.5 Analiza oporności grzybów na leki przeciwgrzybicze

Zbadano jaką wrażliwość na hodowlę w obecności leków przeciwgrzybiczych wykazywały poszczególne gatunki grzybów izolowanych od pacjentów. Poniżej przedstawiono wykresy relatywnych częstości wrażliwych, średniowrażliwych i opornych szczepów na dany związek chemiczny.

4.5.1 Lekowrażliwość grzybów drożdżopodobnych

Każda poniższa rycina przedstawia jaki procent wyhodowanych szczepów był wrażliwy (skrótowy identyfikator legendy *Wr*), średniowrażliwy (skrótowy identyfikator legendy *Śr*) lub oporny (skrótowy identyfikator legendy *Op*) na dany lek przeciwgrzybiczy.

Leki przeciwgrzybicze określono skrótami literowymi a ich wyjaśnienie, uwzględniające nazwę międzynarodową użytego składnika czynnego, znajduje się w tabeli 11.

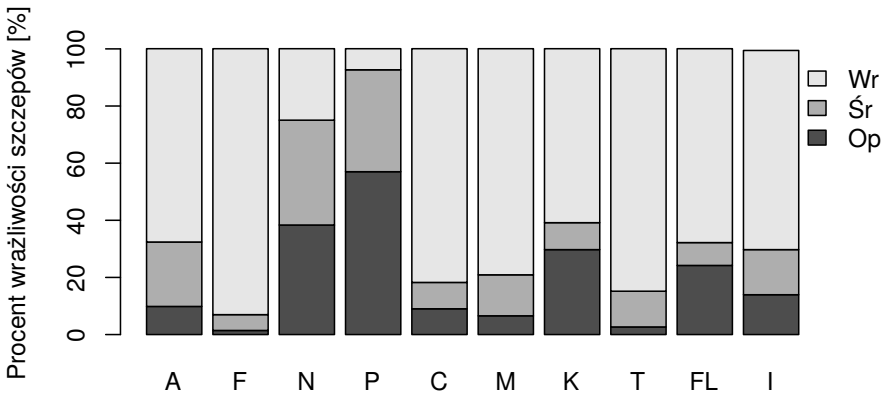
Tabela 11: Opis stosowanych skrótów nazw leków w rycinach 4.3–4.8.

Skrót	Nazwa międzynarodowa środka leczniczego
A	Amfoterycyna B
F	5-fluorocytozyna
N	Nystatyna
P	Pimarycyna
C	Klotrimazol
M	Mikonazol
K	Ketokonazol
T	Tiokonazol
FL	Flukonazol
I	Itrakonazol

4.5.2 Charakterystyka skuteczności poszczególnych leków przeciwgrzybiczych

Postanowiono określić jaki antymikotyk był skuteczny w hamowaniu wzrostu największej liczby szczepów rozpoznanych w badaniu mikologicznym. Rycina 4.2 przedstawia ocenę skuteczności wszystkich sprawdzanych preparatów w inhibicji wzrostu wszystkich kolonii grzybiczych.

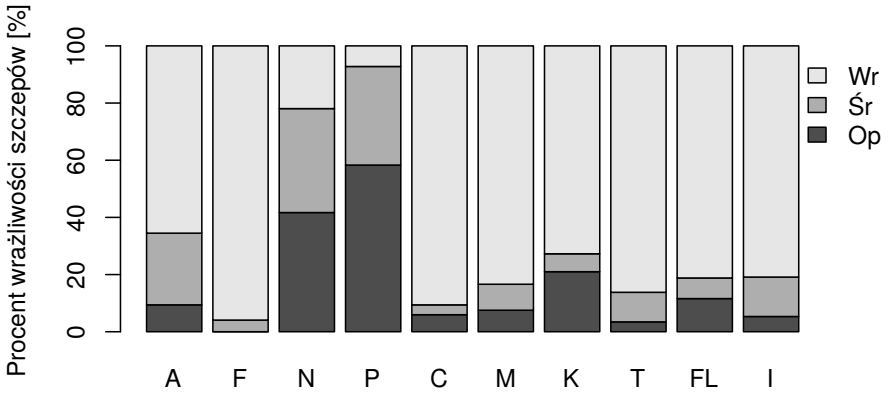
Na rycinie 4.2 zobrazowano jakie frakcje szczepów grzybów izolowanych od pacjentów były wrażliwe bądź oporne na leki przeciwgrzybicze. Warto zauważyć, że najczęściej, bo aż w 93,09% przypadków obserwowano hamowanie wzrostu wyhodowanych kolonii w obecności 5-fluorocytozyny. Również 84,89% kolonii wykazało wrażliwość na tiokonazol. Najmniej skuteczna okazała się pimarycyna, na którą 57% wszystkich pobranych szczepów było opornych, a tylko 7,38% oznaczono jako wrażliwe. Drugą najmniej skuteczną substancją okazała się nystatyna. W jej przypadku 38,34% szczepów było opornych a 25,02% wrażliwych na jej działanie. W dalszej części tej sekcji zostaną przedstawione wrażliwości charakterystyczne dla poszczególnych gatunków *Candida*.



Rycina 4.2: Wrażliwość wszystkich szczepów na leki przeciwgrzybicze. A — Amfoterycyna B; F — 5-fluorocytozyna; N — Nystatyna; P — Pimarycyna; C — Klotrimazol; M — Mikonazol; K — Ketokonazol; T — Tiokonazol; FL — Flukonazol; I — Itrakonazol

4.5.2.1 Lekowrażliwość *C. albicans*

Rycina 4.3 przedstawia jaki procent wyhodowanych szczepów *C. albicans* był wrażliwy na zestaw leków przeciwgrzybiczych zastosowanych do oznaczenia lekooporności. Wynikało z niego, że najwięcej (95,92%) szczepów *C. albicans* było wrażliwych na 5-fluorocytozynę. Z kolei 58,31% szczepów było opornych na pimarycynę.

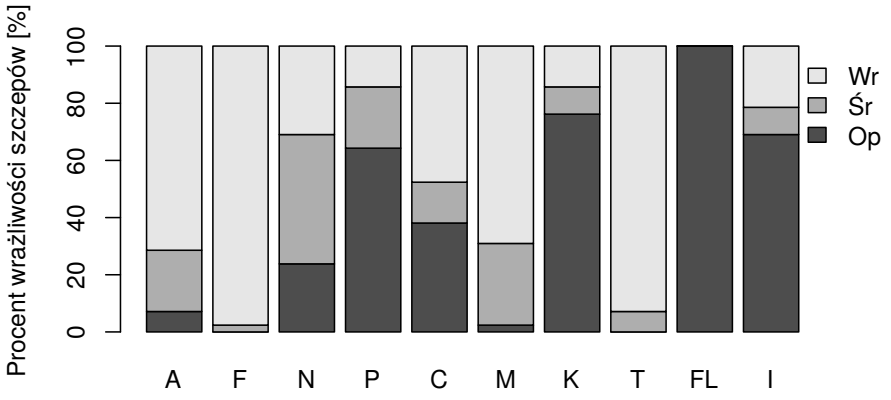


Rycina 4.3: Wrażliwość na leki przeciwgrzybicze *C. albicans*.
A — Amfoterycyna B; F — 5-fluorocytozyna; N — Nystatyna; P — Pimarycyna; C — Klotrimazol; M — Mikonazol; K — Ketokonazol; T — Tiokonazol; FL — Flukonazol; I — Itrakonazol

4.5.2.2 Lekowrażliwość *C. glabrata*

W grupie szczepów *C. glabrata* wyhodowano 97,62% wrażliwych na 5-fluorocytozynę. Natomiast 64,29%, 23,81% i 76,19% było opornych odpowiednio na: pimarycynę, nystatynę i ketokonazol.

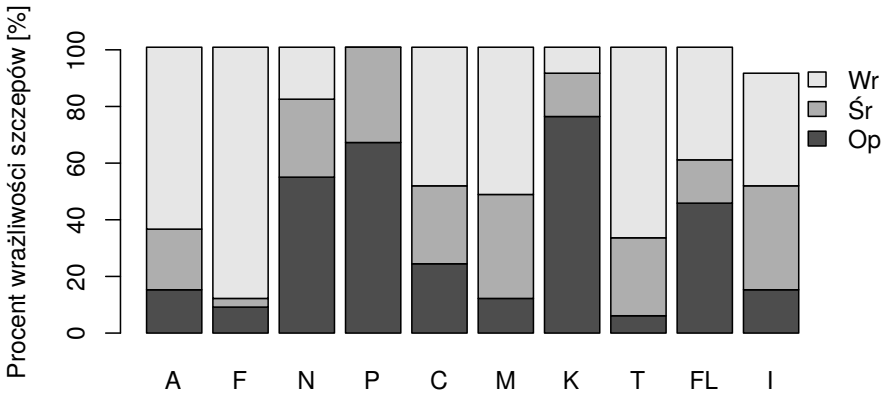
Szczepy *C. glabrata* odznaczały się największym odsetkiem opornych kolonii na leki przeciwgrzybicze. 45,95% z nich było opornych na jakiś lek przeciwgrzybiczy a kolejne 15,95% było średnio wrażliwe (zob. rycina 4.4).



Rycina 4.4: Wrażliwość na leki przeciwgrzybicze *C. glabrata*.
A — Amfoterycyna B; F — 5-fluorocytozyna; N — Nystatyna; P — Pimarycyna; C — Klotrimazol; M — Mikonazol; K — Ketokonazol; T — Tiokonazol; FL — Flukonazol; I — Itrakonazol

4.5.2.3 Lekowrażliwość *C. tropicalis*

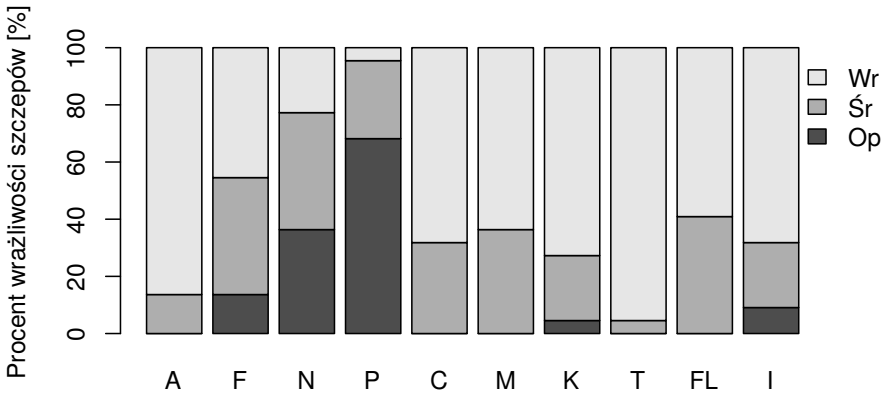
Szczepy *C. tropicalis* były oporne głównie na ketokonazol (76,45% wszystkich wyhodowanych szczepów *C. tropicalis*), pimarycynę (67,28%) oraz nystatynę (55,05%). Największą wrażliwość wykazywały na hodowlę w obecności 5-fluorocytozyny (88,69%). Charakterystykę lekowrażliwości szczepów *C. tropicalis* obrazuje rycina 4.5.



Rycina 4.5: Wrażliwość na leki przeciwgrzybicze *C. tropicalis*.
A — Amfoterycyna B; F — 5-fluorocytozyna; N — Nystatyna; P — Pimarycyna; C — Klotrimazol; M — Mikonazol; K — Ketokonazol; T — Tiokonazol; FL — Flukonazol; I — Itrakonazol

4.5.2.4 Lekowrażliwość *C. inconspicua*

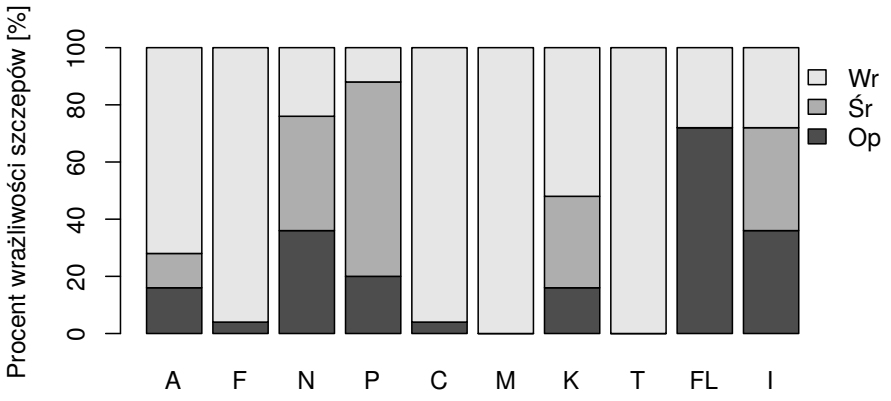
Wzrost *C. inconspicua* najczęściej był hamowany przez hodowlę w obecności tiokonazolu (w przypadku 95,45% szczepów). Najmniej skutecznie w ograniczaniu wzrostu kolonii okazały się pimarycyna, nystatyna i 5-flucytozyna (odpowiednio 68,18%, 4,55%, 13,64% opornych szczepów). Rycina 4.6 przedstawia lekowrażliwość szczepów *C. inconspicua*.



Rycina 4.6: Wrażliwość na leki przeciwgrzybicze *C. inconspicua*.
A — Amfoterycyna B; F — 5-fluorocytozyna; N — Nystatyna; P — Pimarycyna; C — Klotrimazol; M — Mikonazol; K — Ketokonazol; T — Tiokonazol; FL — Flukonazol; I — Itrakonazol

4.5.2.5 Lekowrażliwość *C. krusei*

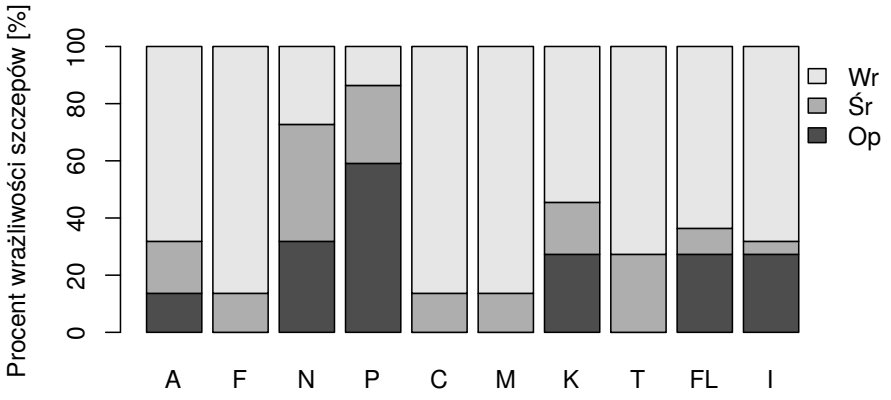
Szczepy *C. krusei* były oporne głównie na flukonazol (72% wszystkich wyhodowanych szczepów *C. tropicalis*), itrakonazol (36%) oraz nystatynę (36%). Największą wrażliwość wykazywały na hodowlę w obecności mikonazolu (100%) oraz tiokonazolu (100%). Na rycinie 4.7 zilustrowano lekowrażliwość szczepów *C. krusei*.



Rycina 4.7: Wrażliwość na leki przeciwgrzybicze *C. krusei*.
A — Amfoterycyna B; F — 5-fluorocytozyna; N — Nystatyna; P — Pimarycyna; C — Klotrimazol; M — Mikonazol; K — Ketokonazol; T — Tiokonazol; FL — Flukonazol; I — Itrakonazol

4.5.2.6 Lekowrażliwość *C. parapsilosis*

Hodowle rozpoznane jako *C. parapsilosis* wykazały się największym odsetkiem szczepów opornych na pimarycynę i nystatynę. Było to odpowiednio 59,09% i 31,82% wszystkich szczepów *C. parapsilosis*. Szczepy te natomiast w 100% wykazywały inhibicję wzrostu kolonii w obecności 5-fluorocytozyny, klotrimazolu, mikonazolu oraz tiokonazolu. Pełen opis lekowrażliwości szczepów *C. parapsilosis* znajduje się na rycinie 4.8.

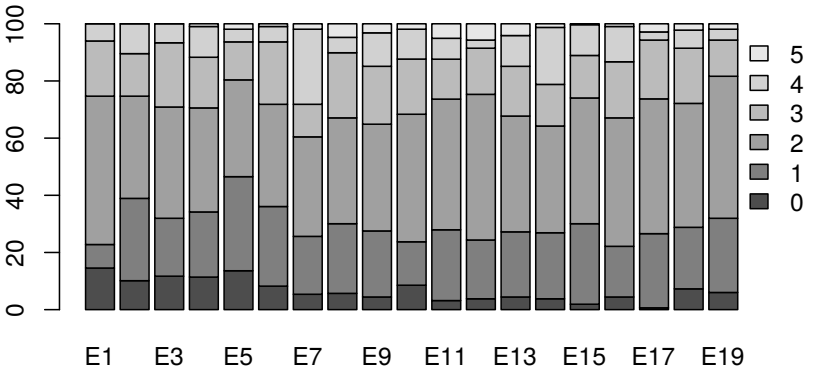


Rycina 4.8: Wrażliwość na leki przeciwgrzybicze *C. parapsilosis*.
A — Amfoterycyna B; F — 5-fluorocytozyna; N — Nystatyna; P — Pimarycyna; C — Klotrimazol; M — Mikonazol; K — Ketokonazol; T — Tiokonazol; FL — Flukonazol; I — Itrakonazol

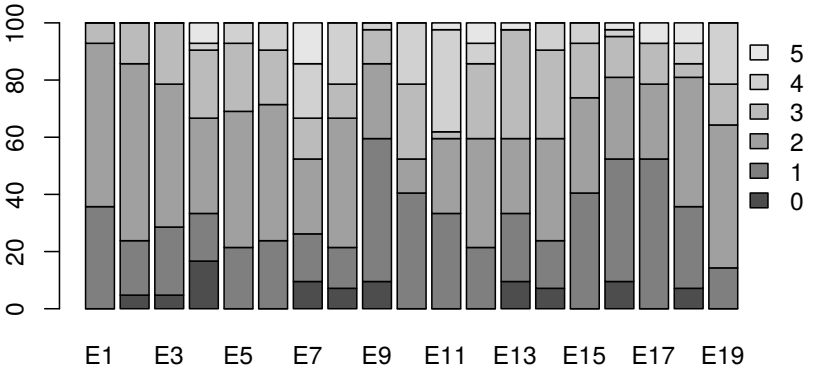
4.6 Analiza aktywności enzymatycznej grzybów drożdżopodobnych

Wyniki wykonanej analizy aktywności enzymatycznej grzybów z rodzaju *Candida* obrazują wykresy poniżej. Opis zastosowanych na wykresach oznaczeń numerycznych enzymów podanych na wykresach znajduje się w tabeli 3.

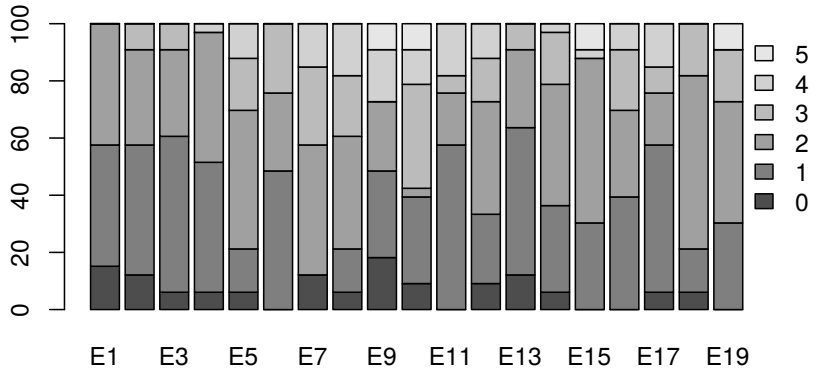
Profil aktywności enzymatycznej hydrolaz szczepów *C. albicans* badany testem BioMérieux ilustruje rycina 4.9.



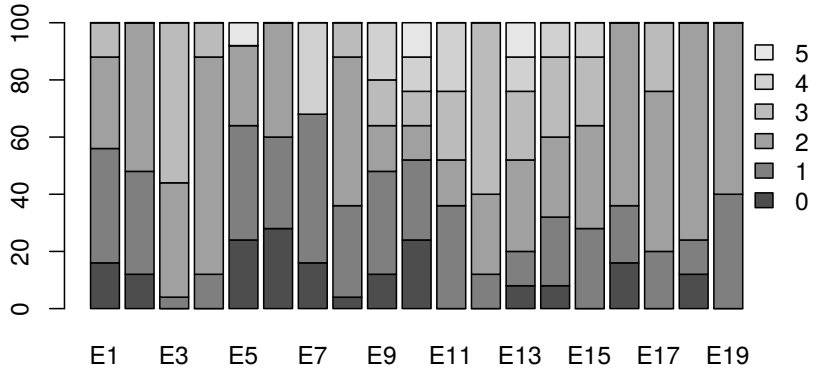
Rycina 4.9: Aktywność enzymatyczna hydrolaz szczepów *C. albicans*.
E1 — Fosfataza zasadowa; E2 — Esteraza (C4); E3 — Lipaza esterazowa (C8); E4 — Lipaza (C14); E5 — Arylamidaza leucylowa; E6 — Arylamidaza walinowa; E7 — Arylamidaza cystynowa; E8 — Trypsyna; E9 — α-chymotrypsyna; E10 — Fosfataza kwaśna; E11 — Fosfohydrolaza naftolowa-AS-BI; E12 — α-galaktozydaza; E13 — β-galaktozydaza; E14 — β-glukuronidaza; E15 — α-glukozydaza; E16 — β-glukozydaza; E17 — N-acetyl-β-glukozaminidaza; E18 — α-mannozydaza; E19 — α-fukozydaza.



Rycina 4.10: Aktywność enzymatyczna hydrolaz szczepów *C. glabrata*.
E1 — Fosfataza zasadowa; E2 — Esteraza (C4); E3 — Lipaza esterazowa (C8); E4 — Lipaza (C14); E5 — Arylamidaza leucylowa; E6 — Arylamidaza walinowa; E7 — Arylamidaza cystynowa; E8 — Trypsyna; E9 — α-chymotrypsyna; E10 — Fosfataza kwaśna; E11 — Fosfohydrolaza naftolowa-AS-BI; E12 — α-galaktozydaza; E13 — β-galaktozydaza; E14 — β-glukuronidaza; E15 — α-glukozydaza; E16 — β-glukozydaza; E17 — N-acetyl-β-glukozaminidaza; E18 — α-mannozydaza; E19 — α-fukozydaza.

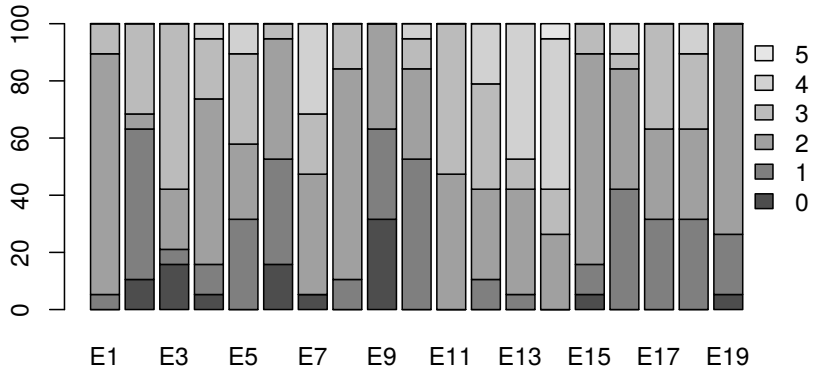


Rycina 4.11: Aktywność enzymatyczna hydrolaz szczepów *C. tropicalis*.
E1 — Fosfataza zasadowa; E2 — Esteraza (C4); E3 — Lipaza esterazowa (C8); E4 — Lipaza (C14); E5 — Arylamidaza leucylowa; E6 — Arylamidaza walinowa; E7 — Arylamidaza cystynowa; E8 — Trypsyna; E9 — α-chymotrypsyna; E10 — Fosfataza kwaśna; E11 — Fosfohydrolaza naftolowa-AS-BI; E12 — α-galaktozydaza; E13 — β-galaktozydaza; E14 — β-glukuronidaza; E15 — α-glukozydaza; E16 — β-glukozydaza; E17 — N-acetyl-β-glukozaminidaza; E18 — α-mannozydaza; E19 — α-fukozydaza.

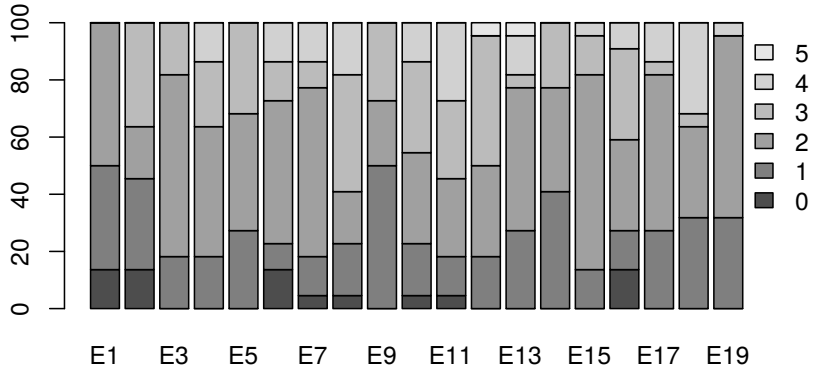


Rycina 4.12: Aktywność enzymatyczna hydrolaz szczepów *C. krusei*.
E1 — Fosfataza zasadowa; E2 — Esteraza (C4); E3 — Lipaza esterazowa (C8); E4 — Lipaza (C14); E5 — Arylamidaza leucylowa; E6 — Arylamidaza walinowa; E7 — Arylamidaza cystynowa; E8 — Trypsyna; E9 — α-chymotrypsyna; E10 — Fosfataza kwaśna; E11 — Fosfohydrolaza naftolowa-AS-BI; E12 — α-galaktozydaza; E13 — β-galaktozydaza; E14 — β-glukuronidaza; E15 — α-glukozydaza; E16 — β-glukozydaza; E17 — N-acetyl-β-glukozaminidaza; E18 — α-mannozydaza; E19 — α-fukozydaza.

W tabeli 12 uwidoczniono wartości „p” dla wykonanych testów statystycznych. W następnych sekcjach przedstawiono najistotniejsze różnice występujące między grupami.



Rycina 4.13: Aktywność enzymatyczna hydrolaz szczepów *C. inconspicua*.
E1 — Fosfataza zasadowa; E2 — Esteraza (C4); E3 — Lipaza esterazowa (C8); E4 — Lipaza (C14); E5 — Arylamidaza leucylowa; E6 — Arylamidaza walinowa; E7 — Arylamidaza cystynowa; E8 — Trypsyna; E9 — α-chymotrypsyna; E10 — Fosfataza kwaśna; E11 — Fosfohydrolaza naftolowa-AS-BI; E12 — α-galaktozydaza; E13 — β-galaktozydaza; E14 — β-glukuronidaza; E15 — α-glukozydaza; E16 — β-glukozydaza; E17 — N-acetyl-β-glukozaminidaza; E18 — α-mannozydaza; E19 — α-fukozydaza.



Rycina 4.14: Aktywność enzymatyczna hydrolaz szczepów *C. parapsilosis*.
E1 — Fosfataza zasadowa; E2 — Esteraza (C4); E3 — Lipaza esterazowa (C8); E4 — Lipaza (C14); E5 — Arylamidaza leucylowa; E6 — Arylamidaza walinowa; E7 — Arylamidaza cystynowa; E8 — Trypsyna; E9 — α-chymotrypsyna; E10 — Fosfataza kwaśna; E11 — Fosfohydrolaza naftolowa-AS-BI; E12 — α-galaktozydaza; E13 — β-galaktozydaza; E14 — β-glukuronidaza; E15 — α-glukozydaza; E16 — β-glukozydaza; E17 — N-acetyl-β-glukozaminidaza; E18 — α-mannozydaza; E19 — α-fukozydaza.

4.6.1 Różnice w aktywności enzymów *C. albicans* między grupą dzieci i dorosłych pacjentów

Pacjenci poniżej 18-tego roku życia statystycznie istotnie częściej byli zakażeni szczepami *C. albicans*, których β-glukozydaza, N-acetyl-β-glukozaminidaza oraz α-fukozydaza przejawiały większą aktywność enzymatyczną niż w grupie pacjentów dorosłych (zob. tabela 12).

4.6.2 Różnice w aktywności enzymów *C. albicans* u dzieci stosujących aparaty ortodontyczne i ze zmianami zapalnymi w jamie ustnej a dziećmi bez zmian zapalnych

Porównując grupę pacjentów leczoną ruchomymi aparatami ortodontycznymi (grupy BAZ i BA) zauważono, że u dzieci z objawami zapalenia (grupa BAZ) aktywności enzymatyczne α-chymotrypsyny i α-galaktozydazy były istotnie wyższe niż te obserwowane w szczepach *C. albicans* pobranych od pacjentów bez zmian zapalnych jamy ustnej (grupa BA). Tabela 12 ilustruje istotność wszystkich porównań.

4.6.3 Różnice w aktywności enzymów *C. albicans* u dzieci stosujących aparaty ortodontyczne i ich grupy kontrolnej

Bez względu na kryterium występowania zmian zapalnych, skonfrontowano dzieci noszące aparaty ortodontyczne (grupy BAZ i BA) z grupą kontrolną dla tych pacjentów (KA). W wyniku tego porównania zidentyfikowano następujące enzymy jako istotnie różniące się w aktywności enzymatycznej między obiema grupami (zob. tabela 12):

- Esteraza (C4)

- Arylamidaza walinowa

W porównaniu tym Esteraza (C4) i Arylamidaza walinowa miały istotnie większą aktywność enzymatyczną, kiedy próbki były pobierane od pacjentów leczonych ortodontycznie w porównaniu do tych z grupy kontrolnej.

4.6.4 Różnice aktywności enzymów *C. albicans* między pacjentami stosującymi i nie stosującymi protez płytowych

Pacjenci stosujący protezy, bez rozróżnienia na obecność zmian zapalnych w jamie ustnej (czyli grupy BP i BPZ) w porównaniu do odpowiadającej im grupy kontrolnej (grupa KP) częściej byli nosicielami szczepów *C. albicans*, które wykazały istotnie wyższą aktywność enzymatyczną następujących enzymów (zob. tabela 12):

- Fosfataza zasadowa
- Esteraza (C4)
- Lipaza (C14)
- α-mannozydaza
- α-fukozydaza

4.6.5 Różnice w aktywności enzymów *C. albicans* między pacjentami stosującymi protezy i ze zmianami zapalnymi w jamie ustnej a grupą bez zmian

Pacjenci w grupie dorosłych, stosujący protezy i mający jednocześnie klinicznie obserwowane objawy zapalenia jamy ustnej (grupa BPZ) skonfrontowani zostali, jako

nosiciele grzybów z gatunku *C. albicans*, pod względem aktywności enzymatycznej szczepów wyhodowanych z pobranych od nich próbek z grupą odpowiadającą im pod względem płci i wieku, która również nosiła protezy płytowe, lecz nie obserwowano u niej objawów zapalenia jamy ustnej (grupa BP). W porównaniu tym zaobserwowano istotne różnice w aktywności następujących enzymów (zob. tabela 12):

- Fosfataza zasadowa
- Esteraza (C4)
- Lipaza esterazowa (C8)
- Lipaza (C14)
- Arylamidaza leucylowa
- Arylamidaza walinowa
- Arylamidaza cystynowa
- Fosfataza kwaśna
- Fosfohydrolaza naftolowa-AS-B
- α-galaktozydaza
- N-acetyl-β-glukozaminidaza
- α-mannozydaza

Aktywność enzymatyczna każdego z powyższych enzymów była istotnie większa u szczepów wyhodowanych od pacjentów z grup badanych — czyli stosujących płytowe uzupełnienia protetyczne.

Tabela 12: Prawdopodobieństwo testowe dla testu U Manna-Whitneya* obrazujące istotne różnice w aktywności enzymów *C. albicans* w poszczególnych grupach badanych

	Dorośli *vs* Dzieci	BA *vs* BAZ	A[1] *vs* KA	BP *vs* BPZ	P[2] *vs* KP
E1	0.7486	1.0000	0.6757	**0.0049**	**0.0000**
E2	0.5758	1.0000	**0.0008**	**0.0019**	**0.0005**
E3	0.9414	0.2002	1.0000	0.3396	**0.0187**
E4	0.6779	1.0000	1.0000	**0.0301**	**0.0209**
E5	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	**0.0017**
E6	0.9414	0.6858	**0.0032**	1.0000	**0.0202**
E7	1.0000	1.0000	0.9455	1.0000	**0.0009**
E8	1.0000	0.6858	1.0000	0.0658	0.4979
E9	1.0000	**0.0194**	1.0000	0.5934	0.3297
E10	1.0000	0.8897	1.0000	1.0000	**0.0040**
E11	0.1558	1.0000	1.0000	1.0000	**0.0009**
E12	0.4715	**0.0001**	1.0000	1.0000	**0.0214**
E13	1.0000	1.0000	1.0000	0.4507	1.0000
E14	0.6298	1.0000	0.4872	0.5921	1.0000
E15	0.1552	1.0000	0.1082	0.4317	1.0000
E16	**0.0000**	1.0000	1.0000	0.3381	1.0000
E17	**0.0131**	1.0000	0.1787	0.2297	**0.0001**
E18	1.0000	1.0000	1.0000	**0.0211**	**0.0005**
E19	**0.0350**	1.0000	0.4872	**0.0140**	0.4372

* Dla wszystkich wartości została uwzględniona poprawka Bonferroniego z racji przeprowadzenia wielu porównań.

[1] Grupa utworzona z połączenia grup BAZ i BA.

[2] Grupa utworzona z połączenia grup BPZ i BP.
BPZ — grupa użytkowników protez ze zmianami zapalnymi jamy ustnej, BP — grupa użytkowników protez bez zmian zapalnych jamy ustnej, KP — grupa kontrolna dorosłych, BAZ — grupa użytkowników aparatów ortodontycznych ze zmianami zapalnymi jamy ustnej, BA — grupa użytkowników aparatów ortodontycznych bez zmian zapalnych jamy ustnej, KA — grupa kontrolna dzieci.
E1 — Fosfataza zasadowa; E2 — Esteraza (C4); E3 — Lipaza esterazowa (C8); E4 — Lipaza (C14); E5 — Arylamidaza leucylowa; E6 — Arylamidaza walinowa; E7 — Arylamidaza cystynowa; E8 — Trypsyna; E9 — α-chymotrypsyna; E10 — Fosfataza kwaśna; E11 — Fosfohydrolaza naftolowa-AS-BI; E12 — α-galaktozydaza; E13 — β-galaktozydaza; E14 — β-glukuronidaza; E15 — α-glukozydaza; E16 — β-glukozydaza; E17 — N-acetyl-β-glukozaminidaza; E18 — α-mannozydaza; E19 — α-fukozydaza.

4.7 Częstość występowania biotypów *C. albicans* w grupach badanych

W następnych sekcjach przedstawione zostały rozkłady biotypów *C. albicans* zgodnie z ich nomenklaturą ustaloną w sekcji 3.3.5.

4.7.1 Występowanie biotypów *C. albicans* w całej populacji badanej

Obserwowano występowanie następujących biotypów *C. albicans*:

- A 248 szczepów (78,48%)
- B 20 szczepów (6,33%)
- C 4 szczepy (1,27%)
- D 8 szczepów (2,53%)
- F 2 szczepy (0,63%)
- L 2 szczepy (0,63%)
- R 14 szczepów (4,43%)

18 szczepów nie spełniło żadnego kryterium kwalifikacji do grupy biotypowanej. Rozkład biotypów w zależności od grup badanych zaprezentowano w tabeli 13.

Tabela 13: Liczba rozpoznanych biotypów *C. albicans* w grupach badanych*

Biotyp	BPZ	BP	KP	BAZ	BA	KA
A	73	27	25	78	33	12
B	9	0	3	1	6	1
C	0	3	0	1	0	0
D	3	1	3	0	0	1
F	0	0	1	1	0	0
L	0	0	0	0	0	2
R	0	4	6	0	3	1

* Liczba szczepów *C. albicans* podlegających biotypowaniu pochodziła z próbek trzech okolic jamy ustnej i wynosiła w sumie 316 szczepów.

BPZ — grupa użytkowników protez ze zmianami zapalnymi jamy ustnej, BP — grupa użytkowników protez bez zmian zapalnych jamy ustnej, KP — grupa kontrolna dorosłych, BAZ — grupa użytkowników aparatów ortodontycznych ze zmianami zapalnymi jamy ustnej, BA — grupa użytkowników aparatów ortodontycznych bez zmian zapalnych jamy ustnej, KA — grupa kontrolna dzieci.

Rozdział 5

Dyskusja

W literaturze podaje się *C. albicans* jako najczęstszy komensal zamieszkujący jamę ustną. Jego występowanie rozpoznaje się nawet u 80% zdrowych ludzi [50] a w przypadku kandydozy jamy ustnej u 50% pacjentów [110]. Dane te są zgodne z wynikami tego badania.

W ostatnich latach zwiększyła się liczba zakażeń grzybami drożdżkowymi innymi niż *C. albicans* [111, 112] a za przyczynę tego zjawiska uważa się znaczną poprawę technik diagnostycznych, postęp w stosowanych procedurach medycznych i transplantologii [113].

Dane epidemiologiczne występowania zakażeń grzybami drożdżopodobnymi innymi niż *C. albicans* są rozbieżne i zależą w dużej mierze od populacji badanej, wieku i stanu zdrowia pacjentów badanych. Meurman *et al.* podają, że najczęściej występującymi po *C. albicans* gatunkami *Candida* w populacji starczej są *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* i *C. guillermondii* [114]. Pacjenci Kliniki w Poznaniu poza *C. albicans* najczęściej byli nosicielami *C. glabrata*. Należy zauważyć, że powyższa grupa składała się z pacjentów o pełnym przekroju wiekowym.

Badanie wykazało, że część pacjentów zakażona jest więcej niż jednym patogenem. Najczęstszą parę stanowiło równoczasowe zakażenie przez *C. albicans*

i *C. glabrata*. Tę obserwację potwierdzają badania innych autorów [115]. Najczęściej zakażenia wieloma szczepami *Candida* obserwowano w przypadku pacjentów z niedoborami odporności [116].

Poniżej przedstawiono grupy pacjentów, u których częściej obserwuje się kolonizację grzybami drożdżakopodobnymi i porównano własne obserwacje do obecnych w literaturze doniesień.

Częstość występowania kolonizacji grzybami *Candida* u pacjentów stosujących protezy wyniosła 52–57%. Te dane są zgodne z obserwacjami innych badaczy. Badając występowanie grzybów drożdżopodobnych u pacjentów zdrowych noszących protezy, Vandenbussche i Swinne [117] stwierdzili obecność *C. albicans* w 82% przypadków, *C. glabrata* w 48% przypadków a 41% pacjentów było zakażonych dwoma szczepami jednocześnie. Abbeele *et al.* rozpoznali pozytywne kolonie u 75,9% pacjentów zdrowych z pełnymi protezami dentystycznymi [118]. Powyższe przykłady ilustrują, iż ponad połowa pacjentów stosujących protezy jest skolonizowana grzybami drożdżopodobnymi.

W badaniu obserwowano częściej pozytywne hodowle grzybicze w grupach stosujących aparaty ortodontyczne niż w odpowiadających im co do płci i wieku grupach zdrowych (51%–61% *vs.* 12%–20% w zależności od miejsca izolacji). Mahmoudabadi *et al.* [119] podobnie obserwował pozytywne hodowle u 76% dzieci stosujących aparaty w porównaniu do 32% u tych, którzy nie stosowali aparatów ortodontycznych. Rożkiewicz *et al.* [120] ustalili częstość występowania kolonizacji *C. albicans* u dzieci przedszkolnej i szkolnej na poziomie 40% zdrowych dzieci.

Wykazano, że urządzenia ortodontyczne, takie jak aparaty ruchome i stałe, wpływają na zmiany w mikroflorze jamy ustnej [121].

Pierwsze badanie, które weryfikowało odsetek nosicielstwa grzybów rodzaju *Candida* u pacjentów przechodzących leczenie ortodontyczne zajmowało się grupą leczoną ruchomymi aparatami ortodontycznymi [122]. Przed wdrożeniem terapii u 39% pacjentów rozpoznano bezobjawowe nosicielstwo grzybów rodzaju *Candida*. Odsetek ten zwiększył się po 9 miesiącach stosowania ruchomych aparatów

ortodontycznych do 79% a po zaprzestaniu leczenia zmniejszył się do 14%. Należy zaznaczyć, że pacjenci w tym badaniu stosowali aparaty z płytką akrylową.

Hägg *et al.* [123] badali występowanie kolonizacji *Candida* w grupie leczonej stałymi aparatami ortodontycznymi i zaobserwowali, że po wprowadzeniu leczenia odsetek nosicieli wzrósł o 20%. Podobnie odsetek nosicieli wśród osób leczonych stałymi aparatami opisali w swoim badaniu Arslan *et al.* [124]. Po roku leczenia u 59% pacjentów rozpoznano szczepy *Candida*.

Powyższe obserwacje wskazują, że wprowadzenie ciała obcego pod postacią aparatu ortodontycznego do jamy ustnej może zwiększać ryzyko bezobjawowego nosicielstwa grzybów drożdżopodobnych ale prawdopodobnie nie jest to jedyny czynnik temu sprzyjający. Przyczyny tego zjawiska dyskutowane są w sekcji 5.

Tworzywo akrylowe, z którego wykonane są zarówno protezy jak i aparaty ortodontyczne charakteryzuje się mikroporowatą strukturą, w związku z tym łatwo gromadzą się na nim drobnoustroje. Silną adhezję do akrylu wykazuje postać micelarna grzybów, poprzez wnikanie strzępek i pseudostrzępek do mikroporów [125]. Stąd też należy objąć profilaktyką pacjentów z tego rodzaju aparatami protetycznymi i ortodontycznymi.

Badania Brusca *et al.* potwierdziły, że przyleganie *C. albicans* do powierzchni kompozytowej części ruchomych aparatów ortodontycznych było znacznie większe niż w metalowych powierzchniach aparatów stałych [126]. Uważa się, że *Candida* przylega bezpośrednio do powierzchni plastikowych tworząc cienką warstwę biofilmu [127]. Również spoiwo aparatów stałych może stanowić preferencyjne środowisko dla rozwoju *Candida* [128].

Wyniki badania wskazują, że u pacjentów z zapaleniami jamy ustnej częściej hodowane są grzyby z rodzaju *Candida*. Ta obserwacja potwierdza się w wielu niezależnych badaniach klinicznych. Tabela 8 uwidacznia, że o wiele częściej rozpoznawano objawy zakażenia jamy ustnej u osób z pozytywnymi wynikami badania mikologicznego. To sugeruje, że w dużej mierze przyczyną zapaleń jamy ustnej są grzyby.

Badacze z Jordanu [68] również obserwowali częstsze występowanie grzybów drożdżopodobnych u pacjentów z klinicznymi objawami zapalenia jamy ustnej w porównaniu z grupą bez tychże objawów. Bergendal *et. al.* [129] obserwowali ich obecność u 100% badanych pacjentów z zapaleniami (czyli istotnie częściej niż u 40% użytkowników protez bez objawów zapalenia). Dagistan [130] *et al.* obserwowali w swoim badaniu pozytywne hodowle u 68% pacjentów z zapaleniami jamy ustnej.

Głównie pacjenci, u których dochodzi do przemiany statusu *Candida* z organizmu — komensala na patogen to pacjenci z deficytami immunologicznymi. Dochodzi u nich do namnożenia liczby organizmów grzybów i wystąpienia objawów choroby [131]. W naszym badaniu nie badano stopnia upośledzenia odporności dlatego przyczyna występowania wielowalentnych zakażeń *Candida* nie może być jasno określona. Istnieje możliwość, że byli to pacjenci immunologicznie upośledzeni.

W badaniach zauważyć można bardzo różne dane dotyczące występowania nosicielstwa *Candida* u pacjentów. W dalszej części dyskutowane są możliwe przyczyny tego zjawiska. Trzeba zauważyć, że jako pierwszą przyczynę zmniejszonego odsetka rozpoznawanych w hodowli grzybów drożdżopodobnych od pacjentów leczonych ortodontycznie należy przyjąć różne metody pobierania materiału do badania mikologicznego. Arendorf i Walker porównali cztery metody: rozmaz nabłonkowy, próbki śliny, wymaz z jamy ustnej i metodę wycisku [132] uzyskując różne odsetki pozytywnych hodowli. Hägg *et al.* także weryfikowali to zagadnienie [123]. Za najczulszą uważa się posiew popłuczyn jamy ustnej [133].

Drugą przyczyną rozbieżności w ocenie rzeczywistej liczby nosicieli *Candida* są błędy techniczne w prowadzeniu i ocenie badań naukowych. Niekiedy liczebność grupy badanej może być niewystarczająca do wyciągnięcia statystycznie istotnych obserwacji, tam gdzie one występują. Okres obserwacji pacjentów stosujących leczenie ortodontyczne powinien zawierać etapy przed wprowadzeniem leczenia, w jego trakcie i ewaluację po zakończeniu leczenia. Wreszcie metody pobierania

próbek do analizy mogą nie być wystarczająco czułe, co zaburza obraz rzeczywistego występowania *Candida* u tych pacjentów prowadząc do wyłączenia rzeczywistych nosicieli.

Obniżenie pH jamy ustnej wiąże się z większą częstością występowania *Candida* [134, 135]. Z kolei po zastosowaniu ruchomego aparatu ortodontycznego notowano znaczące obniżenie w pH jamy ustnej, a po zaprzestaniu jego stosowania pH wzrastało do poprzedniego poziomu [122, 136]. Wiązało się to także z częstością i gęstością kolonizacji *Candida*, która po zaprzestaniu stosowania aparatu wracała do poziomu wyjściowego.

Używanie aparatów ortodontycznych zwiększa ilość miejsc gdzie występuje zaleganie płytki nazębnej [40, 137]. Prace Addy'iego *et al.* wskazują, że stosowanie ruchomych aparatów ortodontycznych u dzieci [136] miało taki sam wpływ na akumulację płytki nazębnej jak stosowanie protez częściowych u starszych pacjentów [138]. Brakuje jednak bezpośredniego dowodu na to, iż gorszy stan higieny jamy ustnej wpływa na zwiększenie odsetka nosicieli *Candida*. Wiadomo natomiast, iż zwiększona ilość płytki nazębnej wpływa na zwiększenie gęstości kolonizacji grzybów co opisano w sekcji 5.

W badaniu Mahmoudabadi *et al.* u pacjentów stosujących aparaty ortodontyczne znacznie częściej izolowano pozytywne hodowle pobierając ślinę do badania zamiast wymazu z aparatu [119]. W naszym badaniu nie zaobserwowano istotnych różnic co do miejsca pobrania materiału do badania u dzieci ani u dorosłych. Zarówno język, jak i podniebienie oraz aparaty lub protezy się do tego nadawały.

Uważa się, że miejscem najbardziej rzetelnym do pobrania materiału na hodowle jest tylna część języka [122, 136] gdyż właśnie z tego miejsca otrzymywano największy odsetek pozytywnych hodowli zarówno u osób zdrowych jak i leczonych.

Niezależnie od miejsca pobrania próbek, badania [122, 124, 136] zgodnie podają, że gęstość kolonizacji *Candida* zwiększa się po zastosowaniu leczenia ortodontycznego w każdej okolicy, z której pobierano wymazy.

C. albicans wykazały największą oporność na pimarycynę i nystatynę (zob. sekcja 4.5.2.1). Inni badacze podają podobne dane [139]. W badaniu Dar-Odeh *et al.* [68] badacze zaobserwowali, iż 100% szczepów *Candida* było wrażliwych na Amfoterycynę B. W naszym badaniu ta obserwacja nie potwierdziła się, a lekiem, na który było wrażliwych najwięcej szczepów *Candida* była flucytozyna. Warto wspomnieć, że oporność *C. albicans* na flucytozynę może wiązać się z opornością również na inne leki. Korting *et al.* badając populację pacjentów HIV pozytywnych określili, że im większe zaawansowanie choroby (AIDS) tym częściej obserwowano szczepy o większej oporności na leki przeciwgrzybicze. Badacze teoretyzują, że geny odpowiadające za oporność na flucytozynę mogą jednocześnie indukować oporność na inne leki przeciwgrzybicze w szczepach *Candida* [139].

Z kolei szczepy *C. glabrata* były oporne leki azolowe (zob. sekcja 4.5.2.2), co również jest znanym badaczom faktem [140]. Parkinson *et al.* twierdzą, że mechanizm, w którym *C. glabrata* prezentuje oporność na leki azolowe to usuwanie leku z komórki na drodze aktywnego transportu [141].

W badaniu obserwowano różnice w aktywności enzymów hydrolitycznych *C. albicans* u pacjentów we wszystkich grupach badanych. Co ciekawe pacjenci stosujący zarówno aparaty ortodontyczne jak i protezy płytowe częściej zarażeni byli szczepami wykazującymi większą aktywność enzymatyczną. Szczególnie dużo istotnych różnic wystąpiło w grupie osób dorosłych stosujących protezy w porównaniu do odpowiedniej dla nich grupy kontrolnej (zob. tabela 12). Ta obserwacja może tłumaczyć dlaczego obserwuje się większy odsetek nosicielstwa *C. albicans* u użytkowników protez i aparatów — szczepy u tych pacjentów są bardziej zjadliwe. Przyczyny występowania bardziej zjadliwych szczepów są natomiast trudniejsze do określenia. Być może u użytkowników protez częściej (w ciągu całego ich użytkowania) stosowane są preparaty przeciwgrzybicze i inne środki higieny jamy ustnej co prowadzi do selekcji szczepów o większej zjadliwości.

Testy aktywności enzymatycznej szczepów *Candida* są uznaną metodą badania zjadliwości grzybów i mają zastosowanie w korelowaniu klinicznej patogenności szczepów ze stadium rozwoju choroby [142]. Jednak z powodu zmieniającej się

epidemiologii *Candida* powstaje coraz więcej wątpliwości czy te klasyczne metody nadal spełniają swoją funkcję. McCullough *et al.* podważyli skuteczność metod biotypujących (w tym metody API ZYM firmy BioMérieux) podając za argumenty brak możliwości rozróżnienia dotychczas epidemiologicznie pomijalnych szczepów i małą reprodukcyjność badania [143].

Największa liczba szczepów *C. albicans* charakteryzowała się biotypem A oraz B. Te dane zgodne są z badaniami ośrodka z białostockiego [142]. Chociaż różnice w występowaniu biotypów były obserwowane w naszym badaniu pomiędzy grupami badanymi, to określenie klinicznej implikacji tego zjawiska nie było zadaniem prostym. Nie udało się jasno odpowiedzieć na pytanie: które biotypy związane są ze wzmożonym prawdopodobieństwem wystąpienia objawów infekcji grzybiczej jamy ustnej.

Opis biotypów prowadzony na podstawie aktywności 6 enzymów hydrolitycznych wydaje się być arbitralny a jego znaczenie w praktyce klinicznej może okazać się znikome. Niemniej jednak potrzebne są dalsze badania dla określenia jakie (i czy w ogóle) enzymatyczne biotypy *C. albicans* wpływają na indukcję zmian zapalnych u ich nosicieli.

Jedynym gatunkiem grzyba, dla którego udało się ustalić statystycznie istotne grupy częstszego występowania pozytywnych hodowli był *C. albicans*. Dla drugiego co do częstości — *C. glabrata* próba pozytywnych hodowli była zbyt mała aby możliwe było sformułowanie grup spełniających wymogi stawiane przez testy statystyczne. Dlatego w przypadku mniej częstych zakażeń grzybiczych grupa badana musi w przyszłości mieć większą liczebność.

Mała grupa pozytywnych mikologicznie hodowli uniemożliwiła wysunięcie wniosków na temat wrażliwości mniej częstych gatunków na działanie leków antymikotycznych i wnioskowaniu co do aktywności ich enzymów hydrolitycznych.

Występowanie zakażeń wielowalentnych wśród pacjentów grup badanych mogło zaburzyć wnioskowanie na temat tych pacjentów, gdyż efekt kliniczny nie mógł być przypisany do jednego szczepu sprawczego.

Rozdział 6

Wnioski

1. Najczęściej izolowanym grzybem drożdżopodobnym wydaje się być *C. albicans*, drugim co do częstości izolacji był *C. glabrata*. *C. albicans* najczęściej izolowano z języka. U użytkowników aparatów ortodontycznych najczęściej stwierdza się w jamie ustnej obecność grzybów drożdżopodobnych z gatunku *C. albicans*. Występowanie *C. albicans* jest częstsze w grupie osób ze zmianami zapalnymi błony śluzowej niż w grupie osób bez zmian zapalnych. U osób ze zmianami zapalnymi błony śluzowej podłoża protez całkowitych i aparatów ortodontycznych stwierdza się także inne gatunki *Candida*.

2. Istnieją różnice w aktywności enzymów hydrolitycznych *C. albicans* w porównaniu z innymi gatunkami *Candida*. Pacjenci użytkujący częściowe uzupełnienia protetyczne istotnie częściej są nosicielami szczepów wykazujących większą aktywność enzymatyczną w porównaniu z grzybami drożdżopodobnymi izolowanymi od grupy pacjentów bez uzupełnień protetycznych.

3. Istotnie częściej izoluje się grzyby drożdżopodobne u dzieci użytkujących aparaty ortodontyczne ze zmianami zapalnymi oraz bez zmian zapalnych w stosunku do grupy dzieci przed rozpoczęciem leczenia ortodontycznego.

4. U dzieci prawdopodobnie występują szczepy, które wykazują większą aktywność enzymatyczną β-glukozydazy, N-acetyl-β-glukozaminidazy i α-fukozydazy w porównaniu z grupą pacjentów dorosłych.

5. Statystycznie istotną większą aktywność enzymatyczną stwierdza się u pacjentów stosujących zarówno protezy płytowe jak i płytki ortodontyczne. Również w grupie pacjentów z klinicznie widocznymi zmianami zapalnymi jamy ustnej częściej występują szczepy z enzymami o wyższej aktywności.

UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Streszczenie

Analiza porównawcza składu jakościowego oraz lekowrażliwości grzybów drożdżopodobnych izolowanych z jamy ustnej użytkowników protez płytowych i aparatów ortodontycznych

Honorata Kubisiak-Rzepczyk

Wstęp: Użytkowanie aparatów ortodontycznych czy uzupełnień protetycznych o rozległej płycie w jamie ustnej utrudnia dostęp tlenu, samooczyszczanie przez ślinę, a poprzez wzrost wilgotności i temperatury predysponuje do rozwoju bakterii i grzybów. Kolonizacja jamy ustnej przez grzyby *Candida* jest wynikiem powstawania sprzyjających warunków zależnych od właściwości komórek grzyba, komórek nabłonka błony śluzowej oraz czynników ogólnych i miejscowych. Grzyby patogenne wydzielają enzymy hydrolityczne, które decydują o stopniu zjadliwości danego szczepu i są podstawą ich podziału na biotypy. Zdobycie wiedzy na temat głównych grup pacjentów narażonych na rozwój infekcji oraz lekooporności i zjadliwości szczepów patogennych mogłoby być podstawą do zmian obecnie obowiązujących procedur medycznych i wdrożeniu profilaktyki zapaleń jamy ustnej.

Cel: Ocena składu jakościowego oraz lekowrażliwości grzybów drożdżopodobnych izolowanych z jamy ustnej pacjentów użytkujących aparaty ortodontyczne i ruchome protezy płytowe.

Metody: Oceniono występowanie, lekooporność oraz aktywność enzymatyczną *Candida* u 300 pacjentów leczonych ortodontycznie, protetycznie oraz w odpowiednich grupach kontrolnych.

Wyniki: Najczęściej występującym gatunkiem był *C. albicans*. Kolonizację grzybami *Candida* obserwowano znacznie częściej w grupach stosujących aparaty ortodontyczne i protezy. U pacjentów z klinicznymi objawami zapalenia jamy ustnej częściej rozpoznawano w badaniu mikologicznym więcej niż jeden gatunek *Candida*. Najwięcej szczepów było opornych na pimarycynę i nystatynę. Aktywność enzymatyczna szczepów *Candida* izolowanych od pacjentów użytkujących protezy była znacznie większa niż w grupie kontrolnej.

Wnioski: Pacjenci stosujący aparaty ortodontyczne i uzupełnienia protetyczne z płytą akrylową stanowią grupę ryzyka rozwoju zapaleń jamy ustnej, z uwagi na częściej występujące u nich zakażenia grzybami *Candida*. Szczepy od nich izolowane wykazują wyższą zjadliwość co może utrudniać leczenie. Pacjenci ci powinni być pod stałą, czujną opieką lekarzy lub lekarzy dentystów.

Introduction: Use of orthodontic appliances or dentures with wide plate restricts oxygen availability self-cleansing by saliva and due to increase in humidity and temperature predisposes to growth of bacteria and fungi. Colonization of the oral cavity with *Candida* is a result of favorable circumstances, that depend on the fungal cell properties, cells of the oral mucosa and local as well as general factors. Pathogenic fungi excrete hydrolytic enzymes which determine the virulence of a strain and are used by researchers for biotyping. Gaining knowledge about main patient groups in risk of infection as well as about drug susceptibility and virulence of fungal strains could be the reason for changing medical procedures and introduction of stomatitis prophylaxis.

Aim: Analysis of prevalence and drug susceptibility of fungal strains isolated from the oral cavity of patients using orthodontic appliances or dentures.

Methods: Prevalence and drug susceptibility of *Candida* was evaluated in 300 patients either treated orthodontically, using dentures or of appropriate control group.

Results: The most frequently diagnosed species was *C. albicans*. Colonization with *Candida* was more often in groups that were using orthodontic appliances or dentures when compared to appropriate controls. Patients with clinical symptoms of stomatitis were more often diagnosed with 2 or more *Candida* species. Most strains were resistant to pimaricin and nystatin. Enzymatic activity of *Candida* strains isolated from patients using dentures was significantly higher than in the control group.

Conclusions: Patients using orthodontic appliances and dentures with acrylic plate are a group of risk of stomatitis due to more frequent *Candida* fungal infections. Strains isolated from them show increased virulence what might hinder treatment. These patients should remain under constant care of a physician or a dentist.

Bibliografia

[1] E. Oksala. Factors predisposing to oral yeast infections. *Acta Odontologica*, 48(1):71–74, 1990.

[2] A. Akpan, R. Morgan. Oral candidiasis. *Postgraduate Medical Journal*, 78(922):455–9, 2002.

[3] T. Pereira-Cenci. Development of Candida-associated denture stomatitis: new insights. *Journal of Applied Oral Science*, 16(2):86–94, 2008.

[4] P. A. Reichart. Oral mucosal lesions in a representative cross-sectional study of aging germans. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 28(5):390–398, 2000.

[5] A. Bochenek, M. Reicher. *Anatomia Człowieka*, volume 2. PZWL, Warszawa, 1988.

[6] J. Lindhe, T. Karring, M. Araújo. The anatomy of periodontal tissues. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry. Oxford: Blackwell Munksgaard*, pages 3–49, 2008.

[7] M. F. Spafford, W. M. Koch, A. L. Reed, J. A. Califano, L. H. Xu, C. F. Eisenberger, L. Yip, P. L. Leong, L. Wu, S. X. Liu, *et al.* Detection of head and neck squamous cell carcinoma among exfoliated oral mucosal cells by microsatellite analysis. *Clinical Cancer Research*, 7(3):607–612, 2001.

[8] E. Budtz-Jörgensen. Denture stomatitis III. Histopathology of trauma-and Candida-induced inflammatory lesions of the palatal mucosa. *Acta Odontologica*, 28(5):551–579, 1970.

[9] W. Bloom, D. Fawcett. *A Textbook of Histology, 12 ed.* Hodder Arnold Publication, 1998.

[10] F. Feldchtein, V. Gelikonov, R. Iksanov, G. Gelikonov, R. Kuranov, A. Sergeev, N. Gladkova, M. Ourutina, D. Reitze, J. Warren. In vivo oct imaging of hard and soft tissue of the oral cavity. *Optics Express*, 3(6):239–250, 1998.

[11] C. Squier, K. Brogden. *Human oral mucosa: development, structure and function.* John Wiley & Sons, 2011.

[12] C. A. Squier, M. J. Kremer. Biology of oral mucosa and esophagus. *JNCI Monographs*, 2001(29):7–15, 2001.

[13] L. A. Tabak. In defense of the oral cavity: structure, biosynthesis, and function of salivary mucins. *Annual Review of Physiology*, 57(1):547–564, 1995.

[14] F. C. Holsinger, D. T. Bui. Anatomy, function, and evaluation of the salivary glands. In *Salivary Gland Disorders*, pages 1–16. Springer, 2007.

[15] C. Dawes. Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. *The Journal of Physiology*, 220(3):529–545, 1972.

[16] J. K. Aps, L. C. Martens. Review: the physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Science International*, 150(2):119–131, 2005.

[17] T. Osterberg, S. Landahl, B. Hedegård. Salivary flow, saliva, pH and buffering capacity in 70-year-old men and women. correlation to dental health, dryness in the mouth, disease and drug treatment. *Journal of Oral Rehabilitation*, 11(2):157–170, 1984.

[18] C. H. Best, B. Taylor. *Physiological Basis of Medical Practice*. Williams & Wilkins, 12 ed, 1990.

[19] F. A. Scannapieco, G. Torres, M. J. Levine. Salivary α-amylase: role in dental plaque and caries formation. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 4(3):301–307, 1993.

[20] G. H. Carpenter. The secretion, components, and properties of saliva. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4:267–276, 2013.

[21] A. S. Panchbhai, S. S. Degwekar, R. R. Bhowte. Estimation of salivary glucose, salivary amylase, salivary total protein and salivary flow rate in diabetics in india. *Journal of Oral Science*, 52(3):359–368, 2010.

[22] W. Edgar. Saliva: its secretion, composition and functions. *British Dental Journal*, 172(8):305–312, 1992.

[23] F. J. Dowd. Saliva and dental caries. *Dental Clinics of North America*, 43(4):579–597, 1999.

[24] L. M. Sreebny, A. Valdini. Xerostomia. part I: Relationship to other oral symptoms and salivary gland hypofunction. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 66(4):451–458, 1988.

[25] A. N. Amerongen, J. Bolscher, E. Veerman. Salivary mucins: protective functions in relation to their diversity. *Glycobiology*, 5(8):733–740, 1995.

[26] M. Nakamura, J. Slots. Salivary enzymes. *Journal of Periodontal Research*, 18(6):559–569, 1983.

[27] G. Palaghias. The role of phosphate and carbonic acid-bicarbonate buffers in the corrosion processes of the oral cavity. *Dental Materials*, 1(4):139–144, 1985.

[28] I. D. Mandel. The functions of saliva. *Journal of Dental Research*, 66:623–627, 1987.

[29] E. De Boever, W. J. Loesche. Assessing the contribution of anaerobic microflora of the tongue to oral malodor. *Journal of the American Dental Association*, 126(10):1384–1393, 1995.

[30] J. A. Aas, B. J. Paster, L. N. Stokes, I. Olsen, F. E. Dewhirst. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11):5721–5732, 2005.

[31] S. A. Fisher-Owens, S. A. Gansky, L. J. Platt, J. A. Weintraub, M.-J. Soobader, M. D. Bramlett, P. W. Newacheck. Influences on children's oral health: a conceptual model. *Pediatrics*, 120(3):e510–e520, 2007.

[32] W. R. Jarvis. Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on candida species. *Clinical Infectious Diseases*, 20(6):1526–1530, 1995.

[33] J. Meurman, E. Siikala, M. Richardson, R. Rautemaa. Non-Candida albicans Candida yeasts of the oral cavity. *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology. Microbiology book series.*, pages 719–31, 2007.

[34] D. W. Lowman, D. A. Ferguson Jr, D. L. Williams. Structural characterization of (1→3)-β-d-glucans isolated from blastospore and hyphal forms of Candida albicans. *Carbohydrate Research*, 338(14):1491–1496, 2003.

[35] M. V. Elorza, A. Murgui, R. Sentandreu. Dimorphism in Candida albicans: contribution of mannoproteins to the architecture of yeast and mycelial cell walls. *Journal of General Microbiology*, 131(9):2209–2216, 1985.

[36] P. Sandven. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. *Acta Odontologica*, 48(1):27–36, 1990.

[37] K. A. Marr. Invasive Candida infections: the changing epidemiology. *Oncology (Williston Park, NY)*, 18(14 Suppl 13):9–14, 2004.

[38] H. Batura-Gabryel, B. Brajer, B. Kuźnar, W. Młynarczyk. Can hydrolytic activity of Candida strains isolated from copd patients change with the basic disease progression? *Postępy Dermatologii i Alergologii*, 3:148–55, 2003.

[39] S. P. Saville, A. L. Lazzell, C. Monteagudo, J. L. Lopez-Ribot. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of candida albicans during infection. *Eukaryotic Cell*, 2(5):1053–1060, 2003.

[40] R. Cannon, a.R. Holmes, a.B. Mason, B. Monk. Oral Candida: Clearance, Colonization, or Candidiasis? *Journal of Dental Research*, 74(5):1152–1161, 1995.

[41] C. S. Farah, N. Lynch, M. J. McCullough. Oral fungal infections: an update for the general practitioner. *Australian Dental Journal*, 55 Suppl 1:48–54, 2010.

[42] N. A. Gow, F. L. van de Veerdonk, A. J. Brown, M. G. Netea. Candida albicans morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nature Reviews Microbiology*, 10(2):112–122, 2011.

[43] C. A. Janeway Jr, R. Medzhitov. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 20(1):197–216, 2002.

[44] Y. Samaranayake, L. Samaranayake, P. Wu, M. So. The antifungal effect of lactoferrin and lysozyme on Candida krusei and Candida albicans. *APMIS*, 105(7-12):875–883, 1997.

[45] M. G. Netea, G. D. Brown, B. J. Kullberg, N. A. Gow. An integrated model of the recognition of Candida albicans by the innate immune system. *Nature Reviews Microbiology*, 6(1):67–78, 2008.

[46] L. Romani, A. Mencacci, E. Cenci, G. Del Sero, F. Bistoni, P. Puccetti. An immunoregulatory role for neutrophils in CD4+ T helper subset selection in mice with candidiasis. *The Journal of Immunology*, 158(5):2356–2362, 1997.

[47] C. F. d'Ostiani, G. Del Sero, A. Bacci, C. Montagnoli, A. Spreca, A. Mencacci, P. Ricciardi-Castagnoli, L. Romani. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus Candida albicans implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, 191(10):1661–1674, 2000.

[48] G. D. Brown, M. G. Netea, *et al. Immunology of fungal infections*. Springer, 2007.

[49] I. Amouri, I. Hadrich, S. Abbes, H. Sellami, A. Ayadi. [Local humoral immunity in vulvovaginal candidiasis]. In *Annales de biologie clinique*, volume 71, pages 151–155, 2012.

[50] F. Odds. *Candida and candidiasis*. Balliere Tindall, London, 1988.

[51] R. A. Calderone, W. A. Fonzi. Virulence factors of Candida albicans. *Trends in Microbiology*, 9(7):327–335, 2001.

[52] A. P. Mitchell. Dimorphism and virulence in Candida albicans. *Current Opinion in Microbiology*, 1(6):687–692, 1998.

[53] R. A. Calderone, P. C. Braun. Adherence and receptor relationships of Candida albicans. *Microbiological Reviews*, 55(1):1–20, 1991.

[54] R. D. King, J. C. Lee, A. L. Morris. Adherence of Candida albicans and other Candida species to mucosal epithelial cells. *Infection and Immunity*, 27(2):667–674, 1980.

[55] I. A. Critchley, L. J. Douglas. Isolation and partial characterization of an adhesin from Candida albicans. *Journal of General Microbiology*, 133(3):629–636, 1987.

[56] J. E. Cutler. Putative virulence factors of Candida albicans. *Annual Reviews in Microbiology*, 45(1):187–218, 1991.

[57] E. C. Webb, *et al. Enzyme nomenclature 1992. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes.* Ed. 6. Academic Press, 1992.

[58] M. Williamson, L. Samaranayake, T. MacFarlane. Biotypes of oral Candida albicans and Candida tropicalis isolates. *Medical Mycology*, 24(1):81–84, 1986.

[59] A. Kurnatowska, P. Kurnatowski. Biotypes of fungi isolated from patients with oral cavity diseases. *Mikologia Lekarska*, 5:213–7, 1998.

[60] C. G. Kumar, S. S. J. Kumar, T. Menon. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of Candida from immunocompromised patients. *Mycopathologia*, 161(4):213–218, 2006.

[61] J. R. Naglik, S. J. Challacombe, B. Hube. Candida albicans secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(3):400–428, 2003.

[62] B. Rozell, P. O. Ljungdahl, P. Martínez. Host-pathogen interactions and the pathological consequences of acute systemic Candida albicans infections in mice. *Current Drug Targets*, 7(4):483–494, 2006.

[63] A. S. Ibrahim, F. Mirbod, S. G. Filler, Y. Banno, G. T. Cole, Y. Kitajima, J. Edwards, Y. Nozawa, M. A. Ghannoum. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of Candida albicans. *Infection and Immunity*, 63(5):1993–1998, 1995.

[64] E. Baran. *Mikologia — co nowego?* Cornetis, Wrocław, 2008.

[65] M. Dynowska, E. Ejdys, *et al.* Fungi isolated from the oral cavity, nose and throat of healthy children. *Acta Mycologica*, 35(1):47–52, 2000.

[66] B. Petkowicz, M. Skiba-Tatarska, J. Wysokińska-Miszczuk. Kandydoza jamy ustnej. *Gerontologia Polska*, 14(4):160–164, 2006.

[67] M. Dąbkowska, E. Swoboda, D. Kawecki, P. Obuch-Woszczatyński, E. S. ans Mirosław Łuczak. Badanie aktywności enzymatycznej szczepów Candida iolowanych z materiałów klinicznych chorych z układową kanydozą. *Mikologia Lekarska*, 12(2), 2005.

[68] N. S. Dar-Odeh, A. A. Shehabi. Oral Candidosis in patients with removable dentures. Orale Candidose bei Gebisstragern. *Mycoses*, 46(5-6):187–191, 2003.

[69] M. Schaller, C. Borelli, H. C. Korting, B. Hube. Hydrolytic enzymes as virulence factors of candida albicans. *Mycoses*, 48(6):365–377, 2005.

[70] B. Dorocka-Bobkowska, E. Budtz-Jörgensen, S. Soch. Non-insulin-dependent diabetes mellitus as a risk factor for denture stomatitis. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 25(8):411–415, 1996.

[71] S. Lockhart, S. Joly, K. Vargas, J. Swails-Wenger, L. Enger, D. Soll. Natural defenses against candida colonization breakdown in the oral cavities of the elderly. *Journal of Dental Research*, 78(4):857–868, 1999.

[72] P. Sundstrom. Adhesion in candida spp. *Cellular Microbiology*, 4(8):461–469, 2002.

[73] G. S. Baillie, L. J. Douglas. Role of dimorphism in the development of candida albicans biofilms. *Journal of Medical Microbiology*, 48(7):671–679, 1999.

[74] J. Kapteyn, L. Hoyer, J. Hecht, W. Müller, A. Andel, A. Verkleij, M. Makarow, H. Van Den Ende, F. Klis. The cell wall architecture of candida albicans wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Molecular Microbiology*, 35(3):601–611, 2000.

[75] J. McCourtie, L. J. Douglas. Relationship between cell surface composition, adherence, and virulence of Candida albicans. *Infection and Immunity*, 45(1):6–12, 1984.

[76] M. C. Cirigliano, G. M. Carman. Isolation of a bioemulsifier from Candida lipolytica. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(4):747–750, 1984.

[77] C. Branneby, P. Carlqvist, A. Magnusson, K. Hult, T. Brinck, P. Berglund. Carbon-carbon bonds by hydrolytic enzymes. *Journal of the American Chemical Society*, 125(4):874–875, 2003.

[78] A. Mavor, S. Thewes, B. Hube. Systemic fungal infections caused by Candida species: epidemiology, infection process and virulence attributes. *Current Drug Targets*, 6(8):863–874, 2005.

[79] K. Gustafson, G. Vercellotti, C. Bendel, M. Hostetter. Molecular mimicry in Candida albicans. role of an integrin analogue in adhesion of the yeast to human endothelium. *Journal of Clinical Investigation*, 87(6):1896, 1991.

[80] C.-Y. Lan, G. Newport, L. A. Murillo, T. Jones, S. Scherer, R. W. Davis, N. Agabian. Metabolic specialization associated with phenotypic switching in Candida albicans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(23):14907–14912, 2002.

[81] M. G. Netea, R. Sutmuller, C. Hermann, C. A. Van der Graaf, J. W. Van der Meer, J. H. van Krieken, T. Hartung, G. Adema, B. J. Kullberg. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against Candida albicans through induction of IL-10 and regulatory T cells. *The Journal of Immunology*, 172(6):3712–3718, 2004.

[82] S. S. Witkin, J. Jeremias, W. J. Ledger. A localized vaginal allergic response in women with recurrent vaginitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 81(2):412–416, 1988.

[83] D. Sanglard, B. Hube, M. Monod, F. C. Odds, N. Gow. A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes SAP4, SAP5, and SAP6 of Candida albicans causes attenuated virulence. *Infection and Immunity*, 65(9):3539–3546, 1997.

[84] X. He, J. H. Meurman, K. Kari, R. Rautemaa, L. Samaranayake. In vitro adhesion of Candida species to denture base materials. *Mycoses*, 49(2):80–84, 2006.

[85] A. S. Lynch, G. T. Robertson. Bacterial and fungal biofilm infections. *Annual Reviews in Medicine*, 59:415–428, 2008.

[86] X. Yang, H. Beyenal, G. Harkin, Z. Lewandowski. Quantifying biofilm structure using image analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 39(2):109–119, 2000.

[87] V. Zijnge, M. B. M. van Leeuwen, J. E. Degener, F. Abbas, T. Thurnheer, R. Gmür, H. J. Harmsen. Oral biofilm architecture on natural teeth. *Public Library of Science One*, 5(2):e9321, 2010.

[88] R. Dillon, L. Fauci, A. Fogelson, D. Gaver III. Modeling biofilm processes using the immersed boundary method. *Journal of Computational Physics*, 129(1):57–73, 1996.

[89] J. Costerton, L. Montanaro, C. Arciola. Biofilm in implant infections: its production and regulation. *The International Journal of Artificial Organs*, 28(11):1062–1068, 2005.

[90] P. Watnick, R. Kolter. Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology*, 182(10):2675–2679, 2000.

[91] C. Beloin, J.-M. Ghigo. Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. *Trends in Microbiology*, 13(1):16–19, 2005.

[92] S. R. Gill, D. E. Fouts, G. L. Archer, E. F. Mongodin, R. T. DeBoy, J. Ravel, I. T. Paulsen, J. F. Kolonay, L. Brinkac, M. Beanan, *et al.* Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain and a biofilm-producing methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis strain. *Journal of Bacteriology*, 187(7):2426–2438, 2005.

[93] T.-F. C. Mah, G. A. O'Toole. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9(1):34–39, 2001.

[94] P. D. Marsh. Dental plaque as a biofilm and a microbial community–implications for health and disease. *BMC Oral Health*, 6(Suppl 1):S14, 2006.

[95] B. Rosan, R. J. Lamont. Dental plaque formation. *Microbes and Infection*, 2(13):1599–1607, 2000.

[96] H. Flemming, J. Wingender. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)-Part I: Structural and ecological aspects. *Water Science & Technology*, 43(6):1–8, 2001.

[97] J. Nett, L. Lincoln, K. Marchillo, R. Massey, K. Holoyda, B. Hoff, M. VanHandel, D. Andes. Putative role of β-1, 3 glucans in Candida albicans biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(2):510–520, 2007.

[98] S. P. Hawser, L. J. Douglas. Biofilm formation by Candida species on the surface of catheter materials in vitro. *Infection and Immunity*, 62(3):915–921, 1994.

[99] C. Coelho, Y. Sousa, A. Daré. Denture-related oral mucosal lesions in a brazilian school of dentistry. *Journal of Oral Rehabilitation*, 31(2):135–139, 2004.

[100] E. Budtz-Jörgensen. The significance of Candida albicans in denture stomatitis. *European Journal of Oral Sciences*, 82(2):151–190, 1974.

[101] G. Ramage, K. Tomsett, B. L. Wickes, J. L. López-Ribot, S. W. Redding. Denture stomatitis: a role for Candida biofilms. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 98(1):53–59, 2004.

[102] E. Budtz-Jörgensen, U. Bertram. Denture stomatitis I. the etiology in relation to trauma and infection. *Acta Odontologica*, 28(1):71–92, 1970.

[103] G. Ramage, J. P. Martínez, J. L. López-Ribot. Candida biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Research*, 6(7):979–86, 2006.

[104] L. Gendreau, Z. G. Loewy. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *Journal of Prosthodontics*, 20(4):251–260, 2011.

[105] B. Pietrzak-Bilińska. Grzybice jamy ustnej u dzieci leczonych ortodontycznie. *Czasopismo Stomatologiczne*, (51):125–132, 1998.

[106] T. Arendorf, D. Walker. Denture stomatitis: a review. *Journal of Oral Rehabilitation*, 14(3):217–227, 1987.

[107] Y. Kulak, A. Arikan, N. Delibalta. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 72(3):283–288, 1994.

[108] E. Spiechowicz. *Protetyka Stomatologiczna*. PZWL, Warszawa, 2010.

[109] E. Krajewska-Kułak, C. Łukaszuk, W. Niczyporuk, J. Trybuła, S. M. Enzymatic biotypes of yeast-like fungi strains and their susceptibilites to antimycotics isolated from ontocenosis of the urogenital system. *Mikologia Lekarska*, 9:67–74, 2002.

[110] G. R. Thompson III, P. K. Patel, W. R. Kirkpatrick, S. D. Westbrook, D. Berg, J. Erlandsen, S. W. Redding, T. F. Patterson. Oropharyngeal candidiasis in the era of antiretroviral therapy. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 109(4):488–495, 2010.

[111] E. G. Playford, D. Marriott, Q. Nguyen, S. Chen, D. Ellis, M. Slavin, T. C. Sorrell. Candidemia in nonneutropenic critically ill patients: risk factors for non-albicans Candida spp. *Critical Care Medicine*, 36(7):2034–2039, 2008.

[112] V. Krcmery, A. Barnes. Non-albicans Candida spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *Journal of Hospital Infection*, 50(4):243–260, 2002.

[113] M. E. Falagas, N. Roussos, K. Z. Vardakas. Relative frequency of albicans and the various non-albicans Candida spp. among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(11):e954–e966, 2010.

[114] J. H. Meurman, P. Pärnänen, C. J. Seneviratne, L. P. Samaranayake, A. M. Saarinen, K. Kari. Prevalence and antifungal drug sensitivity of non-albicans Candida in oral rinse samples of self-caring elderly. *Gerodontology*, 28(4):246–252, 2011.

[115] A. K. Pathak, N. R. Jain, R. Joshi, *et al.* Antibiogram of Candida species isolated from mono and multi-species oral candidal carriage using disk diffusion method. *Saudi Journal for Health Sciences*, 1(3):132, 2012.

[116] P. Thanyasrisung, P. Kesakomol, P. Pipattanagovit, P. Youngnak-Piboonratanakit, W. Pitiphat, O. Matangkasombut. Oral Candida carriage and immune status in thai human immunodeficiency virus-infected individuals. *Journal of Medical Microbiology*, 63(Pt 5):753–759, 2014.

[117] M. Vandenbussche, D. Swinne. Yeasts Oral Carriage in Denture Wearers. *Mycoses*, 27(9):431–435, 2009.

[118] A. Vanden Abbeele, H. de Meel, M. Ahariz, J.-P. Perraudin, I. Beyer, P. Courtois. Denture contamination by yeasts in the elderly. *Gerodontology*, 25(4):222–8, 2008.

[119] A. Z. Mahmoudabadi, D. B. Drucker, N. Mandall, K. O'Brien, E. M. Johnson, E. D. Theaker. The oral yeast flora: effect of upper removable orthodontic appliances. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 14(3):149–152, 2002.

[120] D. Rożkiewicz, T. Daniluk, M. Zaremba, D. Cylwik-Rokicka, W. Stokowska, M. Pawińska, E. Dąbrowska, G. Marczuk-Kolada, D. Waszkiel. Oral Candida albicans carriage in healthy preschool and school children. *Advances in Medical Sciences*, 51:187–190, 2005.

[121] O. Traore, V. Springthorpe, S. Sattar. A quantitative study of the survival of two species of Candida on porous and non-porous environmental surfaces and hands. *Journal of Applied Microbiology*, 92(3):549–555, 2002.

[122] T. Arendorf, M. Addy. Candidal carriage and plaque distribution before, during and after removable orthodontic appliance therapy. *Journal of Clinical Periodontology*, 12(5):360–368, 1985.

[123] U. Hägg, P. Kaveewatcharanont, Y. Samaranayake, L. Samaranayake. The effect of fixed orthodontic appliances on the oral carriage of Candida species and enterobacteriaceae. *The European Journal of Orthodontics*, 26(6):623–629, 2004.

[124] G. S. Arslan, N. Akpolat, J. D. Kama, T. Özer, O. Hamamcı. One-year follow-up of the effect of fixed orthodontic treatment on colonization by oral Candida. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 37(1):26–29, 2008.

[125] L. Samaranayake, T. MacFarlane. An in-vitro study of the adherence of Candida albicans to acrylic surfaces. *Archives of Oral Biology*, 25(8):603–609, 1980.

[126] M. Brusca, O. Chara, L. Sterin-Borda, A. Rosa. Influence of different orthodontic brackets on adherence of microorganisms in vitro. *The Angle Orthodontist*, 77(2):331–336, 2007.

[127] G. Tronchin, J. Bouchara, R. Robert, J. Senet. Adherence of Candida albicans germ tubes to plastic: ultrastructural and molecular studies of fibrillar adhesins. *Infection and Immunity*, 56(8):1987–1993, 1988.

[128] W. Sukontapatipark, M. A. El-Agroudi, N. J. Selliseth, K. Thunold, K. A. Selvig. Bacterial colonization associated with fixed orthodontic appliances. a scanning electron microscopy study. *The European Journal of Orthodontics*, 23(5):475–484, 2001.

[129] T. Bergendal, K. Holmberg, C.-E. Nord. Yeast colonization in the oral cavity and feces in patients with denture stomatitis, 2009.

[130] S. Dağistan, A. E. Aktas, F. Caglayan, A. Ayyildiz, M. Bilge. Differential diagnosis of denture-induced stomatitis, Candida, and their variations in patients using complete denture: a clinical and mycological study. *Mycoses*, 52(3):266–271, 2009.

[131] F. J. Owotade, M. Patel. Virulence of oral Candida isolated from HIV positive women with oral candidiasis and asymptomatic carriers. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 2014.

[132] T. Arendorf, D. Walker. Oral candidal populations in health and disease. *British Dental Journal*, 147(10):267–272, 1979.

[133] L. Samaranayake, T. MacFarlane, P.-J. Lamey, M. Ferguson. A comparison of oral rinse and imprint sampling techniques for the detection of yeast, coliform and Staphylococcus aureus carriage in the oral cavity. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 15(7):386–388, 1986.

[134] B. Shipman. Clinical evaluation of oral Candida in cancer chemotherapy patients. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 41(1):63–67, 1979.

[135] A. Kullaa-Mikkonen, R. Kotilainen. The prevalence of oral carriers of Candida in patients with tongue abnormalities. *Journal of Dentistry*, 11(4):313–317, 1983.

[136] M. Addy, W. Shaw, P. Hansford, M. Hopkins. The effect of orthodontic appliances on the distribution of Candida and plaque in adolescents. *Journal of Orthodontics*, 9(3):158–163, 1982.

[137] R. Calderone, S. Suzuki, R. Cannon, T. Cho, D. Boyd, J. Calera, H. Chibana, D. Herman, A. Holmes, H. Jeng, *et al.* Candida albicans: adherence, signaling and virulence. *Medical Mycology*, 38(Supplement 1):125–137, 2000.

[138] M. Addy, J. Bates. Plaque accumulation following the wearing of different types of removable partial dentures. *Journal of Oral Rehabilitation*, 6(2):111–117, 1979.

[139] H. C. Korting, M. Ollert, A. Georgii, M. Fröschl. In vitro susceptibilities and biotypes of Candida albicans isolates from the oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(12):2626–2631, 1988.

[140] C. Hitchcock, G. Pye, P. Troke, E. Johnson, D. Warnock. Fluconazole resistance in Candida glabrata. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(9):1962–1965, 1993.

[141] T. Parkinson, D. Falconer, C. Hitchcock. Fluconazole resistance due to energy-dependent drug efflux in Candida glabrata. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(8):1696–1699, 1995.

[142] C. Łukaszuk, E. Krajewska-Kułak, W. Niczyporuk. Variations of enzyme activity and biotypes of the yeast like fungi strains isolated from cancer patients. *Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku*, 50:16–19, 2005.

[143] M. McCullough, B. Ross, P. Reade. Candida albicans: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 25(2):136–144, 1996.

[144] E. Szponar, Z. Bobowicz, M. Orkiszewska. Występowanie lekooporności grzybów z rodzaju candida wyizolowanych z błony śluzowej jamy ustnej. *Dental Forum*, 1:25–29, 2005.

[145] E. Szponar. Leczenie kandydozy błony śluzowej jamy ustnej. *Lek w Polsce*, 7:21–24, 2008.

AKADEMIA MEDYCZNA IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY AKADEMII MEDYCZNEJ IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Adres :
uL. Fredry 10
61-701 Poznań

tel. (+48 61) 854-62-51, 854-60-60
fax. (+48 61) 854-61-07
www.bioetyka.amp.edu.pl

Uchwała nr 667/06

Na podstawie art. 29 ustawy z dnia 5 grudnia 1996r. o zawodzie lekarza i lekarza dentysty (t.j. Dz.U.z 2002r. Nr 21, poz.204 ze zm.), Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U. Nr 47, poz.480); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 11 marca 2005r. w sprawie szczegółowych wymagań Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz.U. Nr 57, poz. 500); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (t.j. Dz.U. z 2004r. Nr 53, poz. 533 ze zm.), kierując się Zasadami Prawidłowego Prowadzenia Badań Klinicznych – GCP – opracowanymi w oparciu o Deklarację Helsińską.

Komisja, na posiedzeniu w dniu: **18 maja 2006 r.**

rozpatrzyła wniosek, który przedstawił Pan:

prof. dr hab. Zygmunt Adamski

oraz Pani: **prof. dr hab. Elżbieta Szponar**

w sprawie prowadzenia badań w

Zakładzie Mikologii Lekarskiej i Dermatologii AM w Poznaniu oraz Klinice Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej AM w Poznaniu

Główny badacz: **mgr Honorata Kubisiak-Rzepczyk**

Temat badań: **"Analiza porównawcza składu jakościowego oraz lekowrażliwości grzybów drożdżopodobnych izolowanych z jamy ustnej użytkowników protez płytowych i aparatów ortodontycznych."**

Komisja wyraża zgodę na prowadzenie badań

Przewodniczący Komisji

Prof. dr hab. med. Zygmunt Przybylski