

Szymon Andrusiów, Zuzanna Pawlak, Iga Zendran, Magdalena Pajczkowska,
Adriana Janczura, Małgorzata Ingot

ORAL CAVITY FUNGAL FLORA AMONG HIV-POSITIVE PEOPLE

FLORA GRZYBICZA JAMY USTNEJ U PACJENTÓW ZAKAŻONYCH HIV

Wrocław Medical University, Department and Clinic of Infectious Diseases,
Liver Diseases and Acquired Immune Deficiencies
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych,
Chorób Wątroby i Nabytych Niedoborów Odpornościowych; Wrocławskie Centrum Zdrowia SPZOZ,
Ośrodek Profilaktyczno-Lecznicy Chorób Zakaźnych i Terapii Uzależnień

ABSTRACT

BACKGROUND. Immunosuppressed patients, also those who are HIV-positive patients, are susceptible to oral cavity fungal infections.

AIM OF STUDY. In this study, we aimed to show differences in qualitative composition of oral cavity flora between HIV-positive people and healthy controls and identify factors which affect fungal oral cavity flora.

MATERIALS AND METHODS. The study group contained HIV-positive people and a control group of healthy people. All cultured species were analysed using MALDI-TOF MS.

RESULTS. More HIV-positive people had two or more fungus species present than controls ($p=0.008$). Seven species were cultured in the study group compared to three in the control group. Smoking was associated with higher prevalence of *C. albicans* ($p=0.03$), *C. glabrata* ($p=0.026$), *C. tropicalis* ($p=0.01$). Dental prosthesis or braces was also associated with presence of more species ($p=0.04$). The lower level of lymphocytes CD4+ was not associated with fungus presence in oral cavity.

CONCLUSIONS. HIV infection is associated with changes to oral cavity fungal flora. Given the higher number of non-albicans species among HIV-positive patients it is important to individually choose a treatment for such patients' fungal infections. Proper oral hygiene and not smoking can reduce prevalence of fungi in oral cavity. Patients' immunological status did not have an impact on the frequency of *Candida* species isolation from the oral cavity.

Key words: HIV, *Candida*, oral cavity

STRESZCZENIE

WSTĘP. Pacjenci z immunosupresją, także ci zakażeni HIV, są szczególnie podatni na infekcje grzybicze jamy ustnej.

CEL PRACY. Badanie miało na celu ukazanie różnic w składzie jakościowym flory jamy ustnej osób HIV-dodatnich i u osób zdrowych z grupy kontrolnej oraz zidentyfikowanie czynników wpływających na obecność i skład flory grzybiczej jamy ustnej.

MATERIAŁY I METODY. Grupę badaną stanowiły osoby zakażone HIV, a grupę kontrolną stanowiły osoby zdrowe. Wszystkie wyhodowane szczepy grzybicze zostały poddane analizie gatunkowej przy pomocy metody diagnostycznej MALDI-TOF MS.

WYNIKI. Występowanie dwóch lub więcej gatunków grzybów w jamie ustnej stwierdzono częściej u osób zakażonych HIV w porównaniu z grupą kontrolną ($p=0,008$). W grupie badanej wyhodowano siedem gatunków grzybów, natomiast w grupie kontrolnej jedynie trzy gatunki. Palenie papierosów było związane z częstszym występowaniem gatunków *C. albicans* ($p=0,03$), *C. glabrata* ($p=0,026$), *C. tropicalis* ($p=0,01$). Obecność protezy zębowej lub aparatu ortodontycznego była związana z obecnością większej liczby gatunków w jamie ustnej ($p=0,04$). Obniżony poziom limfocytów CD4+ nie miał wpływu na częstsze występowanie grzybów w składzie flory jamy ustnej.

WNIOSKI. Zakażenie HIV jest związane ze zmianami składu flory grzybiczej jamy ustnej. Z powodu częstszej izolacji gatunków non-albicans wśród HIV-dodatnich pacjentów, istotne jest aby indywidualnie dobierać terapię dla tych pacjentów w przypadku infekcji grzybiczych. Odpowiednia higiena jamy ustnej oraz zaprzestanie palenia mogą zredukować występowanie grzybów w jamie ustnej. Status immunologiczny pacjenta nie ma wpływu na obecność grzybów we florze jamy ustnej.

Słowa kluczowe: HIV, *Candida*, jama ustna

BACKGROUND

The physiological flora of the oral cavity includes different bacteria and fungi making its composition complex and varied. Microorganisms start the colonisation of one's body immediately after birth. The oral cavity flora's structure changes throughout life and is influenced by oral hygiene, diets, drugs taken and host immunological function (1, 2).

Fungi from the genus *Candida* are part of natural flora existing in people's oral cavity. They can be found among healthy people as well as infected by human immunodeficiency virus (HIV) (3). Colonization of the oral cavity by yeast-like fungi is possible due to their ability to adhere to the surface of mucous membranes and is often asymptomatic (4). The most common species isolated from the oral area is *Candida albicans*. This opportunistic pathogen has a large infective potential. It normally lives on mucous membranes without affecting host well-being when a person is healthy, yet under favourable circumstances can become pathogenic (5). Other yeast-like fungi species on the mucous membranes of the oral cavity include *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* (5). Moulds rarely colonise the oral area and when found in clinical specimens are most commonly contaminants (5).

In the course of HIV infection, progressive immunosuppression can favour development of oral cavity fungal infection (6). When present in HIV-positive patients, such infection is one of the criteria of the diagnosis of AIDS (*acquired immune deficiency syndrome*). Oral and pharyngeal candidiasis belongs to clinical category B in HIV infection (symptomatic phase) (7). These infections are usually chronic, difficult to treat and significantly lower patients' quality of life. Differences in oral cavity flora composition can affect the potential treatment of the disease, especially in connection with some yeast-like fungi species' resistance to the most commonly used antifungals (8,9).

AIM OF THE STUDY

The aim of this study is to identify oral cavity fungal flora among HIV-positive people and to compare it to oral cavity flora of healthy people, as well as to assess the risk factors for the presence of different fungi species in the oral cavity in the HIV-positive and healthy people.

WSTĘP

Skład flory fizjologicznej zasiedlającej jamę ustną jest bardzo bogaty i różnorodny. Możemy tu znaleźć zarówno bakterie, jak i grzyby. Kolonizacja drożdżami rozpoczyna się zaraz po urodzeniu, a skład tej flory zmienia się przez całe życie, na co mają wpływ nawyki higieniczne, sposób odżywiania, stosowane leki, a także stopień odporności danego pacjenta (1,2).

Grzyby z rodzaju *Candida* należą do naturalnej flory zasiedlającej jamę ustną. Spotykane są zarówno u osób zdrowych, jak i zakażonych wirusem HIV (3). Kolonizacja jamy ustnej przez grzyby drożdżopodobne jest możliwa dzięki zdolności przylegania komórek grzyba do powierzchni błon śluzowych, nie powodując jednocześnie objawów chorobowych (4). Zdecydowanie najczęściej z tych miejsc izolowany jest gatunek *Candida albicans*, grzyb oportunistyczny o ogromnym potencjale chorobotwórczym, który w stanie zdrowia jedynie bytuje na błonach śluzowych, ale w sprzyjających warunkach może być przyczyną zakażeń (5). Inne gatunki grzybów drożdżopodobnych na błonach śluzowych jamy ustnej to: *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* (5). Grzyby pleśniowe niezwykle rzadko kolonizują te miejsca, w materiałach klinicznych spotykane są najczęściej jako kontaminacja (5).

W przebiegu zakażenia ludzkim wirusem niedoboru odporności postępująca immunosupresja może sprzyjać rozwojowi objawowego zakażenia grzybiczego między innymi jamy ustno-gardłowej (6). W przypadku pacjentów zakażonych wirusem HIV jest to jedno z kryteriów rozpoznania AIDS (*acquired immune deficiency syndrome*). Kandydoza jamy ustnej i gardła należy do kategorii klinicznej B w zakażeniu HIV - fazy objawowej (7). Zakażenia te mają najczęściej charakter przewlekły, są trudne do leczenia i obniżają komfort życia pacjentów. Różnice w składzie jakościowym flory grzybiczej jamy ustnej mogą mieć wpływ na późniejsze leczenie ewentualnej choroby z powodu oporności niektórych gatunków grzybów drożdżopodobnych na najczęściej stosowane leki przeciwgrzybicze (8, 9).

CEL BADANIA

Celem badania było zidentyfikowanie składu jakościowego flory grzybiczej jamy ustnej wśród osób zakażonych wirusem HIV oraz porównanie składu tej flory z florą jamy

MATERIALS AND METHODS

The results of this study are given by the empirical examinations and the survey. Smears were collected from buccal mucosa of patients without any oral lesions between October 2018 and January 2019. The study group consisted of HIV-positive patients attending infectious diseases clinics during cART (combination antiretroviral therapy), while the control group consisted of healthy people living in Wrocław County, Poland. All of the patients were in good clinical condition when the sample was obtained. Before collection, all participants signed the informed consent document agreeing to take part in the study and completed an anonymous survey providing information about their age, weight, height, oral hygiene habits, tobacco use and, in case of the study group the HIV infection details. Overall, 98 adults took part in this study: 69 with HIV infection (ages 24-72 years) and 29 healthy controls (ages 22-62 years).

Specimens were collected using a disposable sterile swab set containing transport medium. Time from smear collection to transfer to culture medium in the microbiology laboratory was no longer than 24 hours. The specimens were transferred to culture media such as Columbia Agar with 5% sheep blood (Becton Dickinson) and Sabouraud 2 with chloramphenicol (Biomerieux). After, 24 to 48 hours of Columbia Agar plate incubation in 37°C they were checked for bacteria. After 48 hours of Sabouraud Agar plates' incubation and liquid Sabouraud Broth medium at 28°C they were checked for fungi. Those plates were incubated for 10 more days and checked daily. When colony growth was present its morphology (shape and size) was assessed (Photo 1). Additionally, microscopic slides were made using Lactophenol Cotton Blue in order to assess micromorphology of the fungi (Photo 2-4). Single fungi colonies were transferred to CHROMagar Candida (Becton Dickinson) plates in order to perform the initial identification of the yeast-like fungi from *Candida* genus (Photo 5). Difficult to identify yeast-like fungi were verified by rice medium Rice Agar (Biomaxima), which enables assessment of chlamydo spores. In order to differentiate *C. albicans* from *C. dubliniensis* – both species produce green colonies on CHROMagar medium and both create chlamydo spores – the strains were cultured in 37°C and 42°C. *C. albicans* unlike *C. dubliniensis* grows well at 42°C.

To verify speciation, all of the cultured species were analysed by MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization – Time Of Flight) that uses the mass spectrometry, which is seen as a very precise and modern diagnostic tool. The results were calculated using the computer programme Statistica to verify the statistical significance.

ustnej osób zdrowych, a także ocena czynników ryzyka zasiedlania jamy ustnej przez różne gatunki grzybów, zarówno u osób zakażonych HIV, jak i zdrowych.

MATERIAŁY I METODY

Badaniu poddano 98 osób dorosłych, z czego 69 osób stanowiło grupę badaną, w wieku 24-72 lata, a 29 osób grupę kontrolną w wieku 22-62 lata. Grupą badaną byli pacjenci przychodni chorób zakaźnych, zakażeni wirusem HIV w trakcie terapii antyretrowirusowej. Grupę kontrolną stanowiły osoby zdrowe, mieszkające w powiecie wrocławskim. Wszyscy pacjenci w trakcie badania byli w dobrym stanie klinicznym. Materiałem badanym były wymazy z niezmięzionej błony śluzowej policzka pobierane od października 2018 do stycznia 2019. Przed pobraniem materiału każdy uczestnik podpisał świadomą zgodę na udział w badaniu oraz wypełniał anonimową ankietę, podając informacje na temat swojego wieku, masy ciała, wzrostu, nawyków higienicznych jamy ustnej, uzależnień oraz w przypadku grupy badanej, infekcji wirusem HIV.

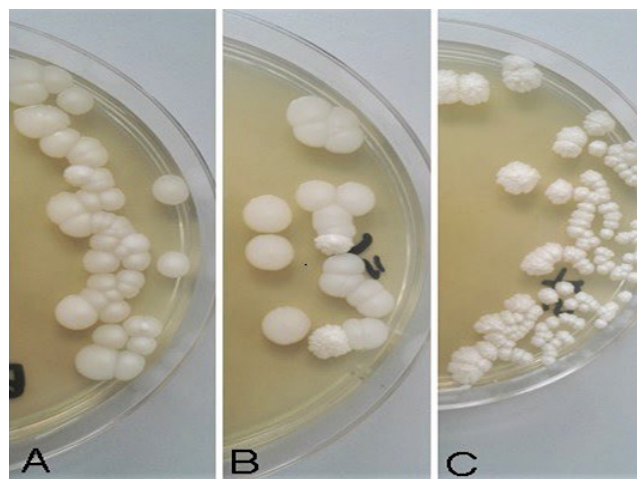


Photo 1. Morphology of fungal colonies on Sabouraud 2 with chloramphenicol medium. Priv. collection

Fot. 1. Morfologia kolonii grzybów na podłożu Sabouraud 2 z chloramfenicolem

A. *Candida albicans*; B. *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis*; C. *Candida tropicalis* and *Candida dubliniensis*

Materiał do badania pobierany był za pomocą jednorazowych, jałowych wymazówek, wyposażonych w podłoże transportowe. Następnie materiał był przekazywany do laboratorium mikrobiologicznego. Wysianie w laboratorium następowało w czasie nie dłuższym niż 24 godziny od momentu pobrania. Materiał był wysiewany na podłoże Columbia Agar z dodatkiem 5% krwi baraniej (Becton Dickinson) i płytki z podłożem Sabouraud 2 z chloramfenikolem (Biomerieux). Po 24 do 48 godz. inkubacji płytek Columbia Agar w tempe-

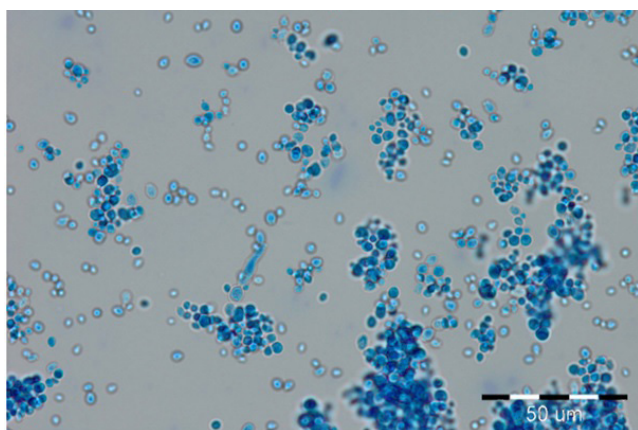


Photo 2. *Candida albicans* 40x zoom (Lactophenol Cotton Blue). Priv. collection.

Fot. 2. *Candida albicans* pow. x40 (Lactophenol Cotton Blue), zdjęcia własne

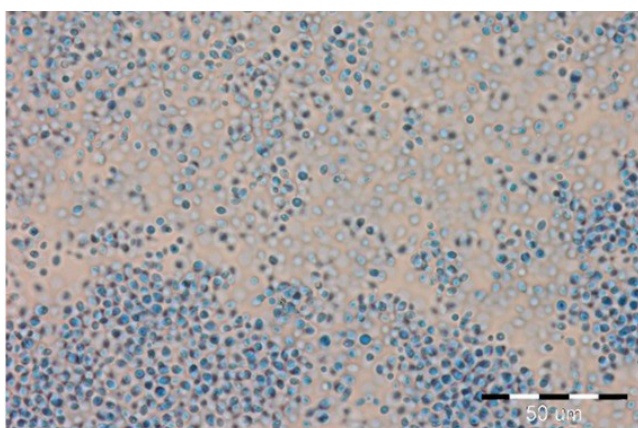


Photo 4. *Candida glabrata* 40x zoom (Lactophenol Cotton Blue). Priv. collection

Fot. 4. *Candida glabrata* pow. x40 (Lactophenol Cotton Blue), zdjęcia własne



Photo 5. Identification of yeast-like fungi on CHROMagar Candida plates. Priv. Collection

Fot. 5. Identyfikacja szczepów drożdżowych na podłożu chromogennym CHROMagar Candida. Zdjęcia własne.

raturze 37°C odczytywano wyniki posiewu w kierunku bakterii. Po 48 godzinach inkubacji płytek Sabouraud Agar i płynnego podłoża Sabouraud Broth w temperaturze 28°C odczytywano wyniki posiewu w kierunku grzybów. Płytki te inkubowano jeszcze do 10 dni i codziennie oglądano. W przypadku wzrostu oceniano morfologię kolonii grzybów (kształt, wielkość) (Fot. 1). Dodatkowo wykonano preparaty podbarwione błękitem laktofenolowym (Lactophenol Cotton Blue) celem oceny mikromorfologii grzybów (Fot. 2-4).

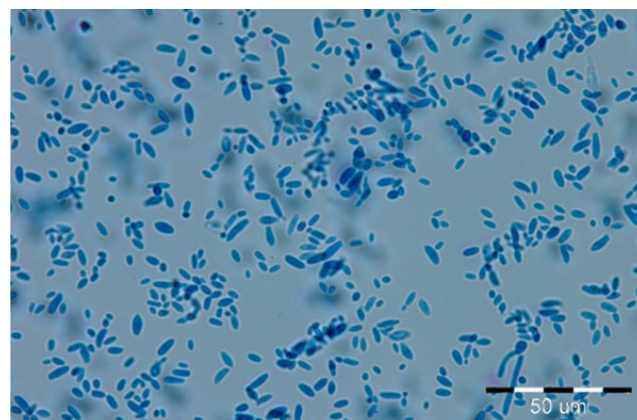


Photo 3. *Candida krusei* 40x zoom (Lactophenol Cotton Blue). Priv. collection.

Fot. 3. *Candida krusei* pow. x40 (Lactophenol Cotton Blue), zdjęcia własne

Pojedyncze kolonie grzyba posiewano na płytki z podłożem CHROMagar Candida (Becton Dickinson) w celu wstępnej identyfikacji grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida* (Fot.5). Trudne do zidentyfikowania grzyby drożdżopodobne były weryfikowane za pomocą podłoża ryżowego Rice Agar (Biomaxima) umożliwiającego ocenę chlamydospor. W celu rozróżnienia *C. albicans* od *C. dubliniensis* –obydwa gatunki wytwarzają zielone kolonie na podłożu CHROMagar, obydwie gatunki wytwarzają chlamydosporę - szczepy te hodowano w temp. zarówno 37°C jak i 42°C. *Candida albicans* w odróżnieniu od *Candida dubliniensis* dobrze wzrasta w temp. 42°C.

Wszystkie wyhodowane gatunki zostały poddane analizie za pomocą metody MALDI-TOF MS, wykorzystującej spektrometrię mas, będącą bardzo dokładnym i nowoczesnym narzędziem diagnostycznym w celu określenia przynależności gatunkowej. Wyniki opracowano pod względem istotności statystycznej za pomocą programu Statistica.

WYNIKI

Grupy badana i kontrolna nie różniły się statystycznie pod względem płci, wieku, BMI oraz liczby osób palących papierosy. W grupie badanej istotnie statystycznie częściej zgłaszano obecność protez zębowych lub aparatów ortodontycznych (Tab. I).

Table I. Basic qualities of the study group and the control group.
Tabela I. Podstawowe charakterystyki grupy badanej i grupy kontrolnej.

QUALITY	STUDY GROUP	CONTROL GROUP
Number of people	69	29
Age	24-72	22-62
Men/Women	62/7	25/4
HIV status	infected	not infected
BMI	19.4-39.1	17.5-30.2
Smokers	28	6
Braces/ Dentures	28	3

CECHA	GRUPA BADANA	GRUPA KONTROLNA
Liczebność	69	29
Wiek	24-72	22-62
Mężczyźni/Kobiety	62/7	25/4
Status zakażenia HIV	zakażeni	zdrowi
BMI	19,4-39,1	17,5-30,2
Palacze	28	6
Aparat ortodontyczny/Proteza zębowa	28	3

RESULTS

The HIV-positive patients and healthy controls did not have statistically significant differences in sex, age, BMI, cigarette smoking. In the study group, there were statistically significantly more people having braces or dentures (Table I)

In the study group, 7 yeast-like fungi species from the genus *Candida* were detected versus only 3 species found in the control group (Table II). In addition to the *Candida* genus in the study group also other fungi, such as *Rhodothorula* and *Cryptococcus* (*Cryptococcus laurenti*), were detected. There weren't detected any other species apart from *Candida* in the control group.

Moreover, there were significant differences in the frequency of isolation of the yeast-like fungi species between the study group and the control group (Fig. 1). Multiple *Candida* species were isolated from some members of both the study and control group (Fig. 2). Isolation of multiple *Candida* species was more common in the study group compared to the control group ($p=0.008$) (Fig. 2.). In the study group, *Candida albicans* was isolated from 42% of people with positive cultures (20 strains), compared to 46% of those with positive cultures in the control group (6 strains). Furthermore, within the study group, *Candida dubliniensis* was cultured from 46% of patients with positive cultures (22 strains) and in the control group it was cultured from 54% (7 grown strains) of people with positive cultures (Fig. 3). Frequency of *Candida albicans* and non-*albicans* was comparable in both groups (Fig. 4).

W grupie badanej wyodrębniono 7 gatunków grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida*, z kolei w grupie kontrolnej wyhodowano jedynie 3 gatunki (Tab. II). Oprócz rodzaju *Candida* w grupie badanej wyhodowano również inne grzyby drożdżopodobne. Był to rodzaj *Rhodothorula*, oraz rodzaj *Cryptococcus* (*Cryptococcus laurenti*). W grupie kontrolnej nie wykryto innych niż *Candida* gatunków grzybów.

Table II. Species of yeast-like fungi cultured from cheek swab.
Tabela II. Gatunki grzybów drożdżopodobnych wyhodowane z pobranych materiałów z jamy ustnej.

STUDY GROUP	CONTROL GROUP
<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Candida dubliniensis</i>
<i>Candida tropicalis</i>	-
<i>Candida krusei</i>	-
<i>Candida parapsilosis</i>	-
<i>Candida inconspicua</i>	-

Wykazano różnice w częstości izolacji grzybów drożdżopodobnych pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (Ryc. 1). W przypadku dodatniego wyniku posiewu z materiału badanego od poszczególnych pacjentów izolowano 1, 2 lub więcej gatunków grzybów (Ryc. 2). Współwystępowanie kilku gatunków grzybów stwierdzano u niektórych członków zarówno grupy badanej, jak i kontrolnej (Ryc. 2). U osób z grupy badanej zauważono statystycznie istotnie więcej przy-

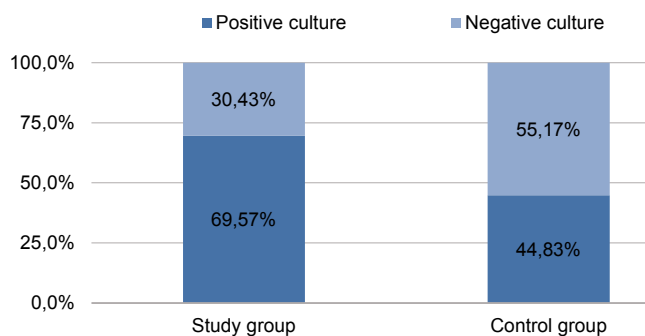


Fig. 1. Frequency of isolation of fungus among the study group and the control group.

Ryc. 1. Częstość izolacji grzybów drożdżopodobnych w grupie badanej i grupie kontrolnej.

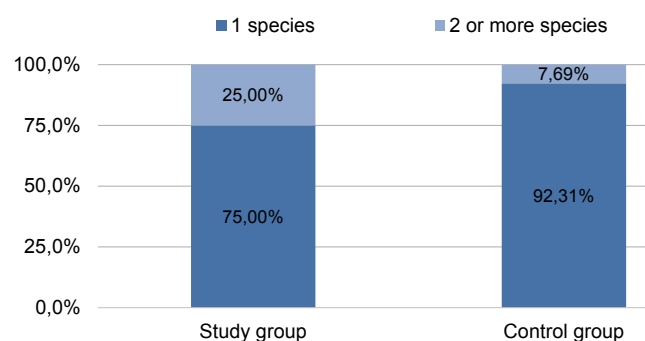


Fig. 2. Frequency of isolation of single species or multiple species colonisation in the study group and the control group.

Ryc. 2. Częstość izolacji pojedynczych lub występujących razem gatunków grzybów drożdżopodobnych w grupie badanej i grupie kontrolnej.

Smoking was a risk factor for presence of *Candida* species in the oral cavity. The study demonstrated that smoking significantly increased the frequency of the following species presence in an oral cavity: *C. albicans* ($p=0.03$), *C. glabrata* ($p=0.026$), *C. tropicalis* ($p=0.01$).

Among the study group, having braces or dentures was a risk factor for the presence of multiple (two or more) strains within one patient ($p=0.04$). CD4+ lymphocyte level did not influence the frequency or number of strains colonizing the oral cavity. Age and BMI in both groups and time of HIV infection in the study group were not significantly associated with the frequency of oral cavity colonization by fungi. Consumption of sweets and reported mouth dryness did not increase the probability of culturing fungi.

DISCUSSION

This study found numerous differences in oral fungal flora between HIV-positive patients and healthy controls. The HIV-positive patients grew significantly more different *Candida* species. Also, a considerably greater diversity of oral fungal flora was found within HIV-positive patients compared to controls.

padków współwystępujących dwóch lub więcej gatunków grzybów, co było rzadkością w grupie kontrolnej ($p=0,008$). Gatunek *Candida albicans* w grupie badanej występował u 42% osób z dodatnim posiewem (20 wyhodowanych szczepów). Dla porównania w grupie kontrolnej było to 46% (6 szczepów). W grupie badanej gatunek *C. dubliniensis* został wykryty u 46% osób z dodatnim posiewem (22 szczepy), w grupie kontrolnej *C. dubliniensis* wyhodowano u 54% (7 szczepów) osób z dodatnimi posiewami (Ryc. 3). Częstość występowania *Candida albicans* i non-albicans była porównywalna w obu grupach (Ryc. 4).

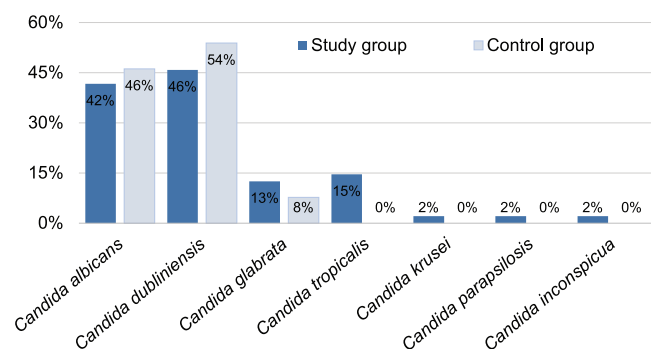


Fig. 3. Percentage of yeast-like fungi species isolation from patients with positive cultures.

Ryc. 3. Częstość występowania poszczególnych gatunków grzybów drożdżopodobnych

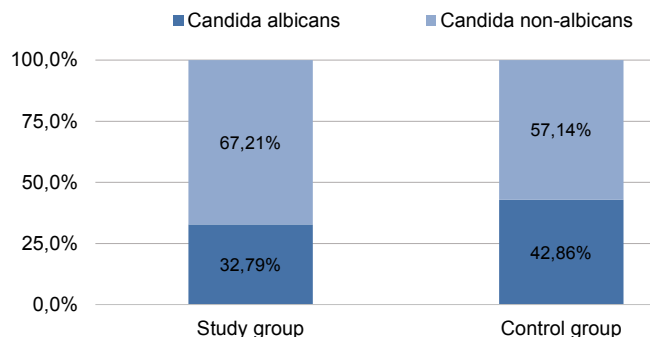


Fig. 4. Frequency of *Candida albicans* and non-albicans among all strains grown

Ryc. 4. Częstość izolacji *Candida albicans* i *Candida non-albicans* wśród wszystkich

Na podstawie ankiet przeprowadzonych wśród osób poddanych badaniu i korelacji ich z wynikami badań mikrobiologicznych stwierdzono, że czynnikiem sprzyjającym zasiedlaniu jamy ustnej przez grzyby było palenie papierosów. Wykazano, że palenie papierosów istotnie statystycznie zwiększało częstość występowania gatunków: *C. albicans* ($p=0,03$), *C. glabrata* ($p=0,026$), *C. tropicalis* ($p=0,01$). Obecność aparatu ortodontycznego lub protez zębowych u osób z grupy badanej, miała istotnie statystyczny wpływ na zwiększenie liczby szczepów wykrytych u jednego pacjenta ($p=0,04$). Poziom limfocytów CD4+ badany w ostatnim czasie u osób zakażonych nie miał wpływu

Oral cavity fungal flora in HIV/AIDS patients has not been fully explored (10). No data for this topic is available for the Polish population. Most published data originate from developing countries such as Turkey, Thailand, Brazil, India and Iran (9, 11). Their results may prove inapplicable to highly developed European countries due to different climate and socioeconomic conditions as well as unequal access to antiretroviral therapy and treatment of opportunistic infections (12). In line with other studies, our results indicate that *Candida spp.* was the most common fungi isolated from patients' oral cavity and that other species were found significantly less frequently (9, 13). This study includes precise identification of *Candida* species and confirmation and reports risk factors contributing to increased yeast-like fungi colonization of the oral cavity in HIV-positive patients.

An increased species diversity of *Candida* in HIV-positive patients demonstrated in this study is in accordance with previous findings (9,14,15). *Khedri et al.* indicate that multiple yeast-like fungi species may be isolated from HIV-positive individuals (16). This is consistent with our findings, as nine fungi species were isolated in the study group, in contrast to only three species found in the control group.

Some papers indicate a higher prevalence of *Candida albicans* compared to non-*albicans* *Candida* in asymptomatic colonization among both HIV-negative and HIV-positive people (8, 17). In contrast, we did not find a higher prevalence of *Candida albicans* in both healthy controls and HIV-positive people. A shift towards non-*albicans* *Candida* species in both infection and oral cavity fungal flora has been reported in an increasing number of studies (18, 19, 20). Still, *Candida albicans* remains the most common isolated pathogen in oral infection; however, its prevalence is not as great as observed in older studies (21).

We speculate that this shift may be due to the greater use of anti-fungal treatment as well as prophylaxis, which favors the selection of more resistant strains such as *Candida dubliniensis* (22). *Martinez et al.* described the higher occurrence of *Candida dubliniensis* in comparison to *Candida albicans* in HIV-positive patients (22). However, we found the prevalence of *C. dubliniensis* to be comparable in both the study and control groups.

Given the significant similarity of those two species, *C. albicans* and *C. dubliniensis* might be difficult to distinguish from each other using several diagnostic methods (23, 24). *Loreto et al.* and *Ells et al.* point out the importance of definitive diagnosis given its implications for antifungal treatment choice. Proper species identification is crucial as non-*albicans* *Candida* frequently have higher prevalence of antifungal resistance, necessitating a different treatment scheme (15).

na występowanie w jamie ustnej wyhodowanych gatunków grzybów częściej czy też w większej liczbie. Wiek i BMI badanych osób zarówno w grupie badanej i kontrolnej oraz czas trwania zakażenia wirusem HIV w przypadku grupy badanej nie wpływały na obecność grzybów w jamie ustnej. Jedzenie słodyczy w dużych ilościach i zgłaszane przez badane osoby odczuwanie suchości w ustach nie zwiększało prawdopodobieństwa wyhodowania grzybów.

DYSKUSJA

Przeprowadzone badania wykazały wiele różnic pomiędzy grupą badaną i grupą kontrolną. Jedną z ważniejszych była liczba gatunków grzybów z rodzaju *Candida* w poszczególnych grupach. Zdecydowanie większa różnorodność gatunków spotykana była w grupie badanej, czyli u osób zakażonych wirusem HIV.

Temat flory grzybiczej jamy ustnej wśród pacjentów HIV-dodatnich nie jest nadal w pełni zbadany (10). Brak jest danych dotyczących populacji polskiej. Większość publikacji pochodzi z krajów rozwijających się (takich jak Turcja, Tajlandia, Brazylia, Indie, Iran) (9, 11) i tym samym może być nieadekwatna w przypadku ludzi zamieszkujących tereny rozwiniętych krajów Europy. Ma to związek z innym klimatem i warunkami socjoekonomicznymi, a także, w przypadku pacjentów HIV-dodatnich, dostępnością terapii antyretrowirusowej oraz możliwością leczenia infekcji oportunistycznych (12). W niniejszej pracy wśród badanych osób najczęściej izolowano grzyby z rodzaju *Candida*, inne rodzaje izolowano dużo rzadziej, co pokrywa się z wynikami innych badań (9, 13). W pracy skupiono się na dokładnej identyfikacji gatunkowej *Candida* oraz określeniu czynników ryzyka zwiększonej kolonizacji grzybami drożdżopodobnymi jamy ustnej pacjentów zakażonych HIV.

Wykazana w badaniu większa różnorodność gatunkowa grzybów zasiedlających jamę ustną wśród osób zakażonych HIV znajduje potwierdzenie także w innych publikacjach (9, 14, 15). *Khedri i wsp.* wskazują, że w przypadku pacjentów zakażonych wirusem HIV mamy do czynienia z izolacją kilku gatunków grzybów drożdżopodobnych z materiału od jednego pacjenta, co zostało potwierdzone w naszych badaniach (16). W grupie badanej stwierdziliśmy dziewięć różnych gatunków grzybów, natomiast w grupie kontrolnej tylko trzy.

W przeciwieństwie do uzyskanych wyników, inni autorzy wykazali częste występowanie *Candida albicans*, w porównaniu do *Candida non-albicans* (8, 17). Spotykana dotychczas częstsza izolacja z jamy ustnej gatunku *Candida albicans* w porównaniu do innych gatunków rodzaju *Candida*, szczególnie u pacjentów

Some previous studies describe an active oral yeast infection instead of the colonization; however, a frequently endogenous character of such infections provides a presumption of possible preceding asymptomatic carriage (3, 9, 11, 16, 25, 26).

Teanpaisan et al. also determined a frequent occurrence of *Candida* species in the oral cavity of HIV-positive patients (25).

The lack of correlation, in this paper, between host immunological status defined by CD4+ lymphocytes count and asymptomatic yeast-like fungal oral colonization of the oral mucosa was in line with previous findings (13, 14, 27, 28). *Goulart* et al. however report an association between low CD4+ count (400-700 cells per cubic millimeter) and symptomatic oral candidiasis (29). *Kirti* found that symptomatic oral candidiasis is associated with low CD4+ count (less than 200 cells/mm³) (11).

A novel finding of this research is the occurrence of a statistically significant correlation between smoking and particular *Candida* species presence. We were unable to find similar results in previously published papers.

Consistent with findings reported by other authors, our results indicate frequent fungal colonization of the oral cavity in patients using dentures or braces (30). This might be particularly important for patients with a higher number of risk factors for fungal infections, including immunosuppression (30).

Moreover, some authors examined the connection between HIV viremia and yeast-like fungal colonization of the oral mucosa (27, 28). *Back-Brito* et al. indicated that low-level viremia affects yeast-like fungi distribution by reducing their amount in the oral cavity (27). Interestingly, others have not found any correlations between viremia levels and *Candida* carriage (28). Further studies of oral fungal flora could include measurement of HIV virus levels, to investigate this issue. Interestingly, some papers indicate that cART reduces non-albicans *Candida* species quantity (31).

Furthermore, our research implies that the age of HIV-positive patients does not increase the risk of fungal colonization, which is contrary to other studies. A larger study may be able to detect an association with age (9, 29). Additionally, our study did not assess anti-fungal resistance in yeast; further studies could determine whether antifungal resistance is associated with HIV infection or previous antifungal prophylaxis (8, 18).

CONCLUSIONS

This paper finds that HIV infection is associated with an increased diversity of oral cavity fungal flora with *Candida spp.* being the most prevalent group.

zakażonych HIV, nie została potwierdzona. Pojawia się coraz więcej prac wykazujących zmiany w etiologii infekcji drożdżakowych, a także zasiedlania jamy ustnej, w kierunku większego udziału gatunków innych niż *Candida albicans* (18, 19, 20). *Candida albicans* pozostaje nadal najczęstszym patogenem, jednak nie jest to tak znacząca przewaga, jak ta obserwowana w pracach z lat wcześniejszych (21).

Zjawisko to może mieć związek z częstszym stosowaniem leczenia i profilaktyki przeciwgrzybiczej, umożliwiającą selekcję bardziej opornych szczepów takich, jak choćby *Candida dubliniensis* (22).

Martinez i wsp. opisywali zjawisko częstszego występowania *C. dubliniensis* w stosunku do *C. albicans* u pacjentów zakażonych wirusem HIV (22). W naszych badaniach ten stosunek jest porównywalny, zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej.

Z uwagi na fakt, że te dwa gatunki są do siebie bardzo podobne, czasem trudno je diagnostycznie odróżnić, w zależności oczywiście od dysponowanych metod (23, 24). *Loreto* i wsp. oraz *Ells* i wsp. zwracają uwagę na istotę tego zagadnienia, jako podstawę późniejszej terapii zakażeń grzybiczych. Prawidłowe rozpoznanie gatunku jest bardzo istotne, ponieważ gatunki non-albicans, jako naturalnie bardziej odporne, mogą wymagać zastosowania innego schematu leczenia (15).

Niektóre z podobnych prac opisują aktywne zakażenia jamy ustnej przez drożdżaki, nie zaś jej kolonizację, jednakże częsty endogeny charakter tego typu infekcji pozwala domniemywać, że były one poprzedzone w wielu przypadkach bezobjawowym nosicielstwem. (3, 9, 11, 16, 25, 26).

Teanpaisan i wsp. także wykazali częstą kolonizację jamy ustnej przez grzyby z rodzaju *Candida* u osób zakażonych HIV (25).

Brak związku pomiędzy stanem immunologicznym pacjenta definiowanym poziomem limfocytów CD4+, a występowaniem grzybów drożdżopodobnych w jamie ustnej został potwierdzony także w innych publikacjach (13, 14, 27, 28). *Goulart* i współautorzy wskazują natomiast na występowanie korelacji między niskim poziomem CD4+ (400-700 komórek/mm³), a objawową kandydozą jamy ustnej (29). Natomiast *Kirti* wskazuje objawową kandydozę jamy ustnej jako rewelator niskiego poziomu CD4+ (<200 komórek/mm³) (11).

W prezentowanej pracy wykazano istotny statystycznie związek pomiędzy paleniem papierosów i obecnością wybranych gatunków *Candida*, czego nie udało się odnaleźć w literaturze polskiej ani światowej.

W naszej pracy wykazano częste przypadki kolonizacji jamy ustnej u osób noszących protezy zębowe, na co również zwracają uwagę inni autorzy (30). Jest to szczególnie istotne u osób obciążonych innymi czyn-

Increased prevalence of *Candida non-albicans* was observed in HIV-positive patients and healthy controls. This may cause therapeutic failure due to increased resistance in some non-albicans species to empiric antifungal treatment, especially in immunosuppressed patients, who are prone to fungal infections (8, 22, 32). Smoking and denture use further increased *Candida spp.* prevalence in the oral cavity. Accordingly, smoking cessation and proper oral hygiene may prevent oral candidiasis. Patients' immunological status did not have an impact on the frequency of *Candida* species isolation from the oral cavity.

REFERENCES

1. Samaranayake L, Matsubara V H. Normal Oral Flora and the Oral Ecosystem. *Dent Clin North Am* 2017;61(2):199-215.
2. Dzierżanowska D. Mikroflora fizjologiczna człowieka. Opieka paliatywna nad dziećmi 2009; Tom XVII.
3. Grzybicze zapalenie jamy ustnej (www.mp.pl/otolaryngologia)https://www.mp.pl/otolaryngologia/gardloikrtan/jama_ustna/107527,grzybicze-zapalenie-jamy-ustnej.html?fbclid=IwAR10HvijBOXev3tv8Dr6qDa_DzjHsOSVmVv2jaVJzjRnAmoWJM7IO9c2rpY.
4. Cannon RD, Holmes AR, Mason AB, et al. Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis? *J Dent Res* 1995;74(5):1152-1161.
5. Heczko P, Wróblewska M, Pietrzyk A. *Mikrobiologia Lekarska*. Wydawnictwo PZWL Warszawa 2014;415-418, 431-433, 685-689.
6. Fay VDS, Gregianini TS, Veiga ABGD, et al. A 12-year study of fungal infections in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Rev Iberoam Micol* 2019;36(2):55-60.
7. Gąsiorowski J, Szetela B, Knysz B, et al. *Interna Szczeklika* 2019;2453-2465.
8. Osaigbovo II, Lofor PV, Oladele RO. Fluconazole Resistance among Oral *Candida* Isolates from People Living with HIV/AIDS in a Nigerian Tertiary Hospital. *J Fungi Basel* 2017.
9. Hosain PA, Salari S, Ghasemi NAP. Oropharyngeal candidiasis in HIV/AIDS patients and non-HIV subjects in the Southeast of Iran. *Curr Med Mycol* 2018;4:1-6.
10. Podlasin RB, Drapalo A, Olczak A, et al. Opportunistic infections and other AIDS - defining illnesses in Poland in 2000-2002. *Infection* 34. 2006(4).
11. Kirti YK. Prevalence of Oral Candidiasis in Indian HIV Sero-Positive Patients with CD4+ Cell Count Correlation. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg* 2019;71(1):124-127.

nikami ryzyka zakażeń grzybiczych, jak immunosupresja (30).

Niektórzy autorzy badali także związek wiremii z kolonizacją jamy ustnej przez grzyby drożdżopodobne (27, 28). Niska wiremia HIV według *Back-Brito* i współautorów miała wpływ na mniej liczne występowanie drożdżaków (27). W przyszłości planując tego typu badania, warto byłoby zbadać dodatkowo wiremię HIV w celu zweryfikowania tych wyników.

Co ciekawe, istnieją też prace, które zaprzeczały związkowi pomiędzy wiremią HIV i nosicielstwem *Candida* (28).

Niektórzy autorzy wykazali skuteczność terapii cART w zmniejszaniu kolonizacji gatunkami non-albicans (31).

Nasze badania wskazują, że wiek osób zakażonych HIV nie zwiększał ryzyka kolonizacji, co jest sprzeczne z wynikami innych autorów, w związku z czym powiększenie grupy badanej mogłoby rozstrzygnąć tę niezgodność (9, 29). Ponadto badana przez niektórych autorów oporność drożdży na leki przeciwgrzybiczne jest ważnym aspektem i powinna być dokładniej przeanalizowana (8, 18).

WNIOSKI

Zakażenie HIV jest czynnikiem predysponującym do zasiedlania jamy ustnej zróżnicowaną florą grzybiczą. Największy udział ma *Candida spp.* Coraz częściej spotykane są *Candida non-albicans*, mające naturalnie większą oporność na zlecane empirycznie leki przeciwgrzybiczne (8, 22, 32). Może to stwarzać problemy terapeutyczne u pacjentów będących w immunosupresji i tym samym narażonych na częstsze występowanie infekcji. Palenie papierosów i protezy ortodontyczne są dodatkowymi czynnikami zwiększającymi częstość występowania *Candida spp.* w jamie ustnej. W związku z tym zaprzestanie palenia i dbałość o higienę jamy ustnej mogą być działaniami profilaktycznymi kandydozy jamy ustnej. Stan immunologiczny nie był czynnikiem ryzyka zwiększającym częstość izolacji *Candida spp.* z jamy ustnej.

PODZIĘKOWANIA

Podziękowania dla Weroniki Rymer, Bartosza Szeteli i Jacka Gąsiorowskiego za pomoc przy przeprowadzeniu badania.

12. Yang Y, Lo H, Hung C, et al. *BMC Infectious Diseases* - Effect of prolonged HAART on oral colonization with *Candida* and candidiasis.

13. Sharifzadeh A, Khosravi AR, Shokri H, et al. Oral microflora and their relation to risk factors in HIV+ patients with oropharyngeal candidiasis. *J Mycol Med* 2013;23:105-112.
14. Erköse G, Erturan Z. Oral Candida colonization of human immunodeficiency virus infected subjects in Turkey and its relation with viral load and CD4+ T-lymphocyte count. *Mycoses* 2007;50:485-490.
15. Loreto ES, Scheid LA, Nogueira CW, et al. Candida dubliniensis: epidemiology and phenotypic methods for identification. *Mycopathologia* 2010;169(6):431-43.
16. Khedri S, Santos ALS, Roudbary M, et al. Iranian HIV/AIDS patients with oropharyngeal candidiasis: identification, prevalence and antifungal susceptibility of Candida species. *Lett Appl Microbiol* 2018;67(4):392-399.
17. Paula SB, Morey AT, Santos JP, et al. Oral Candida colonization in HIV-positive patients in Londrina-PR, Brazil: antifungal susceptibility and virulence factors. *J Infect Dev Ctries* 2015;9: 1350-1359.
18. Krcmery V, Barnes A J, Non-albicans Candida spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect* 2002;50(4):243-60.
19. Friedman DZP, Schwartz IS. Emerging Fungal Infections: New Patients, New Patterns, and New Pathogens. *J Fungi* 2019;5(3):67.
20. Ngouana TK, Toghueo RMK, Kenfack IF, et al. Epidemiology and antifungal susceptibility testing of non-albicans Candida species colonizing mucosae of HIV-positive patients in Yaoundé (Cameroon). *J Mycol Med* 2019;1156-5233.
21. Sah P, Patel P, Chandrashekar C, et al. Oral candidal carriage correlates with CD4+ cell count but not with HIV and highly active antiretroviral therapy status. *J Invest Clin Dent* 2019.
22. Martinez M, López-Ribot JL, Kirkpatrick WR, et al. Replacement of Candida albicans with C. dubliniensis in human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis treated with fluconazole. *J Clin Microbiol* 2002;40(9):3135-3139.
23. Coleman D, Sullivan D, Harrington B, et al. Molecular and phenotypic analysis of Candida dubliniensis: A recently identified species linked with oral candidosis in HIV-infected and AIDS patients. *Oral Diseases* 1997;3:96-101.
24. Hazen KC, Wu JG, Masuoka J. Comparison of the Hydrophobic Properties of Candida albicans and Candida dubliniensis. *Infection and Immunity* 2001;69(2):779-786.
25. Teanpaisan R, Nittayananta W. Prevalence of Candida species in AIDS patients and HIV-free subjects in Thailand. *J Oral Pathol Med* 1998;27:4-7.
26. Nittayananta W. Oral fungi in HIV: challenges in antifungal therapies. *Oral Dis* 2016;22: 107-113.
27. Back-Brito GN, Mota AJ, Vasconcellos TC, et al. Frequency of Candida spp. in the oral cavity of Brazilian HIV-positive patients and correlation with CD4 cell counts and viral load. *Mycopathologia* 2009;167:81-87.
28. Costa CR, Cohen AJ, Fernandes OF, et al. Asymptomatic oral carriage of Candida species in HIV-positive patients in the highly active antiretroviral therapy era. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2006;48:257-261.
29. Goulart LS, Souza WWR, Vieira CA, et al. Oral colonization by Candida species in HIV-positive patients: association and antifungal susceptibility study. *Einstein Sao Paulo* 2018;16.
30. Mothibe JV, Patel M. Pathogenic characteristics of Candida albicans isolated from oral cavities of denture wearers and cancer patients wearing oral prostheses. *Microb Pathog* 2017;110:128-134.
31. Lam-Ubol A, Rungsiyanont S, Vacharotayangul P, et al. Oral manifestations, salivary flow rates and Candida species in Thai HIV-positive patients. *J Clin Exp Dent* 2019;11(2).
32. Kirkpatrick WR, Revankar SG, Mcatee RK, et al. Detection of Candida dubliniensis in Oropharyngeal Samples from Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients in North America by Primary CHROMagar Candida Screening and Susceptibility Testing of Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 1998;36(10):3007-3012.

Received: 13.12.2019

Accepted for publication: 10.02.2020

Otrzymano: 13.12.2019 r.

Zaakceptowano do publikacji: 10.02.2020 r.

Adres do korespondencji:

Address for correspondence:

Zuzanna Pawlak

ul. Cicha 25a, 55-095 Siedlec

tel. 666-275-395

z.pawlak95@gmail.com