ارزیابی ارزش روش‌های تشخیص سرولوژیک ایمنوفلورسانس غیر مستقیم و الایزا در مقایسه با آزمایش مستقیم و کشت در تشخیص ولوواژینیت کاندیدیایی

مینا شریفی سرخه‌ریزی:کارشناس ارشد قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران minasharifi62@yahoo.com
***دکتر مهربان فلاحتی**: دانشیار و متخصص قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. (*نویسنده مسئول) mehrabanfalahati@yahoo.com
دکتر فریده زینی: استاد و متخصص قارچ شناسی. دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران fzaini@tums.ac.ir
دکتر لامع اخلاقی: دانشیار و متخصص انگل شناسی، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.z_razi_lab@yahoo.coml
دکتر فریبا حیدری کهن: متخصص بیماری‌های زنان و زایمان. بیمارستان لولاگر، تهران، ایران.dr_heidarie@yahoo.com
محسن غلمان: کارشناس علوم آزمایشگاهی. دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. mohsen_ghelmn@yahoo.com
سمیه شریفی نیا: کارشناس ارشد قارچ شناسی. دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایرانssharifynia@yahoo.com

تاریخ دریافت:۸۹/۷/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۲۲

چکیده

زمینه وهدف: ولوواژینیت کاندیدیایی(Vulvovaginal candidiasis) بیماری شایع زنان است که در اثر رشد غیر طبیعی کاندیداها در مخاط دستگاه تناسلی زنان ایجاد می‌شود. علایم و نشانه‌های بالینی ولوواژینیت کاندیدیایی اغلب غیر اختصاصی است؛ بنابراین تشخیص بیماری بر اساس آن‌ها قطعی نیست. هدف ازاین پژوهش ارزیابی ارزش روش‌های تشخیصی سرولوژیک ایمنوفلورسانس غیر مستقیم و الایزا در مقایسه با آزمایش مستقیم و کشت در بیماران مبتلا به ولوواژینیت کاندیدیایی بود.

روش کار: این مطالعه یک روش توصیفی- مقایسه‌ای بود که بر روی ۸۷ بیمار مشکوک به ولوواژینیت کاندیدیایی و ۵۰ نفراز افراد سالم (گروه کنترل) انجام شد. نمونه‌ها مورد آزمایش مستقیم،کشت وآزمایش‌های تکمیلی برای شناسایی گونه‌های مختلف کاندیدا قرار گرفتند. سپس با استفاده از سرم بیماران تست‌های سرولوژیک شامل ایمنوفلورسانس غیر مستقیم و الایزا انجام گرفت. برای مقایسه متغیرهای کمی و کیفی به ترتیب از آزمون‌های chi-square،t-student ودر صورت لزوم آزمون دقیق فیشر استفاده شد.

یافته‌ها: از ۸۷ نمونه مشکوک به ولوواژینیت کاندیدیایی در مجموع ۵۰ مورد ولوواژینیت کاندیدیایی تشخیص داده شد. عوامل مسبب به ترتیب فراوانی عبارت بودند از: کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا کفایر، کاندیدا اینکونسپیکوا و کاندیدا فاماتا. هم چنین کاندیداهای جدا شده از افراد کنترل به ترتیب فراوانی عبارت بودند از: کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا کفایر. در این بررسی، تمام گروه کنترل در تست ایمنوفلورسانس غیرمستقیم منفی و در گروه بیماران ۴۲ نفر (۸۴٪) مثبت و ۸ نفر (۱۶٪) منفی بودند. با روش الایزا، همه گروه کنترل منفی و در گروه بیماران ۴۰ نفر (۸۰٪) در این تست مثبت و ۱۰ نفر (۲۰٪) منفی شدند.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد در مواردی که امکان انجام روش‌های مستقیم میکروسکوپی و کشت وجود نداشته باشد، روش‌های ایمنوفلورسانس غیرمستقیم و الایزا می‌توانند به عنوان روش‌های جایگزین در تشخیص ولوواژینیت کاندیدیایی مطرح باشند.

کلید واژه‌ها: ولوواژینیت کاندیدیایی، روش‌های تشخیص، ایمنوفلورسانس غیر مستقیم، الایزا.

مقدمه

ولوواژینیت کاندیدیایی بیماری است که در اثر رشد غیر طبیعی مخمرها در مخاط دستگاه تناسلی زنان ایجاد می‌شود. این بیماری یکی از مشکلات زنان در سنین باروری می‌باشد[۱] .اگر چه علایم و نشانه های ولوواژینیت کاندیدیایی معمولاً غیراختصاصی می‌باشد، اما شایع‌ترین علامت خارش ناحیه واژن است که اغلب در طول دوره قبل از قاعدگی شدیدتر می‌شود[۲و۳]. این بیماری با ترشحات زرد شیری، غلیظ و غشا کاذب خاکستری در سطح مخاط واژن همراه است[۴].میزان ترشحات در بیماران مختلف، متفاوت است ومعمولاً ترشحات به صورت تکه های سفید و پنیری شکل دیده می‌شود[۲، ۵].

pH واژن در این بیماری معمولاً نرمال بوده (۴/۵-pH=۴) و بیماران معمولاً از بوی نامطبوع شاکی نیستند [۲].

هفتاد و پنج درصد زنان در طول زندگی خود حداقل یک بار دچار ولوواژینیتمی‌شوند و ۵۰-۴۰٪، زنان بیش از یک بار به این بیماری مبتلا می‌شوند ودر ۱۰-۵٪ زنان این بیماری به صورت عودکننده در می‌آید[۱,۲و۶-۸].

عامل این بیماری، گونه های مختلف کاندیدا بوده که کاندیداآلبیکنس، شایع‌ترین و عامل ۸۰-۹۰٪ موارد بیماری است. دومین گونه شایع، کاندیدا گلابراتا است که ۵-۱۵٪ موارد را به خود اختصاص می‌دهد[۱، ۹]. گونه های دیگر مانند کاندیداتروپیکالیس و کاندیدا کروزی می‌توانند در ۵٪ موارد عامل ایجاد کننده واژینیت باشند[۱۰]. تشخیص بیماری با جداسازی قارچ از کشت به همراه مشاهده سلول‌های مخمری جوانه دار، میسلیوم‌های کاذب و حقیقی انجام می‌شود. شکل مشخص حالت تهاجمی کاندیدا شامل مخمرهای جوانه دار و میسلیوم کاذب منشعب و تولید بلاستوسپور است[۴].

ایمنی در ولوواژینیت کاندیدیایی

اولین سد دفاعی در برابر میکروارگانیسم ها، پوست و نواحی مخاطی می‌باشند که دارای مواد ضدمیکروبی هستند. این مواد توسط سلول‌های اپی تلیال و اندوتلیال تولید می‌شوند. هم چنین آن‌ها دارای میکروفلورهایی از ارگانیسم‌های ساپروفیت(saprophyte) هستند که مانع ازتجمع میکروارگانیسم های دیگر می‌شوند[۱۱].

ایمنی سلولی در دفاع علیه کاندیدا در نواحی جلدی مخاطی نقش اصلی را ایفا می‌کند [۱۲].

در یک فرد نرمال، نوتروفیل‌ها، مونوسیت‌ها و Tسل‌های CD8+,CD4+ در دفاع علیه عفونت‌های مخاطی با یکدیگر همکاری می‌کنند[۱۳و۱۴].

ایمنی ذاتی، ایمنی همورال(Humoral) و ایمنی سلولی هر سه بر علیه عفونت‌های کاندیداآلبیکنس وارد عمل می‌شوند. ایمنی ذاتی توسط لکوسیت‌های پلی مورفونوکلئر (PMN=Polymorphonuclear neutrophil) و ماکروفاژها ایجاد می‌شود که نقش اصلی را در دفاع کاندیدیازیس سیستمیک بازی می‌کنند، در حالی که ایمنی سلولی (CMI=Cell-mediated immunity) در سطوح مخاطی بیشتر نقش دارد [۱۵و۱۶]. تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد که لنفوسیت ها CMI موضعی مهم‌ترین نقش دفاعی را بر علیه واژینیت بازی می‌کنند[۱۷]. طبق مطالعات انجام شده توسط Fidel در سال ۱۹۹۵ به نظر می‌رسد،CMI سیستمیک نقش محافظتی بر علیه واژینیت های کاندیدیایی ندارد[۱۸].

در واژینیت کاندیدیایی، کموکائین‌هایی مانند Monocyt Chemoattractant Protein1 (MCP1) و Macrophage Inflammtory Protein2 (MIP2) در ترشحات واژن افزایش پیدا می‌کنند. Th1,Th2 موضعی نیز در ترشحات واژن زیاد می‌شوند و سبب افزایش TGF بتا می‌شوند. در حالی که سایر سایتوکاین ها مانند IFN-γ,IL2گاما، IL10,IL4,IL12 افزایش چشمگیری ندارند. تحقیقات انجام شده روی رت نشان می‌دهد، CD+8T-cell در ترشحات واژن افزایش پیدا می‌کند. در ادامه میزان سایتوکاین در Th1 مانند(IL2(Interleukin 2),IL12(Interleukin 12 و INF اینترفرون گاما بالا می‌رود. با افزایش این سایتوکاین ها لنفوسیت نیز در محل عفونت تجمع می‌یابند[۱۸].

در ترشحات واژن خانم‌های مبتلا به VVC سایتوکاین های Th1,Th2 وجود دارند. در حالی که در افراد سالم فقط سایتوکاین های Th1 وجود دارند که ممکن است به دلیل دفاع بر علیه فلورنرمال کاندیدای موجود در واژن تولید شده باشند. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد در ترشحات واژن و سرم خانم‌های مبتلا به واژینیت عودکننده کاندیدیایی (Recurrent Vulvovaginal candidiasis=RVVC)، پروتئین‌های حاصل از شوک حرارتی وجود دارد که سبب کاهش Th1 موضعی در واژن می‌شود و باعث می‌شود استعداد ابتلا به RVVC در این افراد افزایش یابد[۱۷]. هم چنین در بعضی از افراد مبتلا به RVVC، IgE(Immunoglobulin E) ضد کاندیدا درترشحات واژن افزایش پیدا می‌کند، در حالی که

Immunoglobulin), IgA (Immunoglobulin A) IgG (G موجود در ترشحات، تفاوتی با افراد سالم نشان نمی‌دهد[۱۸].

تست‌های سرولوژیک

برای تشخیص عامل بیماری می‌توان ازآنتی سرم اختصاصی و تست‌های سرولوژیکی استفاده کرد[۱۹].

از آن جایی که قارچ‌ها دارای ساختمان و تشکیلات پیچیده سیتوپلاسمی هستند، اغلب محصولات عصاره سلولی آن‌ها ایمونوژنیک بوده و در افراد مبتلا ایجاد آنتی بادی می‌کنند که انجام تست‌های سرولوژیکی را امکان پذیر می‌نماید. این تست‌ها دارای ارزش فوق‌العاده ای در تشخیص و پیگیری روند بیماری‌های سیستمیک هستند[۴].روش الایزا برای شناسایی و تعیین عیار آنتی بادی اختصاصی در نمونه های سرم کاربرد وسیع دارد. ویژگی این روش مستقیماً به درجه خلوص آنتی ژن متصل شده به فاز جامد وابسته است[۲۰].

در حال حاضر تست‌های گوناگونی مانند ایمنوفلورسانس غیر مستقیم و کانتر ایمنوالکتروفورز جهت تشخیص کاندیدیازیس در بسیاری از بیمارستان‌های اروپا انجام می‌گیرد[۲۱]. براساس مطالعه ای بر روی ۵۰ نفر از مبتلایان به ولوواژینیت کاندیدیایی انجام شد، سطح آنتی بادی‌های ضد کاندیدا با روش الایزا محاسبه گردید و حساسیت این روش ۷۷/۵٪ و اختصاصی بودن آن ۹۰٪ گزارش شد[۲۲].

روش ایمنوفلورسانس غیرمستقیم به طور گسترده در ردیابی آنتی بادی‌های ضد کاندیدآلبیکنس مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این روش از بلاستوکونیدیا به عنوان آنتی ژن استفاده می‌شود. در تست ایمنوفلورسانس غیر مستقیم، ایمنوگلوبولین‌های کلاس IgA,IgG,IgM قابل ردیابی هستند که در این میان IgG از همه مهم‌تر است. سطح ارزشمند IgG در ۷۸٪ بیماران مبتلا به کاندیدیازیس مشاهده شده، در حالی که سطح ارزشمند IgA,IgM در ۵۱-۳۰٪ بیماران مبتلا به کاندیدیازیس مشاهده شده است[۲۳].

سادگی روش الایزا به همراه حساسیت و تنوع آن، سبب شده است که این روش در تشخیص بیماری‌های قارچی به طور وسیعی مورد استفاده قرار گیرد. روش الایزا برای شناسایی آنتی بادی ضد کاندیدا درسال ۱۹۷۶ شرح داده شد که هم خوانی بسیار خوبی با روش ایمنوفلورسانس و ایمنوالکتروفورز داشت [۲۳].

هدف این پژوهش ارزیابی ارزش روش‌های تشخیص سرولوژیک ایمنوفلورسانس غیر مستقیم و الایزا در مقایسه با آزمایش مستقیم و کشت در تشخیص ولوواژینیت کاندیدیایی بود.

روش کار

این مطالعه یک روش توصیفی- مقایسه‌ای بود. محل نمونه برداری بخش زنان و زایمان بیمارستان لولاگر انتخاب شد و از بیمارانی که از علایم بالینی مانند سوزش، خارش، ترشح پنیری، درد، قرمزی شکایت داشتند، تحت نظر پزشک متخصص زنان و زایمان نمونه برداری به عمل آمد که روش جمع‌آوری نمونه به صورت غیر احتمالی و در دسترس(تصادفی) بود.

برای نمونه برداری از افراد مورد آزمایش، توسط پزشک اسپکولوم استریل مرطوب شده با آب مقطر استریل درون واژن گذاشته شده و با وارد کردن دوسواب استریل به طور همزمان از بن بست خلفی واژن که محل تجمع ترشحات می‌باشد برداشت می‌شد. سواب‌ها در لوله های حاوی یک میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل قرار داده شده و به آزمایشگاه قارچ شناسی منتقل می‌شدند.

بدین ترتیب از ۸۷ بیمار مشکوک به ولوواژینیت کاندیدیایی و ۵۰ نفر از افراد سالم که فاقد علایم سوزش وخارش بودند نمونه گیری به عمل آمد تا مقایسه‌ای میان تیتر آنتی بادی بین افراد سالم و بیمار انجام شود؛ وهمچنین ۵cc خون وریدی لخته از هر کدام از بیماران و افراد کنترل تهیه و به آزمایشگاه منتقل گردید. در آزمایشگاه نمونه ها مورد آزمایش مستقیم، با استفاده از پتاس ۱۰٪ قرار گرفتند. سپس کشت روی محیط کاندیداکروم آگار انجام شد که برای انجام کشت از لوپ استاندارد ۰/۰۱ میلی لیتر میکروبیولوژی استفاده شد. پس از

گذشت ۴۸ ساعت کشت‌ها بررسی شدند و رنگ و مشخصات کلونی‌ها یادداشت شد. سپس شمارش کلونی انجام شد. پلیت هایی که حاوی تعداد کلونی بیش از ۱۰۰۰ عدد در ۱ میلی لیتر بودند به عنوان نمونه بیمار تلقی شدند. برای شناسایی گونه های مختلف کاندیدا روی کلونی‌های جدا شده، آزمایش‌های تکمیلی از قبیل توانایی تولید کلامیدوکونیدی در محیط کورن میل آگار حاوی توئین ۸۰، تولید لوله زایا (germ tube test)، بررسی حساسیت به سیکلوهگزامايد و آزمایش جذب قندها با استفاده از کیت (API20C) انجام شد[۱۲]. در این پژوهش تست‌های سرولوژیکی ایمنوفلورسانس غیر مستقیم و الایزا انجام پذیرفت.

روش ایمنوفلورسانس غیرمستقیم به ترتیب زیر انجام گرفت:

۱-آماده سازی مخمر: در این بررسی از کاندیداآلبیکنس شماره ATCC ۱۰۲۶۱ که در محیط سابوروبراس کشت داده شده بود, استفاده شد. سپس لوله محتوی مخمر ۳ مرتبه با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شد. بعد لوله با فرمالین ۲٪ پر شد و به مدت یک شب در حرارت اتاق قرار داده شد تا مخمرها غیرفعال و ثابت شوند. برای حصول اطمینان از غیرفعال بودن ارگانیسم یک لوپ از مخمر روی محیط سابوروگلوکز آگار کشت داده شد. برای خارج کردن فرمالین از محیط کار ۳ مرتبه با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد. سپس مخمر غیرفعال شده، در آب مقطر استریل غوطه‌ور و با شمارش بر روی لام نئوبار یک سوسپانسیون مخمری با $۱۰^{۶}$ سلول بر میلی لیتر تهیه شد[۲۴]. از سوسپانسیون تهیه شده به عنوان آنتی ژن در این تست استفاده شد.

۲-تهیه لام‌های ایمنوفلورسانس: از سوسپانسیون مخمری تهیه شده در بند شماره ۱ به عنوان آنتی‌ژن در این تست استفاده شد و در هر خانه یک قطره از سوسپانسیون مزبور (معادل ۱۰ میکرولیتر) ریخته و در گرمخانه ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد گذاشته شد تا خشک شود[۲۴].

۳-آماده سازی رقت آنتی هیومن گلوبولین کونژوگه(Conjugated) توتال: در این جا از Anti-Human IgA, IgG ,IgM, kappa, lambda/FITC شرکت Dako استفاده شد. ابتدا سریال رقت‌های ۱/۱۰ تا ۱/۱۶۰ از AHG تهیه شده و با چندین سرم انسانی بیمار که محتوی آنتی‌بادی ضد کاندیدا بودند مجاور شدند. پایین‌ترین رقت سرمی که با پایین‌ترین رقت کونژوگه پاسخ مثبت داد، به عنوان تیتر کونژوگه مورد استفاده قرار گرفت[۱۶].در این بررسی تیتر ۱/۸۰ به عنوان تیتر کونژوگه استفاده گردید.

۴-تهیه کنترل‌های مثبت و منفی: کنترل مثبت شامل سرمی است که حاوی آنتی بادی اختصاصی ضدکاندیدا باشد و کنترل منفی شامل سرمی است که فاقد این آنتی بادی باشد[۲۴].

۵-تهیه رقت‌های سرمی: از سرم بیماران رقت‌های ۱/۵۰تا ۱/۱۲۸۰۰ تهیه و به صورت دوبل درون خانه های لام ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه در محفظه مرطوب انکوبه شدند[۲۴].

۶-شستشو: لام‌ها ۳ مرتبه و هر مرتبه ۵ دقیقه با بافر PBS (pH=۷/۴) شستشو داده شدند[۲۴].

۷-تهیه رقت اوانس بلو (ماده رنگی): در این مرحله اوانس بلو با بافر(Phosphate buffered PBS=saline) به نسبت یک به صد رقیق شد و بعد ۰/۸ میلی لیتر از این سوسپانسیون به ۱۰ میکرولیترAHG اضافه شد تا رقت ۱/۸۰ از کونژوگه به دست آید. اوانس بلو در این جا به عنوان رنگ زمینه به کار رفت[۲۴].

۸-افزودن اوانس بلو: روی هر خانه از لامIF یک قطره (۱۰ لاندا) از سوسپانسیون فوق اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در محفظه مرطوب انکوبه شد[۲۴].

۹-شستشو: لام‌ها ۳ مرتبه و هر مرتبه ۵ دقیقه با بافر PBS شستشو داده شدند. پس از خشک شدن لام‌ها به هر خانه یک قطره گلیسرول که با بافرPBS به میزان ۹ به ۱ رقیق شده بود اضافه گردید[۲۴].

۱۰-بررسی میکروسکوپی: لامل ۵۰×۲۴ روی لام‌ها قرار گرفت و زیر میکروسکوپ فلورسنت با عدسی ۴۰ مورد مطالعه قرار گرفت. برای خواندن نتایج ابتدا کنترل‌های مثبت و منفی بررسی شدند تا وجود واکنش مثبت و منفی مشخص و تایید شود. نمونه مثبت خانه‌ای است که درآن دیواره سلول مخمری به رنگ سبز درخشان دیده شود و با افزایش میزان رقت سرم رنگ حاصله کم رنگ‌تر

جدول شماره ۱- تیتر آنتی بادی به دست آمده با روش ایمنوفلورسانس غیر مستقیم در بیماران و افراد کنترل

تیتر آنتی بادی با روش IFA	افراد بیمار		گروه کنترل		کل		p-value
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	<۰/۰۰۱
۱:۱۰۰	۰	۰	۳	۶	۳	۳	
۱:۲۰۰	۰	۰	۲۰	۴۰	۲۰	۲۰	
۱:۴۰۰	۸	۱۶	۲۷	۵۴	۳۵	۳۵	
۱:۸۰۰	۱۳	۲۶	۰	۰	۱۳	۱۳	
۱:۱۶۰۰	۲۲	۴۴	۰	۰	۲۲	۲۲	
۱:۳۲۰۰	۷	۱۴	۰	۰	۷	۷	

جدول شماره ۲- مقایسه نتایج حاصل از ایمنوفلورسانس غیرمستقیم با کشت

ایمنوفلورسانس غیر مستقیم	کشت				
	منفی		مثبت		کل
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
منفی	۵۰	٪۵۰	۸	٪۸	۵۸
مثبت	۰	۰	۴۲	٪۴۲	۴۲
جمع	۵۰	٪۵۰	۵۰	٪۵۰	۱۰۰

خواهد شد. آخرین تیتر سرمی که دارای واکنش مثبت باشد، به عنوان تیتر نهایی یادداشت شد. واکنش منفی شامل سلول‌هایی است که به رنگ آبی یا بنفش مایل به قرمز دیده می‌شود.

برای انجام تست الایزا، از کیت‌هایی که از شرکت r-biopharm خریداری شد با مشخصات زیر استفاده شد.

RIDA SCREEN CandidaIgG (K9021)
RIDA SCREEN Candida IgM (K9031)
RIDA SCREEN Candida IgA (K9011)

شیوه کار در تست الایزا، طبق دستورالعمل ارائه شده توسط کارخانه سازنده که همراه کیت موجود بود، انجام گرفت. تمامی متغیرهای کمی به صورت میانگین و انحراف معیار و متغیرهای کیفی به صورت تعداد (درصد) بیان شدند. برای مقایسه متغیرهای کمی در دو گروه مورد و شاهد، ابتدا نرمال بودن متغیرها به وسیله آزمون کولموگروف اسمیرنف و نمودار Q-QNormal و نمودار جعبه ای مورد بررسی قرار گرفتند و در صورت نرمال بودن متغیر، از آزمون t-student برای مقایسه استفاده شد. در غیر این صورت از آزمون ناپارامتری من-ویتنی برای مقایسه دو گروه استفاده شد.

برای یافتن بهترین نقطه برش(Cut off) برای ایمنوفلورسانس غیر مستقیم از تحلیل منحنی ROC و شاخص Sensitivity Youden (Specificity-1+) استفاده شد. در این بررسی کشت به عنوان استاندارد طلایی در نظر گرفته شد و نقطه ۱/۶۰۰ به دلیل این که دارای بیشترین شاخص Youden بود به عنوان بهترین نقطه Cut off تعیین گردید. ارزش تشخیصی این روش و دو روش الایزا و مستقیم میکروسکوپی به وسیله شاخص‌های حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی مورد بررسی قرار گرفت. هم چنین توافق بین روش‌ها به وسیله شاخص کاپا بررسی شد.

یافته‌ها

در مجموع از ۸۷ فرد مشکوک به ولوواژینیت که دارای علایم سوزش و خارش و ترشح بودند و ۵۰ نفر از افراد سالم که فاقد این علایم بودند نمونه برداری شد. از میان ۸۷ فرد مشکوک ۵۰ مورد ولوواژینیت کاندیدیایی تشخیص داده شد که عوامل آن به ترتیب درصد فراوانی عبارت بودند از: کاندیداآلبیکنس (٪۶۲) کاندیدا گلابراتا(٪۱۸/۶)، کاندیدا کفایر(٪۱۰/۱)، کاندیدا اینکوسپیکوآ (٪۶/۷) و کاندیدا فاماتا (٪۱/۷).

در مقایسه نتایج آزمایش مستقیم و الایزا میان

جدول شماره ۳- بررسی نتایج حاصل از روش مستقیم میکروسکوپی و الایزا در افراد بیمار و گروه کنترل

روش مستقیم میکروسکوپی	افراد بیمار		گروه کنترل		کل		p-value
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	<۰/۰۰۱
مثبت	۴۴	۸۸	۰	۰	۴۴	۴۴	
منفی	۶	۱۲	۵۰	۱۰۰	۵۶	۵۶	
ELISA	افراد بیمار		گروه کنترل		کل		p-value
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	<۰/۰۰۱
مثبت	۴۰	۸۰	۰	۰	۴۰	۴۰	
منفی	۱۰	۲۰	۵۰	۵۰	۶۰	۶۰	

جدول شماره ۴ – توزیع میانگین و انحراف معیار تیترهای آنتی بادی بر علیه گونه های کاندیدا با روش الایزا

	افراد بیمار		گروه کنترل		کل		p-value
کلاس آنتی بادی	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	
IgM	۱۳/۱۵	۱۲/۰۲	۹/۱۳	۹/۹۴	۱۱/۴	۹/۳۶	۰/۰۳۱
IgG	۹/۸۳	۵/۱۳	۳/۵۶	۱/۳۹	۶/۶۹	۴/۸۹	۰/۰۰۱<
IgA	۵/۱۰	۲/۵۱	۵/۳۱	۲/۵۲	۵/۲۰	۲/۵۰	۰/۶۸۳

جدول شمار ه ۵ – ارزش تشخیصی روش‌های مختلف نسبت به روش کشت

نام روش	حساسیت(درصد)	ویژگی(درصد)	ارزش اخباری مثبت(درصد)	ارزش اخباری منفی(درصد)	کاپا
مستقیم میکروسکوپی	۸۸	۱۰۰	۱۰۰	۸۹/۳	۰/۸۸۰
الایزا	۸۰	۱۰۰	۱۰۰	۸۳/۳	۰/۸۰۰
ایمنوفلورسانس غیرمستقیم	۸۴	۱۰۰	۱۰۰	۸۵/۷	./۸۶۰

گروه کنترل و بیمار اختلاف معنی‌دار به دست آمد. ($p < /۰۰۱$).

در مقایسه تیترهای بدست آمده با روش ایمنوفلورسانس غیر مستقیم میان افراد کنترل و بیمار اختلاف معنی دار مشاهده شد($p < /۰۰۱$).

در این بررسی همه افرادی‌که نتیجه کشت آن‌ها روی محیط کاندیدا کروم آگار منفی بود (افراد سالم) در تست ایمنوفلورسانس نیز منفی شدند. اما در گروه افراد بیمار که از نظر کشت مثبت بودند، ۸ نفر در تست ایمنوفلورسانس منفی و۴۲ نفر مثبت شدند.

در مقایسه میانگین سطوح آنتی‌بادی‌های کلاس IgM وIgG میان گروه کنترل و افراد بیمار اختلاف معنی‌دار بود؛ در حالی که در مورد کلاس IgA این اختلاف معنی‌دار نبود.

بحث و نتیجه‌گیری

ولوواژینیت کاندیدیایی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های قارچی زنان و علت مراجعات مکرر آنان به کلینیک است که باعث تحمیل هزینه‌های درمانی برای بیماران می‌گردد. تشخیص به موقع بیماری می‌تواند از صرف هزینه های درمانی و مراجعات مکرر بیماران بکاهد.

در بررسی انجام شده از ۸۷ نفر بیمارانی که درمعاینات بالینی به عنوان مبتلایان به واژینیت کاندیدیایی تشخیص داده شده بودند، فقط ۵۰ نفر (۵۷/۴۷٪) آن‌ها در روش کشت که روش استاندارد طلایی در این پژوهش می‌باشد مثبت و ۳۷ نفر (۴۲/۵٪) از آن‌ها منفی شدند و این نشان دهنده این واقعیت است که صرفاً از علایم بالینی نمی‌توان جهت تشخیص ولوواژینیت کاندیدیایی استفاده کرد. عرف درمان توأم باکتریایی و قارچی از روی علایم کلینیکی توسط پزشک در مواردی که

آزمایشگاه در دسترس نیست، نیز دلیل بر صحت این مدعاست. هم چنین گزارش یافته های نوویکوا و مارچ در سال ۲۰۰۲ بر روی ۸۳ بیمار مشکوک به واژینیت کاندیدیایی نیز این ادعا را تایید می‌کند[۲۵].

نتایج یافته‌های تحقیقی در سال ۱۳۸۷ بر روی ۱۵۰ نمونه مشکوک به واژینیت کاندیدیایی با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت داشته و آن را تایید می‌نماید[۲۶].

نتایج بررسی حاضر و بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که تشخیص و درمان براساس معیارهای بالینی کافی نبوده وتشخیص‌های پاراکلینیک ضرورت دارد.

در مطالعه حاضر، روی هم رفته ۵ گونه متفاوت کاندیدا از نمونه های بیماران جدا گردید که به ترتیب عبارت بودند از کاندیدا آلبیکنس ۳۷ مورد (۶۲٪)، کاندیدا گلابراتا ۱۱ مورد (۱۸/۶٪)، کاندیدا کفایر ۶ مورد (۱۰/۱٪)، کاندیدا اینکونسپیکوا ۴ مورد (۶/۷٪) و کاندیدا فاماتا ۱ مورد (۱/۷٪).در این بررسی گونه غالب کاندیدا آلبیکنس وبعد از آن کاندیدا گلابراتا بود،که با چندین مطالعه پیشین هم خوانی داشت[۱،۲۶و۲۷].

در مطالعه حاضر، از میان ۵۰ مورد واژینیت کاندیدیایی، ۹ مورد (۱۸٪) عفونت آمیخته با دو نوع کاندیدا شناخته شد که ۶ مورد از آن‌ها (۶۶/۶٪) کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا به صورت توأم عامل ایجاد عفونت بودند که باتحقیقRichter و همکاران مطابقت دارد[۲۸].

مقایسه نتایج آزمایش مستقیم میکروسکوپی و کشت نشان دهنده مطابقت نتایج کشت با آزمایش مستقیم بوده و فقط در ۶ مورد (۱۲٪) از موارد کشت‌های مثبت، آزمایش مستقیم میکروسکوپی منفی شد.

درمطالعه‌ای ۳۳/۳٪ زنانی که دچار ولوواژینیت کاندیدیایی بودند، در آزمایش مستقیم میکروسکوپی منفی شدند که نتیجه این مطالعه با نتیجه تحقیق حاضر هم خوانی ندارد[۱۰]. این تفاوت ممکن است مربوط به شرایط بهداشتی و اجتماعی جامعه باشد.

در مطالعه دیگری، از ۲۱۵ خانمی که کشت ترشحات آن‌ها از نظر کاندیدا مثبت بود، فقط ۱۶۷ مورد (۷۷/۶٪) در آزمایش مستقیم میکروسکوپی مثبت شدند، که با مطالعه حاضر مطابقت دارد[۶].

اختلاف معنی دار نتایج ایمنوفلورسانس غیر مستقیم میان گروه کنترل و بیمار، نشان دهنده تفاوت سطح آنتی بادی‌های سرمی در این دو گروه می‌باشد.(جدول شماره۱).

در این بررسی، برای یافتن بهترین نقطه برش (cut off) از منحنی ROC استفاده شدکه تیتر ۱/۶۰۰ به عنوان بهترین نقطه برش انتخاب شد و تیترهای بالاتر از ۱/۶۰۰ جزء موارد مثبت تلقی شدند. با توجه به نقطه برش در ایمنوفلورسانس غیر مستقیم در این بررسی، در ۸٪ موارد ممکن است نتیجه مثبت کاذب به دست آید (جدول شماره۲ در یافته‌ها).

در مطالعه‌ای در سال ۱۹۷۲ انجام گرفت، سطح آنتی بادی‌های ضد کاندیدا در ۷۰-۸۹ درصد از بیماران مبتلا به کاندیدیازیس قابل ارزیابی بود که با مطالعه حاضر هم خوانی دارد[۲۹].

در مطالعه‌ای دیگر، تیتر آنتی‌بادی در گروه کنترل حداکثر ۱/۱۶ و در بیماران مبتلا به ولوواژینیت کاندیدیایی، ۱/۳۲ و بالاتر گزارش شد[۳۰].

مقایسه نتیجه به دست آمده از این مطالعه و مطالعه حاضر تفاوت قابل ملاحظه ای بین تیترهای مثبت و منفی را نشان می‌دهد و به نظر می‌رسد یکی از دلایل مهم این مسئله بالا بودن تیتر سرواپیدمیولوژیک در جامعه مورد مطالعه است.

در ضمن در تحقیقی دیگر، تیترهای بالاتر از ۱/۶۴ در بیماران مبتلا به کاندیدیازیس، مثبت تلقی شد[۲۹].

نتیجه این بررسی‌ها نشان می‌دهد، در مطالعات مختلف، تیتر برش متفاوت بوده و این موید اختلاف تیتر آنتی‌بادی ضد کاندیدا در نقاط مختلف است. بنابراین ضرورت دارد هر منطقه، در هنگام راه‌اندازی این تکنیک برای خود یک نقطه برش جداگانه شود.

در این بررسی با روش الایزا، سطح آنتی بادی‌های کلاس IgA,IgMو IgGدر گروه بیماران و افراد کنترل اندازه‌گیری شد. جدول شماره ۳ نشان

می‌دهد که سطح آنتی بادی‌های کلاسIgA,IgM.IgG در همه افراد کنترل منفی می‌باشد که دور از انتظار نیست. در گروه بیماران مبتلا به ولوواژینیت کاندیدیایی، ۴۰ نفر (۸۰٪) در این تست مثبت و ۱۰ نفر (۲۰٪)منفی شدند. به‌طوری‌که میانگین سطح IgM در افراد بیمار ۱۳/۱۵ و در گروه کنترل ۹/۱۳ بود که براساس محاسبات آماری بین این دو گروه اختلاف معنی دار بود(p=۰/۰۳۱).

میانگین سطح IgG در گروه بیماران ۹/۸۳ و در گروه کنترل ۳/۵۶ بود و در مقایسه بین این دو گروه نیز اختلاف معنی دار بود(p<۰/۰۰۱)

در صورتی‌که در مقایسه میانگین‌های سطوح IgA در گروه بیماران و افراد کنترل اختلاف معنی‌دار نبود (p = ۰/۶۸۳) (جدول شماره ۴).

در مطالعه‌ای که ۱۹۷۶ انجام شد، هیچ IgA ترشحی ضد کاندیدا آلبیکنس در سرم افراد مبتلا به ولوواژینیت کاندیدیایی به دست نیامد، که با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد[۳۰].

براساس تحقیقی دیگر که بر روی ۵۰ نفر از مبتلایان به ولوواژینیت کاندیدیایی انجام شدو سطح آنتی بادی‌های ضد کاندیدا با روش الایزا محاسبه گردید، حساسیت این روش ۷۷/۵٪ و اختصاصیت آن ۹۰٪ گزارش شد[۲۲].

در مقایسه میان دو روش الایزا و ایمنوفلورسانس غیر مستقیم از میان ۵۰ نفر مبتلا به ولوواژینیت کاندیدیایی، ۱۰ نفر (۲۰ ٪) در روش الایزا و در روش ایمنوفلورسانس غیر مستقیم ۸ نفر (۱۶٪) منفی شدند.

با توجه به نتایج الایزا در این بررسی و مراجعه به نوشته های موجود، این تست در تشخیص ولوواژینیت کاندیدیایی سودمند ارزیابی می‌شود. این مقایسه نشان می‌دهد:

۱- نتایج یافته های حاصل از الایزا و ایمنوفلورسانس در این پژوهش به هم نزدیک است.

۲- نظر به این که حجم نمونه در این پژوهش به حد کافی نبود، نمی‌توان این گونه نتیجه گیری کرد که حساسیت ایمنوفلورسانس غیر مستقیم از الایزا بیشتر است، ولی ظاهر امر دلالت بر این مدعا دارد.

جدول شماره ۵، ارزش تشخیصی روش‌های ایمنوفلورسانس غیر مستقیم،الایزاوآزمایش مستقیم میکروسکوپی را نسبت به کشت نشان می‌دهد.

با توجه به بحث فوق می‌توانیم نتایج زیر را اعلام کنیم:

- روش ایمنوفلورسانس غیر مستقیم در مقایسه با الایزا تفاوت قابل ملاحظه ای ندارد.
- چون در روش‌های سرولوژی گونه کاندیدا قابل تشخیص نیست، لذا روش‌های کشت و مستقیم میکروسکوپی هنوز هم به عنوان روش‌های گلد استاندارد و قطعی مطرح است.
- روش‌های غیر مستقیم نظیر ایمنوفلورسانس و الایزا، به عنوان روش‌هایی هستند که در مواردی که به هر علتی (به طور مثال نمونه برداری پس از استفاده از داروهای ضد قارچی ویا خود درمانی بیمار) نتوانیم نتایج مطلوبی از روش‌های مستقیم و کشت به دست آوریم، این روش‌ها می‌توانند به عنوان روش‌های جایگزین مطرح باشند.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه خانم مینا شریفی سرخه‌ریزی درمقطع کارشناسی ارشد به راهنمایی دکتر مهربان فلاحتی و دکتر فرید هزینی در سال ۱۳۸۹ و کد ۸۸۲/۱ می‌باشدکه با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی تهران اجرا شده است.

منابع

1. Ferrer J. Vaginal Candisosis: epidemiological and etiological factors, International Journal of gynecology and obstetrics. 2000.(71):21-27.
2. Sobel.Jack. Genital candidiasis. School. 2005.(33):62-65.
3. Odd S.F.C, Webster C.E, Mayuranathan. P, simmons. P.D. Candida concentrations in the vaginal and their association with signs and symptoms of vaginal candidiasis, Journal of Medical and Veterinary Mycology. 1998.(26): 277-283.
4. Zaini F, Mehbod ASA Emami M. [Comprehensive Medical Mycology].University of Tehran Press. Second ed.1383. .(512)333-341.(Persian).

5. Saravana B.P, Rajkumar R, Radhakrishnan S, Seenivasan C, Kannan S. Culture and Identification of Candida albicans from vaginal ulcer and separation of Enolase on SDS-PAGE. International Journal of Biology.2010.(1) :84-93.
6. Anis Ahmad, Asad U. Khan. Prevalence of Candida species and potential risk factors for vulvovaginal Candidiasis in Aligarh, India. European Journal of obstetrics and gynecology and reproductive biology. 2009.(144):68-71.
7. Sobel J., Vulvovaginal Candidiasis. Department of medicine. Wayne state university .School of medicine. 2007.(71):1961-1971.
8. Johnson E., Berwald N. Diagnostic utility of physical examination, history and laboratory evaluation in emergency department patients with vaginal complaints. Department of Emergency Medicine. State university of New York. 2008.(52): 294-297.
9. Ventolini G. Recurrent vulvovaginal candidiasis. Department of obstetrics and gynecology of State university. 2006.(28):93-95.
10. Sobel Jack, Faro S., Foxman B. William J., Barbara D., Vulvovaginal Candidiasis: epidemiologic, diagnostic and therapeutic considerations. American Journal of obstetrics and gynecology. 1998.(2):203-211.
11. Blanco J.L., Garcia M.E. Immune response to fungal infections. Veterinary Immunology and Immunopathology. 2008. (125): 47-70.
12. Wozniak KL, Wormley F.L, Fidel PL. Candida specific antibodies during experimental vaginal candidiasis in Mice. Infection and Immunity.2002. (10):5790-5799.
13. Shoham Sh. LevitzS.M.The immune response to fungal infections. British Journal of Haematology. 2005.(129): 569-582.
14. Lopez –Ribot JL, Casanova M, Maurgui A, Martinez J.P. Antibody response to Candidaalbicans cell wall antigens. Immunology and Medical Mocrobiology.2004. (41): 187-196.
15. Fidel PL. History and new insights into host defense against vaginal candidiasis. Department of Microbiology, Immunology and Parasitology. Louisiana State University .Health Sciences Center 2004. (5):220-227.
16. Novikova N, March PA. Characterization of woman with a history of recurrent vulvovaginal candidiasis.Actaobsetgynecolscand.2002.(81):1047-1052.
17. Nawrot U, Grzybek-Hryncewicz K, Zielska U, Czarny A, Podwinska J. The study of cell-mediated immune response in recurrent vulvovaginalcandidiasis. Immunology and Medical Microbiology. 2000. (29):89-94.
18. Paul L, Fidel JR. Sobel JD. Host Defense against vaginal candidiasis, Calderone Richard A, *Candida* and candidiasis. ASM PRESS USA. Washington D.C. First E.D. 2002. 193-209.
19. Suzuki Shigeo.Serological Differences among the pathogenic Candida spp, Calderone Richard A, Candida and Candidiasis. ASM PRESS.USA. Washington D.C. first E.D. 2002.29-35.
20. Jones GR, Warnock DW. Observations on the use of the double diffusion test in the diagnosis of vaginal candidiasis. Journal of clinical pathology 2010. (30):262-265.
21. PersatF, TopenotR, Piens M.A, Theibaut A, Dannaoui E, Picot S. Evaluation of different commercial ELISA methods for the serodiagnosis of systemic candidiasis 2002.(45):455-460.
22. Tan S.W, Mackay A. warmington J.A. Serologic test for vulvovaginal Candidiasis, International Journal of gynecology and obstetrics 2003.(8):79-81.
23. Mackenzie Donald W.R, Serodiagnosis, Howard Dexter. H, Fungi pathogenic for HHumans and Animals (In three parts), part B pathogenicity and Detection, Marcel Dekker, INC. New Yourk. USA.1983.121-218.
24. Mackenze Donald W.R. Serodiagnosistests, Evans E. G.V, Richardson M.D. Medical Mycology, A practical approach, IRL Press, university of Glasgow, United Kingdom, first ed. 1989. 221-224.
25. Novikova N. March PA. Characterization of woman with a history of recurrent vulvovaginal candidiasis. Acta Obset Gynecol Scand 2002 (.81:)1047-1052.
26. Falahati M., Sharifynia S., Foroumadi A., Bolouri F., Akhlaghy L., YazdanparastA.et al. Drug resistance pattern in Candida species isolated from vaginitis. Journal of Iran university of medical science.1388.(65):40-45.(Persian).
27. Kalkanci A., Kustimuy S., Bozdayi G., Biri A. Virulence factor and susceptibility patterns of Candida strains isolated from patients with vulvovaginal candidiasis. Turk Microbiyol Cem Derg.2003.(33):323-328.
28. Richter SS., Galask RP., Messer Sh A., Hollis RJ., Diekema DJ., Pfaller MA. Antifungal susceptibilities of Candida species causing vulvovaginitis and Epidemiology of Reccurrent Cases. Clinical Microbiology. 2005. (43):2155-2162.
29. Mackenzie Donald W.R, Serodiagnosis, Howard Dexter. H , Fungi pathogenic for HHumans and Animals (In three parts), part B pathogenicity and Detection, Marcel Dekker, INC, New York, USA, 1983,121-218.
30. Warnock D.W, Hilton A.L., Value of the indirect immunofluorescence test in the diagnosis of vaginal candidiasis, Department of Microbiology andvenereology. BristolRoyal Infirmary. 1976. (52):187-189.

Original Article

Evaluation of serological diagnosis indirect immunofluorescence and ELISA in comparison to direct examination and culture in vulvovaginal candidiasis

Mina Sharifi Sorkherizi, MSc. in Mycology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. minasharifi@yahoo.com
***Mehraban Falahati, PhD.** Associate Professor of Mycology, Medicine Faculty, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. (*Corresponding Author). mehrabanfalahati@yahoo.com.
Farideh Zeini, PhD. Professor of Mycology, Health Faculty, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. fzaini@tums.ac.ir
Lame Akhlaghi, PhD. Associate Professor of Parasitology, Medicine Faculty, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. z_razi_lab@yahoo.com
Fariba Haydari-Kohan, MD. Gynecologist, Lolagar Hospital, Tehran, Iran.dr_heidarie@yahoo.com
Mohsen Ghelman, BSc. in Laboratory Sciences. Paramedicine Faculty, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. mohsen-ghelman@yahoo.com
Somayeh Sharifiniya, MSc. in Mycology, Medicine Faculty, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ssharifynia@yahoo.com

Abstract

Background: Vulvovaginal candidiasis occurs due to the overgrowth of candida in genital system mucosa of females. Symptoms and signs of vulvovaginal candidiasis are unspecific, therefore diagnosis is not certain. The aim of this research was comparison of the result of indirect immunofluorescence and ELISA with culture and direct microscopy examination in patients with vulvovaginal candidiasis.

Methods: This was a comparative-descriptive study performed on 87 patients and 50 normal cases as controls. All specimens were examined using direct microscopy, culturing and complimentary test to differentiate the candida species from each other. Serological tests such as indirect immunofluorescence and ELISA were performed on sera of the patients. To compare the quantitative and qualitative data, t-student test, chi-square and exact fisher test were used, if necessary.

Results: Out of 87 specimens, 50 cases were diagnosed as vulvovaginal candidiasis. The most frequent isolated pathogens were C.albicans, C.glabrata, C.kefyr, C.inconspicua and C.famata, respectively. Also, in control group, the most frequent pathogens were C.albicans, C.glabrata and C.kefyr, respectively. In this study all of normal cases were negative in indirect immunofluorescence test and in patients group 42 person (84%) were positive and 8 (16%) negative. Control participants were negative in ELISA and in patient group 40 person (80%) were positive and 10 person (20%) negative.

Conclusion: It seems in cases that direct microscopic and culturing methods is impossible, ELISA and indirect immunofluorescence can be used as an alternative method.

Keywords: Vulvovaginal candidiasis, Diagnosis tests, Indirect immunofluorescence ELISA.