Archive of SID

بررسی سرم بیماران مبتلا به واژینیت حاد و مزمن از نظر IgE و IgG اختصاصی نسبت به کاندیدا آلبیکانس با روش ایمونوبلاتینگ

محمدتقي هدايتي(Ph.D.)* حميد بدلي (M.Sc)** فرزانه واشقاني فراهاني (M.D.)***
سيدرضا عقيلي (M.Sc.)**** رضاعلي محمدپور (Ph.D.)*****

چکیده

سابقه و هدف: کاندیدا آلبیکانس از میکروفلورهای محیط واژن می‌باشد. نحوه واکنش به اجزاء آنتی‌ژنی کاندیدا آلبیکانس در بیماران مختلف، متفاوت بوده و احتمالاً در سیر بالینی بیماری می‌تواند نقش تعیین کننده‌ای داشته باشد؛ لذا در مطالعه حاضر آنتی‌بادی‌های IgE و IgG ایجاد شده برعلیه کاندیدا آلبیکانس در سرم بیماران مبتلا به واژینیت حاد و مزمن کاندیدایی و غیرکاندیدایی با روش ایمونوبلاتینگ مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: کاندیدا آلبیکانس در محیط سابورو دکستروز آگار کشت داده شد. سلول‌های مخمری از سطح کشت جمع‌آوری گردید. پس از شکستن سلول‌های مخمری، نمونه‌ها سانتریفوژ گردید (دور ۲۵۰۰۰ به مدت ۱/۵ ساعت). قسمت روی محلول به عنوان عصاره خام جدا گردید. سپس عصاره خام با روش SDS-PAGE از نظر پروتئین تفکیک گردید. پس از انتقال پروتئین‌های تفکیک شده به صفحه نیتروسلوز، اجزاء پروتئینی با سرم‌های بیماران مورد مطالعه مجاور شدند و باندهای پاسخ دهنده به IgE و IgG با آنتی‌بادی‌های ضد IgE و IgG انسانی که به وسیله آنزیم، نشان دار شده بود در یک سوبسترای رنگی نمایان شد.

یافته ها: در SDS-PAGE تعداد ۱۵ باند پروتئینی مختلف با وزن مولکولی بین ۷۵-۱۳ کیلودالتون شناسایی شد. در ایمونوبلاتینگ، هیچ‌کدام از باندهای پروتئینی با IgE اختصاصی واکنشی نشان نداد. اما باندهای پروتئینی با وزن‌های مولکولی ۲۵ و ۵۲ کیلو دالتون با IgG سرم‌های به دست آمده از بیماران مبتلا به واژینیت مزمن کاندیدایی در ۱۰۰ درصد موارد واکنش قوی نشان دادند. در صورتی که ۱۰۰ درصد بیماران مبتلا به واژینیت حاد کاندیدایی تنها با باند پروتئینی ٤٧ کیلو دالتون، واکنش قوی نشان دادند و ۵۵ درصد بیماران مبتلا به واژینیت مزمن غیرکاندیدایی تنها به باند ٤٧ کیلو دالتون، واکنش ضعیف نشان دادند.

استنتاج: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که آنتی‌بادی IgG ضد کاندیدایی بر علیه باندهای پروتئینی ۲۵ و ۵۲ کیلو دالتون می‌تواند با دوره‌های مزمن و پاسخ نیرومند با آنتی‌ژن ٤٧ کیلو دالتونی با شکل حاد واژینیت کاندیدایی در ارتباط باشد؛ لذا آشکار ساختن این باندهای پروتئینی در بیماران مبتلا به واژینیت مزمن و حاد می‌تواند از راه‌کارهای تشخیصی ولوو واژینیت مزمن و حاد باشد.

واژه هاي كليدي: کاندیدا آلبیکانس، واژینیت، IgE، ایمونوبلاتینگ

این تحقیق طی شماره ٤٩- ٨٠ در شورای پژوهشی دانشگاه ثبت شده وبا حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شده است .

* دکترای قارچ شناسی و انگل شناسی پزشکی عضو هیأت علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران ✉ ساری: خیابان وصال شیرازی- دانشکده بهداشت
** دانشجوی کارشناسی ارشد قارچ شناسی دانشکده پزشکی علوم پزشکی مازندران *** متخصص زنان و زایمان- عضوهیأت علمی(استادیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران
**** کارشناسی ارشد قارچ شناسی و انگل شناسی پزشکی، عضو هیأت علمی، (مربی) دانشگاه علوم پزشکی مازندران
***** دکترای آمار حیاتی، عضو هیأت علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران

تاریخ دریافت : ۸۲/٦/۱۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۸۲/۹/۸ تاریخ تصویب : ۸۳/۲/۲

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

واژینیت یکی ازمسائل شایع در طب بالینی است که باعث ابتلاء سالانه ۵ تا ۱۰ میلیون نفر می‌شود(۱). یکی از انواع مهم این عارضه، ولوو واژینیت کاندیدایی[1] است که در برخی از کشورها اولین علت واژینیت‌های عفونی را تشکیل می‌دهد(۲). مطالعات نشان داده است که ۷۵ درصد خانم‌ها حداقل یک بار در طول زندگی به این عارضه مبتلا می‌شوند(۲). از بغرنج‌ترین حالات ولوو واژینیت کاندیدایی، اشکال عود کننده آن می‌باشد که در ۲۰ تا ۲۵ درصد خانم‌ها بعد از هر دوره درمان مجدداً خود را نشان می‌دهد(۳).

کاندیدا آلبیکانس از میکروفلورهای محیط واژن می‌باشد که در صورت وجود شرایط مناسب می‌تواند در ایجاد واژینیت‌های عود کننده (RVVC)[2] دخالت داشته باشد. در موارد کمی، عوامل مساعد کننده‌ای نظیر دیابت، نقص سیستم ایمنی، کاربرد آنتی‌بیوتیک و کورتیکواستروئید، علت عود بیماری می‌باشند. متأسفانه، در اکثر مواقع عامل خطر خاصی برای عود بیماری تعیین نشده است(٤). در سالیان اخیر توجه زیادی به نقش احتمالی حساسیت به آنتی‌ژن‌های کاندیدا آلبیکانس به ویژه IgE ایجاد شده بر علیه آن، در بروز ولوواژینیت کاندیدایی مزمن شده است(٦،٥). در مطالعه Giraldo و همکاران(۲۰۰۰) مشخص شده است که برخی از بیماران مبتلا به واژینیت‌های مزمن و عود کننده نسبت به آنتی‌ژن‌های کاندیدا آلبیکانس، افزایش حساسیت نشان می‌دهند(۷). در مطالعه Witkinو همکاران (۱۹۸۹) افزایش ائوزینوفیل و آنتی‌بادی IgE در ترشحات واژن زنان مبتلا به RVVC مشخص گردید و همچنین اظهار شده است که آنتی‌بادی IgE ضد کاندیدا در ترشحات این دسته از بیماران، سبب افزایش حساسیت موضعی می‌شود(۵). در مطالعه‌ای دیگر همین محققین (۱۹۸۸) نشان دادند که واکنش‌های حساسیتی، علایم را طولانی و ابتلاء به عفونت مجدد را مستعد می‌نمایند(٦). در مطالعه Ishiguro وهمکاران(۱۹۹۲) بر روی سرم بیماران مبتلا به واژینیت کاندیدایی، IgE اختصاصی بر علیه کاندیدا آلبیکاس مشاهده نگردید؛ درحالی‌که آنتی‌بادی‌های IgG ، IgA و IgM اختصاصی بر علیه کاندیدا آلبیکانس تشخیص داده شد(۸). اهمیت واکنش‌های حساسیتی القاء شده به وسیله کاندیدا آلبیکانس به نحو بسیار جالبی در مطالعه Moraes و همکاران (۲۰۰۰) نشان داده شده است. در این مطالعه با ایمنی درمانی برعلیه کاندیدا آلبیکانس در بیماران مبتلا به RVVC که به هیچ‌گونه درمان دارویی پاسخ نمی‌دادند، بیش‌تر از ۹۰ درصد علایم، بهبود یافت(۹).

درمطالعات محققین‌مختلف با روش ایمونوبلاتینگ مشخص گردیدکه‌کاندیدا آلبیکانس دارای اجزا آنتی‌ژنی متعددی میباشد[1] به‌طوری که در اشکال مختلف کاندیدیاز، آنتی‌بادی علیه اجزا خاصی از آن آشکار می‌شود(۱۰ تا ۱۲). لذا درمطالعه حاضر با ایمونوبلاتینگ علاوه بر جست و جوی آنتی‌بادی‌های IgE و IgG بر علیه کاندیدا آلبیکانس در سرم بیماران مبتلا به واژینیت حاد و مزمن، نحوه پاسخ اجزاء آنتی‌ژنی کاندیدا آلبیکانس به این آنتی‌بادی‌ها نیز مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

بیماران مورد بررسی در مطالعه حاضر به طریق نمونه‌برداری مستمر[3] انتخاب شدند. بیماران مراجعه کننده به درمانگاه زنان بیمارستان فاطمه‌الزهرا(س) و

1. Vulvo Vaginal Candidasis
2. Recurrent Vulvo Vaginal Candidiasis

3. Sequential sampling

www.SID.ir

Archive of SID

درمانگاه شماره ۸ دانشگاه علوم پزشکی مازندران که دارای مشکل واژینیت بودند به وسیله متخصص زنان و زایمان مورد معاینه قرار گرفته و براساس معیار ارائه شده به وسیله جانان برگ و همکاران در دو گروه واژینیت حاد و مزمن قرار گرفتند(۱۳). افراد مبتلا به دیابت و یا در حال مصرف داروهای استروئیدی از مطالعه خارج شدند. سپس با استفاده از سواپ مرطوب استریل از ترشحات واژینال نمونه‌برداری به عمل آمد و در آزمایشگاه با روش آزمایش مستقیم و کشت از نظر نوع واژینیت میکربی مورد مطالعه قرار گرفت. بیمارانی که از نظر تریکوموناس و عوامل باکتریایی در روش‌های آزمایشگاهی مثبت بودند از مطالعه خارج شدند و نمونه‌های مثبت از نظر کاندیدا با روش کشت در محیط کورن- میل آگار+ توین ۸۰ و همچنین آزمون لوله زایا از نظر وجود کاندیدا آلبیکانس تأیید شده و نمونه‌های غیر کاندیدا آلبیکانس نیز از مطالعه خارج شدند و براساس نتیجه آزمایشگاهی، بیماران در چهار گروه ۲۰ نفره طبقه‌بندی شدند: الف- بیماران مبتلا به واژینیت حاد کاندیدایی (ACV)[1] ب- بیماران مبتلا به واژینیت حاد غیر میکروبی (ANV)[2] ج- بیماران مبتلا به واژینیت مزمن کاندیدایی (CCV)[3] د- بیماران مبتلا به واژینیت مزمن غیر میکروبی (CNV)[4]. لازم به ذکر می‌باشد که بیماران مبتلا به واژینیت غیرمیکروبی افرادی بودند که در روش‌های آزمایشگاهی فاقد هرگونه عامل میکروارگانیسمی بودند. همچنین از تمامی بیماران به میزان 5^{cc} خون‌گیری به عمل آمد که پس از جداسازی سرم آن‌ها تا زمان اجرای فعالیت‌های بعدی در فریزر 20^{oc}- نگهداری گردید.

تهیه عصاره خام از کاندیدا آلبیکانس :

کاندیدا آلبیکانس جدا شده از ترشحات واژینال بیمار مبتلا به واژینیت کاندیدایی، ابتدا در محیط سابورودکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل (۵۰ میلی‌گرم در یک لیتر) به صورت انبوه کشت داده شد. سپس سوسپانسیون غلیظی از مخمر در آب مقطر استریل تهیه گردید و برای جداسازی عوامل اضافی، عمل شست و شوی مخمر انجام گردید، بدین ترتیب که سوسپانسیون حاوی سلول‌های مخمری به داخل لوله‌های سانتریفوژ استریل ریخته و با دور ۲۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید و پس از جداسازی قسمت رویی مایع، بار دیگر از رسوب مخمری به کمک آب مقطر استریل، سوسپانسیونی تهیه شد. این عمل سه بار تکرار گردید و رسوب مخمری جمع‌آوری گردید. برای شکستن سلول‌های مخمری و تهیه عصاره خام از روش ورتکس با دانه‌های شیشه‌ای استفاده گردید. بدین ترتیب که سوسپانسیونی از رسوب مخمری با PBS[5] (۰/۰۵ مولار pH=۷/٤) تهیه گردید. سپس مقداری از آن در داخل لوله حاوی تعدادی دانه شیشه‌ای ریخته شد؛ به طوری که سوسپانسیون کمی بالاتر از دانه‌های شیشه‌ای قرار گرفت، سپس درب لوله بسته شد و با دور بالا ورتکس گردید. برای خنک نگه داشتن سوسپانسیون بعد از هر یک دقیقه ورتکس، لوله به مدت ۵ دقیقه در داخل حرده‌های یخ قرار داده شد. این عمل ده بار انجام گردید. پس از اطمینان از شکسته شدن مخمرها، سوسپانسیون مخمری به مدت یک شب در داخل یخچال نگهداری گردید. پس از آن برای جداسازی پس مانده سلولی به مدت ۳۰ دقیقه و در ٤ درجه سانتیگراد سانتریفوژ گردید. پس از برداشت

1. Acute candidal vaginitis
2. Acute non-microbial vaginitis
3. Chronic candidal vaginitis
4. Chronic non-microbial vaginitis

5. Phospjate buffered saline

www.SID.ir

Archive of SID

قسمت رویی مایع، مجدداً به مدت ۱/۵ ساعت و با دور ۲۵۰۰۰ و در٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ (SORVALL) گردید. قسمت رویی مایع به آرامی برداشت گردید و در لوله‌های اپندورف تقسیم گردید و تا مراحل بعدی کار در ^{oc}۳۰ نگهداری گردید.

SDS-PAGE [1]

این‌روش دریک تانک‌الکتروفوز عمودی(اختریان- تهران) Laemmli (۱۹۷۰) با ژل جداکننده ۱۲/۵ درصد (بافرژل جدا کننده pH=۸/۸ ، Tris-Hcl 3M) و ژل متراکم کننده ٤ درصد (بافرژل متراکم کننده pH=٦/۸ ، Tris-Hcl0/5M) در یک سیستم بافری غیرپیوسته (Tris 0.025M, Glycin 0.192M, SDS ، pH=۸/۳) (0.1% W/V) با جریان الکتریکی ۲۰۰ ولت و به مدت ٤ ساعت انجام گردید(١٤). نمونه‌ها به صورت دوتایی و در دو جهت مختلف به حفره‌ها اضافه شدند، که یکی از نمونه‌ها برای انجام ایمونوبلاتینگ و دیگری با CBB[3] رنگ آمیزی شد. محلول رنگ‌آمیزی شامل متانول ٤٠ درصد، اسید استیک ۱۰ درصد و CBB ۰/۱ درصد در آب مقطر بود. برای رنگ زدایی ژل از محلول متانول ۳۰ درصد و اسید استیک ۱۰ درصد به مدت ۲ ساعت استفاده شد.

ایمونوبلاتینگ

برای انتقال پروتئین‌های مجزا شده و پروتئین استاندارد از ژل جدا کننده به صفحه نیتروسلولز ۰/٤٥ میکرومتر (Sorvall, CN 111) از تانک بلاتینگ مرطوب (اختریال- تهران) و با روش Towbin و همکاران (۱۹۷۹) استفاده گردید(۱۵). بافر انتقال حاوی گلایسین (192 mmol) ، تریس (25 mmol) ، SDS (0.03% w/v) و متانول(۲۵٪ V/V pH=۸/۳) در آب مقطر بود. عمل انتقال پروتئین از ژل به صفحه نیتروسلولز با جریان الکتریکی ۳۰۰ میلی‌آمپر به مدت ۳ ساعت و در ٤ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. بعد از عمل انتقال برای متوقف ساختن اتصالات غیراختصاصی صفحه نیتروسلوز در ظرف حاوی PBS ، BSA [2] (۱درصد) و توین۲۰ (۰/۰۵ درصد) (PBS-BSA-TW) به مدت یک شب و در٤ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از آن در بافر شستشو (PBS-TW) سه بار و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه شست‌وشو شد. سپس کاغذ نیتروسلولز برش داده شد و در چاهک‌های مخصوص که حاوی سرم بیماران (برای هر بیمار به طور جداگانه) با رقت ۱:۱ در PBS-BSA-TW بود، به مدت ۲ ساعت و در حرارت اتاق قرار داده شد، پس از آن مجدداً سه بار عمل شست و شو انجام گردید. سپس به هر کدام از چاهک‌ها، آنتی بادی ضد IgE و IgG انسانی کونژوگه با HRP [3] (به ترتیب با رقت ۱:۱۱ و ۱:۱۰۰۰ با PBS-BSA-TW) اضافه و به مدت یک ساعت در شرایط تاریکی و در حرارت اتاق قرار داده شد. پس از شست و شو، برای نمایان ساختن اجزاء متصل شونده به IgE و یا IgG از سوبسترای مناسب (٦ میلی گرم DAB [4] در ۹ میلی لیتر تریس ۰/۰۱ مولار با pH=۷/٦ و ۱۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳۰ درصد) استفاده شد. در نهایت با اندازه‌گیری فاصله طی شده توسط مولکول از مبدأ و تعیین RF [5] آن و با استفاده از منحنی استاندارد، وزن مولکولی پروتئین‌های رنگ شده تعیین گردید.

یافته ها

تصویر شماره ۱ ، اجزاء پروتئینی کاندیدا آلبیکانس را در روش SDS-PAGE نشان می‌دهد. با این روش مشخص گردید که کاندیدا آلبیکانس از ۱۵ باند

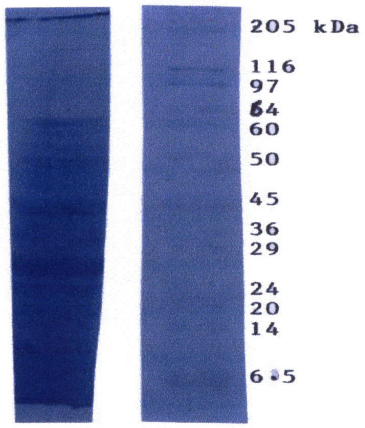
1. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

2. Bovine serum albumine
3. Anti human IgE or IgG conjugated with horseradish peroxides
4. 3.3 diaminobenzidine tetrahydrocholoride (sigma)
5. Relative migration

www.SID.ir

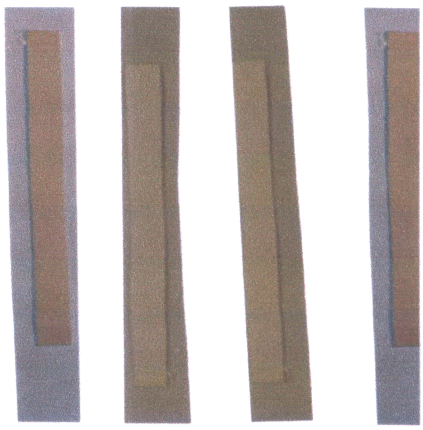
Archive of SID

پروتئینی با اوزان مولکولی بین ۱۳ تا ۷۵ کیلودالتون تشکیل شده است.



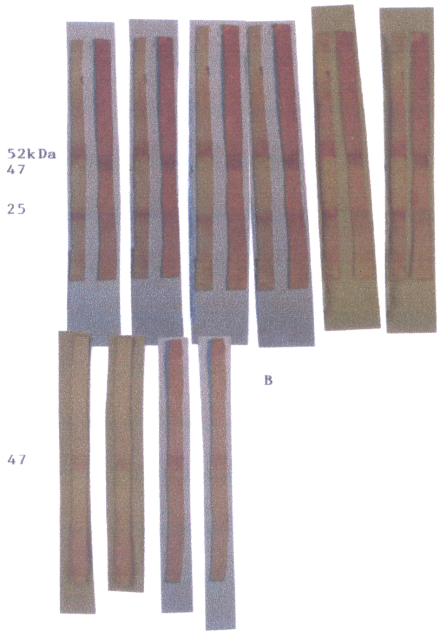
تصویر شماره ۱ : نحوه تفکیک اجزاء پروتئینی کاندیدا آلبیکانس با روش SDS-PAGE

تصویر شماره ۲ ، نحوه پاسخ آنتی ژن‌های کاندیدا آلبیکانس در مواجهه با سرم بیماران مورد مطالعه از نظر IgE اختصاصی را با روش ایمونوبلاتینگ نشان می‌دهد. هیچ‌کدام از اجزاء پروتئینی کاندیدا آلبیکانس با سرم بیماران مورد مطالعه از نظر IgE اختصاصی واکنش نشان نداد.



تصویر شماره ۲ : نحوه پاسخ پروتئین‌های تفکیک شده کاندیدا آلبیکانس با IgE اختصاصی سرم بیماران مورد مطالعه

تصویر شماره ۳ ، نحوه پاسخ آنتی ژن‌های پروتئینی کاندیدا آلبیکانس در مواجهه با سرم بیماران مورد مطالعه از نظر IgG اختصاصی نسبت به کاندیدا آلبیکانس را با روش ایمونوبلاتینگ نشان می‌دهد. به طور کلی از مجموع ۸۰ بیمار مورد مطالعه، ۵۱ نفر (۶۳/۷۵ درصد) با IgG اختصاصی نسبت به کاندیدا آلبیکانس واکنش نشان دادند؛ باندهای واکنش دهنده، باندهای پروتئینی با اوزان مولکولی ۲۵ ، ۴۷ و ۵۲ بودند. بیش‌ترین میزان واکنش، با آنتی ژن ۴۷ کیلو دالتون با نسبت ۴۱/۲۵ درصد بوده است. تمامی بیماران مبتلا به CCV با باندهای پروتئینی ۲۵ و ۵۲ کیلو دالتون، واکنش نیرومند داشتند. تمامی بیمارن مبتلا به ACV با باند پروتئینی ۴۷ کیلو دالتون، واکنش قوی نشان دادند. از ۲۰ بیمار مبتلا به CNV ، ۱۱ بیمار (۵۵ درصد) با باند پروتئینی ۴۷کیلو دالتون، واکنش ضعیف داشتند. بیماران مبتلا به ANV به هیچ‌کدام از باندهای پروتئینی کاندیدا آلبیکانس، واکنش نشان ندادند (جدول شماره ۱).



تصویر شماره ۳ : نحوه پاسخ پروتئین‌های تفکیک شده کاندیدا آلبیکانس با IgG اختصاصی سرم بیماران مورد مطالعه (A باندهای نیرومند ۲۵ و ۵۲ کیلو دالتون در بیماران متبلا به ACV و B-CCV باند ضعیف در بیماران مبتلا به CNV)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۱ : توزیع فراوانی واکنش آنتی ژن‌های ۲۵ ، ٤٧ و ۵۲ کیلو دالتونی کاندیدا آلبیکانس با آنتی بادی IgG سرم بیماران مورد مطالعه .

نوع بیماری	تعداد بیماران	۲۵	٤٧	۵۲(kDa)
CCV [1]	۲۰	٪۱۰۰	ND	٪۱۰۰
ACV [3]	۲۰	ND [2]	٪۱۰۰	ND
CNV [4]	۲۰	ND	٪۵۵	ND
ANV [5]	۲۰	ND	ND	ND
جمع	۸۰	٪۲۵	٪٤۱/۲۵	٪۲۵

1. Chronic candidal vaginitis
2. None detected
3. Acute candidal vaginitis
4. Chronic non-Microbial vaginitis
5. Acute non-microbial vaginitis

بحث

درمطالعه حاضر، عصاره آنتی ژنی به دست آمده از کاندیدا آلبیکانس، ۱۵ باند پروتئینی با اوزان مولکولی ۱۳ تا ۷۵ کیلو دالتون را ظاهر ساخت. نتایج بررسی حاضر، تشابهات و اختلافاتی را با مطالعات محققین دیگر نشان می‌دهد. Shen و همکاران (۱۹۸۹) ، ۲۰ باند پروتئینی با وزن‌های مولکولی ۱۰ تا ۱۵۰ کیلو دالتون را در کاندیدا آلبیکانس نشان دادند. Ishiguro و همکاران (۱۹۹۲) باهمین روش ۲٤ باند پروتئینی با اوزان مولکولی ۱٤ تا ۱۵۲ کیلو دالتون را در کاندیدا آلبیکانس نشان دادند(۸). به نظر می‌رسد عواملی نظیر عصاره‌گیری از کاندیدا آلبیکانس به دست آمده از منابع مختلف و در مراحل مختلف رشد مخمر، نحوه و میزان شکستن سلول‌های مخمری، روش عصاره‌گیری و استفاده از پروتئین‌های استاندارد تهیه شده از مراکز تجاری مختلف و همچنین نحوه اجرای تکنیک SDS-PAGE در به وجود آوردن این تغییرات دخالت داشته باشند.

نتایج حاصل از روش ایمونوبلاتینگ نشان داد که سرم بیمارن مورد مطالعه، حاوی IgE اختصاصی بر علیه کاندیدا آلبیکانس نمی‌باشد؛ لذا هیچ‌گونه واکنشی بین اجزاءپروتئینی کاندیدا آلبیکانس وIgE اختصاصی برعلیه آن درمطالعه حاضرمشاهده نشده است. درحالی‌که اجزاء پروتئینی با اوزان مولکولی ۲۵ ، ٤٧ و ۵۲ کیلو دالتون کاندیدا آلبیکانس با IgG اختصاصی سرمی بیماران مورد مطالعه واکنش مشخصی نشان دادند، نحوه پاسخ در بین بیماران بسیار متفاوت بود. مقایسه نتایج به دست آمده از گروه‌های مختلف بیماران نشان داد که در حضور کاندیدا آلبیکانس در محیط واژن در حالت مزمن واژینیت کاندیدایی، پاسخ با IgG اختصاصی نسبت به آنتی‌ژنی ۲۵ و ۵۲ کیلو دالتون وجود دارد؛ در حالی که در شکل حاد، واکنش نیرومند تنها با باند ٤٧ کیلو دالتونی مشاهده شده است و در عدم حضور کاندیدا آلبیکانس در شکل مزمن، واکنش ضعیفی با باند ٤٧ کیلو دالتونی وجو داشته است؛ شاید این موضوع نشانگر این باشد که اولین آنتی بادی IgG ساخته شده در بدن بر علیه کاندیدا آلبیکانس نسبت به آنتی ژن ٤٧ کیلودالتون باشد که از دوام بیش‌تری هم‌برخوردار می‌باشد؛ به طوری که در بیماران مبتلا به CNV بسیاری از آن‌ها (۵۵ درصد) علی رغم منفی شدن محیط واژن از نظر وجود کاندیدا آلبیکانس در ایمونوبلاتینگ، باند ضعیفی برعلیهIgG اختصاصی آشکار نساختندکه ضعیف بودن آن شاید ناشی از تحلیل تدریجی این آنتی‌بادی در سرم این‌گونه بیماران‌باشد. همچنین نتایج ایمونوبلاتینگ مشخص نموده است‌که‌IgG سرم‌بیماران مبتلا به واژینیت مزمن کاندیدایی، در مقابل آنتی‌ژن‌های ۲۵ و ۵۲ کیلو دالتون کاندیدا آلبیکانس، واکنش نیرومندی دارند که می‌تواند بیانگر حضور مرتب آنتی ژن در بدن فرد مبتلا باشد. نتایج مطالعه Ishiguro همکاران (۱۹۹۳) که با روش ایمونوبلاتینگ سرم بیماران مبتلا به واژینیت کاندیدایی و افراد سام را آنالیز نمودند، با مطالعه حاضر هماهنگی نسبی را نشان می‌دهد(۸). درمطالعه Ishiguro و همکاران (۱۹۹۲) نظیرمطالعه حاضر، هیچ‌کدام از باندهای پروتئینی کاندیدا آلبیکانس با IgE اختصاصی

www.SID.ir

Archive of SID

سرمی، پاسخ مشخصی را آشکار نساختند در حالی که ٤ باند پروتئینی با اوزان مولکولی ۲۹، ۵۲، ٦۲ و٦۷ کیلو دالتون با IgG سرمی بیماران مبتلا واکنش دادند.

اگرچه در مطالعه حاضر وهمچنین مطالعه Ishiguro و همکاران (۱۹۹۲) ، IgE اختصاصی برعلیه کاندیدا آلبیکانس در سرم بیماران آشکار نشده است؛ به نظر می‌رسد با توجه به مطالعه Moraes و همکاران (۲۰۰۰) نتوان از نقش حساسیتی کاندیدا آلبیکانس در این‌گونه بیماران به راحتی گذشت(۹). در مطالعه Moraes و همکاران (۲۰۰۰) نشان داده شد که ایمنی درمانی به وسیله آلرژن کاندیدا آلبیکانس در زنان مبتلا به واژینیت عود کننده می‌تواند به نحو بارزی تعداد و شدت عوارض واژینیت‌های کاندیدایی را کاهش دهد. علاوه بر آن نتایج مطالعات محققین دیگر که توانستند IgE اختصاصی بر علیه کاندیدا آلبیکانس را در ترشحات واژینال بیماران مبتلا به واژینیت‌های عودکننده مشخص نمایند، نشان می‌دهد که در چنین بیمارانی در واقع یک نوع واکنش حساسیتی موضعی نسبت به کاندیدا آلبیکانس اتفاق می‌افتد(٦،۵).

براساس نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر و سایر مطالعات مرتبط، به نظر می‌رسد برخی از آنتی‌ژن‌های کاندیدا آلبیکانس می‌توانند علاوه بر تاثیر در سیر بالینی بیماری جنبه تشخیصی نیز پیدا نمایند. در مطالعه حاضر مشخص شده است که حضور نیرومند آنتی‌بادی برعلیه آنتی‌ژن ٤۷ کیلودالتونی با شکل حاد و وجود آنتی‌بادی برعلیه آنتی‌ژن‌های۲۵و۵۲ کیلودالتونی کاندیدا آلبیکانس می‌تواند با سیر مزمن بیماری در ارتباط باشد؛ لذا آشکار ساختن این باندهای پروتئینی در بیماران مبتلا به واژینیت مزمن و حاد می‌تواند از راه‌کارهای تشخیصی ولوو واژینیت کاندیدایی مزمن و حاد باشد. برای دست‌یابی به نتایج دقیق و کاربردی تحقیقات بیش‌تری در این زمینه توصیه می‌شود.

سپـاسگـزاري

این تحقیق باحمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شده است که بدین‌وسیله از کلیه همکاران محترم حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران تقدیر و تشکر به عمل می‌آید. همچنین از کلیه بیماران عزیز که اجازه دادند تا این تحقیق انجام شود نیز قدردانی می‌شود.

فـهـرست مـنـابـع

1. Quan M. Diagnosis and management of infectious vaginitis. ***J Am Board Fam Pract.*** 1990 Jul-Sep; 3(3): 195-205.
2. Ferrer J.Vaginal candidiosis: epidemiological and etiological factor. ***Int J Gynaecol Obstet,*** 2000 Dec; 71, Suppl 1: 521-7.
3. Sobel JD.Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. ***Am J Obstet Gynecol,*** 1985; 152: 924.
4. Spinillo A,Pizzoli G, Colona L, Nicola S, De Seta F, Guaschino S. Epidemiologic characteristics of woman with idiopathic

www.SID.ir

Archive of SID

recurrent vulvovaginal candidiasis. ***Obstet Gynecol*** 1993 may; 81: 5(Pt1) 721-70.

5. Witkin SS, Jeremias J. Vaginal eosinophils and IgE antibodies to candida albicans in women with recurrent vaginitis. ***J Med Vet Mycol,*** 1989; 27: 57-80.

6. Witkin SS, Jeremias J, Ledger WJ. Localized vaginal allergic response in women with recurrent vaginitis ***J Allergy Immunol***, 1988 Feb; 81: 412-60.

7. Girabdo P, Von Nowaskonski A, Gomes FA, Linhares I, Witkin SS. Vaginal colonization by candida in symptomatic women with and without a history of recurrent vulvaginal candidiasis. ***Obstet Gynecol,*** 2000 Mar; 95: 413-6.

8. Ishiguro A,Homma M,Sukai T,Higashide K, Torii S, Tanaka K. Immunoblotting analysis of sera from patients with candical vaginitis and health females.***J Med Vet Mycol,***1992; 30: 281-92.

9. Moraes PS, Goiaba S. Candida albicans allergen immunotherapy analysis recurrent vaginal candidiasis. ***J Investig Clin Immunol,*** 2000 Sep-Oct; 10: 5305-9.

10. Matthews RC, Burnie JP, Tabaochali S. Isolation of immunodominant antigens from sera of patients with systemic response to candida albicans from sera of patients with systemic response to candida albicans. ***J Clin Microbiol*** 1987; 25: 230-70.

11. Shen HD, Choo KB, Tang RB, Lee CF, Yeh JY, Han SH. Allergenic components of candida albicans identifies by immunoblot analysis. ***Clin Exp Allergy*** 1989; 19: 191-60.

12. Wller BI, Simmons PD, Ivani L. Identification of immunodominant antigens of candida aldicans in patients with superficial candidiosis.***Clin Immunol and Immunopathology*** 1990; 54: 374-353.

۱۳. برگ جانان. ***بیماری‌های زنان نواک***، ترجمه امیرخانی ژیلا، ویرایش سیزدهم، تهران: انتشارات ارجمند، ۱۳۸۱، صفحه ۳۰۱-۲۹۸.

14. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. ***Nature.*** 1970; 227: 680-50.

15. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. ***Proc Nalt Acad Sci.*** 1979; 76: 4350-40.

www.SID.ir