

القياس الكمي للكلوبيولينات المناعية واستخدام تقنية الممتز المناعي والمتمم الثالث والرابع المرتبط بالانزيم (ELISA) في تشخيص داء المبيضات المهبلية

امنة نصيف جاسم* هديل عبد اللطيف مجيد* خالد عبد الرزاق حبيب*

تاريخ قبول النشر 2006/ 6/ 20

الخلاصة:

اجريت هذه الدراسة لتقدير الكلوبيولينات المناعية والمتمم كميًا واستخدام تقنية الممتز المناعي المرتبط بالانزيم (ELISA) في تشخيص داء المبيضات المهبلية. اظهرت نتائج الدراسة زيادة في تركيز الكلوبيولين المناعي صنف M بشكل معنوي عند النساء المريضات مقارنة بنساء السيطرة، وقد شهد بروتين المتمم C4 ارتفاعاً معنوياً في تركيزه عند مريضات داء المبيضات المهبلية مقارنة بمجموعة السيطرة. تم الكشف ايضاً عن مضاد الكلوبيولين المناعي IgG والخاص بالمبيضات البيضاء بأستعمال تقنية الـ (ELISA) كما اظهرت النتائج ان هذا المضاد المناعي موجود لدى 63.8% من النساء المصابات بداء المبيضات المهبلية، وكان للفحص نسبة تحسسية مقدارها 63% ونسبة تخصصية مقدارها 89%.

الكلمات المفتاحية: Vulvovaginal Candidiasis, ELISA, Candida spp.

المقدمة

لقد دأبت الدراسات الحديثة على استخدام الطرائق المناعية في التشخيص المبكر للاصابة بالامراض ومنها داء المبيضات المهبلية الذي تسببه انواع من الخمائر تابعة للجنس *Candida*، حيث ان الجهاز المناعي للمضيف له دور كبير في حماية الجسم من الاصابة الفطرية *Fungal* [1] infection. تناولت بعض الابحاث دراسة مستضدات جنس المبيضات *Candida* بسبب تعقيد تركيب هذه المستضدات، اذ استعملت في الفحوصات المصلية والمناعية للكشف عن الاصابة بداء المبيضات حيث لوحظ ان مستوى الاضداد للمبيضات *Anti Candida Antibodies* في امصال مرضى داء المبيضات المهبلية مرتفع نوعاً ما وعلى الاخص في الاصابات المزمنة، وهكذا اقترحت الدراسات الحديثة دور الاضداد في الحماية ومنع اصابة المهبل بالمبيضات [2,3]. نظراً لقلة الدراسات المناعية في هذا المجال فقد هدفت دراستنا الى محاولة تقدير الكلوبيولينات المناعية والمتمم واستخدام تقنية الممتز المناعي المرتبط بالانزيم (ELISA)

Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay.

المواد وطرائق العمل

اولاً: جمع العينات **Sample collections**
1. المسحات المهبلية High Vaginal Swaps

2. عينات الدم والامصال Blood and Serum samples
جمعت العينات المذكورة اعلاه من النساء اللواتي يراجعن مستشفى اليرموك التعليمي- قسم النسائية والتوليد- العيادة الاستشارية وقد اختيرت للدراسة مجموعتان من النساء. المجموعة الاولى: وفيها 200 سيدة تتراوح اعمارهن بين 17-65 وقد قسمت هذه المجموعة الى اربعة مجاميع ثانوية وهي كالاتي:

1. حوامل في الشهر الثالث.
 2. حوامل في الشهر السادس.
 3. حوامل في الشهر التاسع.
 4. سيدات مصابات بداء السكري.
- المجموعة الثانية: وتضم خمسين سيدة بحالة صحية جيدة تراوحت أعمارهن بين 15-55 سنة.

-الفحص المباشر Direct Examination

تم فحص العينة مباشرة وذلك من خلال عمل شريحتين، الاولى هي Smear، اذ دحرجت المسحة على الشريحة الزجاجية وصبغت بصبغة كرام، أما الشريحة الثانية فوضعت عليها قطرة من نقيع المسحة بالمحلول الفسلجي، وفحصت تحت القوة (x40) بعد وضع غطاء الشريحة عليها لملاحظة خلايا الخمائر

3 دقائق واحاطة الانبوبة بالتلج اثناء عمل الجهاز، اخذت قطرة من المزيج وفحصت تحت المجهر لملاحظة تكسر الخلايا، عرضت للنزب المركزي بعد تكسرها ولمدة 5 دقائق بمقدار 1000 دورة بالدقيقة (rpm) للتخلص من حطام الجدار الخلوي اخذت المادة الطافية وقيس فيها تركيز بروتين المستضد الذائب بأتياع طريقة Bradford [7]، ثم حفظت تحت درجة -20 م° لحين الاستعمال.

2. تقدير البروتين Protein Estimation
استخدام محلول البايوريت Biurate Solution ، اذ اعتمدت هذه الطريقة على تفاعل مجموعة الكاربوميل للبروتينات مباشرة مع محلول النحاس القلوي لتكوين مركب بنفسجي اللون يمكن قراءته بجهاز الطيف الضوئي Spectrophotometer بطول موجي 450nm، أجري الفحص كما موضح بالجدول الآتي:

نماذج (5ml) Sample	محلول قياسي (5ml) Standard	كفاء المحاليل (5ml) Blank	انابيب الاختبار
5	5	5	محلول البايوريت
-	2	-	محلول قياسي للبروتين
0.2	-	-	النماذج

مزجت الانابيب بأستخدام المازج Vortex ووضعت في حمام مائي لمدة 10 دقائق بدرجة 37 م°، بعدها تم قياس الامتصاصية لكل الانابيب بطول موجي 450 nm. واجريت الحسابات كما في المعادلة الآتية:

$$\frac{\text{البروتين الكلي}}{\text{المحلول القياسي- كفاء المحاليل}} = \frac{\text{النماذج - كفاء المحاليل}}{5 \times 100 \text{ غم}}$$

رابعا : اختبار الممتز المناعي المرتبط بالانزيم ELISA

1. أضيف مستضد الخميرة الى 5 مايكروغرام/ مل من محلول الاكساء Coating Buffer
2. أضيف 200 µl من المستضد المعزول والمذاب في محلول الاكساء الى كل حفرة من حفر اللوح البلاستيكية Nute Plate ذات القاع المسطح الخاصة بهذا الاختبار، غطي اللوح بغطاء ووضع حفظت في الثلاجة تحت درجة حرارة 4 م° لمدة 24 ساعة،
3. سكب محتويات الحوض وغسل اللوح ثلاث مرات بمحلول الغسيل Washing Buffer.
4. أضيف 100 µl من نماذج المصل بتخفيف 100:1 وحضن بدرجة 37 م° لمدة ساعة ثم غسل اللوح كما في الفقرة السابقة.
5. أضيف 100 µl من المقترن المضاد للكلوبولين البشري المرتبط بأنزيم البيروكسيداز Anti Human Peroxidase IgG في كل حفرة

وخلايا الدم البيض (WBC) والخلايا الطلانية epithelial cells [4].

-الزرع المختبري
بعد نقل العينة (المسحة المهبلية) الى المختبر، تم زرعها بالتخطيط في وسط مناسب Malt Extract Agar مع مراعاة عمل ثلاثة مكررات للعينة الواحدة، حضنت الاطباق تحت درجة حرارة 37 م° لمدة 48 ساعة، تم فحص النمو وعمل زرع ثانوي Sub-Culture من الاطباق التي اظهرت نتيجة موجبة [5].

ثانيا- التقدير الكمي للكلوبولينات المناعية والمتمم

Quantitative Determination of Immunoglobulin and Complement

استعملت طريقة الانتشار المناعي Single Radial Immuno Diffusion لقياس مستوى الكلوبولينات المناعية IgM, IgA, IgG وبروتينات المتمم C3, C4 وذلك بأستعمال الاطباق المجهزة من شركة Bio megrhab وقد اعتمدت تعليمات الشركة المجهزة وكما يأتي:

1. قبل البدء بالعمل فتحت الاطباق وتركت في درجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق
2. اضيف 5 µl من المصل في كل حفرة
3. حضنت الاطباق في الحاضنة بدرجة 25 م° لمدة 48 ساعة للـ C3, C4, IgA, IgG ولمدة 72 ساعة للـ IgM
4. قيس قطر حلقة الترسيب المناعي Immuno Precipitation المتكونة حول الحفرة بالمليمتر بواسطة عدسة مزودة بمسطرة
5. حسب مستوى العوامل في أعلاه من خلال جدول مرفق بالاطباق من قبل الشركة المجهزة ويعبر عن القيمة بـ (mg/l) وحدات قياس عالمية [6].

ثالثا: استخدام تقنية الممتز المناعي المرتبط بالانزيم (ELISA)

Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay لتشخيص داء المبيضات المهبلي

1. تحضير مستحضر المبيضات البيضاء Candida albicans تم حقن 250 مل من وسط (MEB) بالخميرة C. albicans بعد تعقيمه بالموصدة. حضنت تحت 37 م° لمدة 48 ساعة، لوحظ تكون راسب الخميرة في قعر القارورة flask، حصد الراسب بعد نبذه، ثم جمع وغسل ثلاث مرات بداريء الفوسفات Phosphate Buffer Saline وترك ليذوب، ثم اخذت حجوم متساوية من راسب الخميرة وحبيبات الزجاج Glass beads ووضعها في انبوبة معقمة ومزجا بالمازج Vortex لمدة ساعتين مع مراعاة اطفاء الجهاز كل

و غطي اللوح ووضع في درجة حرارة 37 م° لمدة ساعة.

6. غسل اللوح كما في الفقرة 3

7. أضيف 100 µl من مادة Tetra Methyl Benzidin (TMB) لكل حفرة وترك لمدة 10 دقائق في مكان مظلم

8. أوقفت عملية التفاعل بأضافة 100 µl حامض الهيدروكلوريك (1مولاري) وقيست درجة الامتصاص بطول موجي 540 nm

خامسا : حساسية اختبار الـ (ELISA)

تم قياس الحساسية بالمقارنة مع نتائج الزرع المختبري وفق المعادلة الآتية:
عدد الحالات الموجبة

$$\text{الحساسية} = \frac{\text{عدد الحالات الموجبة}}{\text{عدد الحالات الموجبة} + \text{عدد الحالات السالبة}} \times 100$$

النتائج

أولاً: التقدير الكمي للكلوبيولينات المناعية والمتمم
أوضحت نتائج هذه الدراسة حصول زيادة معنوية في معدل مستوى الكلوبيولين المناعي صنف IgM ($P < 0.01$) لدى مريضات داء المبيضات المهبلي بالمقارنة مع نساء السيطرة ، بينما لم تظهر النتائج أي فروقات معنوية في معدل مستوى الكلوبيولينات المناعية من صنف IgA و IgG بين المجموعتين ، أما بالنسبة لنظام المتمم فقد أظهرت النتائج وجود زيادة معنوية في معدل مستوى C4 بين المريضات مقارنة مع نساء السيطرة بينما لم تظهر أي فروق معنوية في معدل مستوى C3 لدى المريضات مقارنة مع نساء السيطرة (جدول 1).

جدول (1) : معدل تركيز الكلوبيولينات المناعية (IgA , IgM , IgG) ونظام المتمم (C3,C4) لدى مريضات داء المبيضات المهبلي ونساء السيطرة مقدرا بوحدات الـ (mg/1)

MEAN±S.D(mg/1)					
C4	C3	IgA	IgM	IgG	العينة
0.4029±0.1036	1.2948±0.496	1.9630±1.337	2.622±0.995	11.4014±4.840	نساء مصابات بداء المبيضات المهبلي n=30
0.2350±9.932E-2	1.1400±0.555	1.6200±0.310	1.535±1.033	10.8873±4.380	نساء السيطرة n=20
0.003	0.415	0.391	0.006	0.764	P

جدول (2) : حساسية ونوعية اختبار الـ (ELISA) في تشخيص الإصابة بداء المبيضات المهبلي

المجموع	الزرع المختبري سالب بالنسبة للمبيضات	الزرع المختبري موجب بالنسبة للمبيضات	
46	2	44	الاضداد (+) Anti body positive 1.7964 وأعلى
43	17	26	الاضداد (-) Anti body Negative 1.7964 وأقل
89	19	70	المجموع

النسبة المئوية 78.6% 21.34%

المناقشة

داء المبيضات المهبلي من الحالات المرضية الشائعة في فترة الحمل في هذا البحث لم تحصل زيادة في الكلوبيولين صنف IgG ولكن الزيادة حصلت في الصنف IgM لديهن عند مقارنتهن مع نساء السيطرة وقد يعود ذلك الى كفاءة هذا الكلوبيولين لكونه يحتوي على خمسة مواقع ارتباط جعلته يمتلك ألفة عالية للمستضدات مقارنة بـ IgG [8]. قد يكون الارتفاع في معدل تركيز هذا الصنف هو نتيجة العوامل المهيبة لهذه الحالة كالحمل وعلى الاخص في الاشهر الثلاث الاخيرة إذ يرتفع تركيز الـ IgM في هذه الفترة ، لان

ثانيا : تقنية المتمز المناعي المرتبط بالانزيم (ELISA) لتشخيص الإصابة بداء المبيضات المهبلي

تمكن الاختبار من الكشف عن 44 حالة مرضية بداء المبيضات المهبلي من مجموع 70 مريضة بهذا الداء إذ كانت عيارية الاضداد المضادة للمبيضات لديهن أعلى من 1.7963 ، أما المجموعة الاخرى وعددها 19 ، فكانت 7 منهن مريضات بالتهابات مهبليية اخرى و12 من مجموعة السيطرة إذ اظهر الاختبار ارتفاعا في عيارية الاضداد للمبيضات لاثنتين من هذه المجموعة بلغت حساسية الاختبار Sensitivity لامصال مجموعة داء المبيضات المهبلي 63 % (جدول 2) ، وقد كانت النتائج الموجبة لفحص الـ (ELISA) متمثلة باللون الأزرق الغامق في قعر الصفيحة البلاستيكية الخاصة بهذا الفحص ، إذ يعزى هذا اللون الى حدوث تفاعل بين انزيم البيروكسيداز مع المادة الاساس (TMB) ، اما بالنسبة للنتائج السالبة فقد ظهرت باللون الأصفر الفاتح.

- analysis of Sera from Patients with candidal Vaginitis and healthy females .J.Med. Vet .Mycol.; 30: 281 – 292.
4. Milne, L.J.R. 1989. Direct Microscopy in : Medical Mycology A Practical approach .E.G.V. Evans and M.D. Richardson (eds). IRL. Press Oxford Univ. Press. pp299 .
 5. Richardson, M.D. and E. Evans. V. G. 1989. Culture and Isolation of Fungi in: Medical Mycology A Practical approach .E.G.V. Evans and M.D. Richardson (eds). IRL. Press Oxford Univ. Press.pp299.
 6. Mancine ,J.; Carbonan O. A. and Hermans J. .1965. Immuno Chemical quantitation of Antigen by Singal Radial Immuno diffusion. Immuno Chem .,2:234 – 254.
 7. Bradford ,M.M.1976. A rapid and sensitive Method for the Quantization of Microgram quantization of protein Utilizing the principle of protein dye binding – Aral Biochem .,72:248 – 254.
 8. Mathews ,R.C ; Burnie P. J. and Tabaqchli S, . 1987. Isolation of Immuno dominant Antigens from sera of Patients with systemic Candidiasis and Characterization of serological response to *Candida albicans* .J.Clin. Microbiol. 25(2) 230 – 237.
 9. Gusdon ,J.P. 1969 . Fetal and Material Immunoglobulin levels during pregnancy . Am.J.Obstet. Gynece ; 103:895 – 900.
 10. Rogers ,T.J and Balish E. 1980. Immunity to *Candida albicans* Microbial Rev; 44 : 560 – 582 .
 11. Ashman , R.B and J. Papadimitrou M. . 1995. Production and Function of Cytokines in natural and acquired Immunity to *Candida albicans* Infection Microbial Rev., 59 : 664 – 672 .
- الجنين مثابة مستضد جيد يحفز جسم الام على أنتاج هذا الصنف [9].
 أما معدل تركيز الصنف (IgA) فقد شهد زيادة خفيفة في دراستنا لم يثبتها التحليل الاحصائي على الرغم من الافرازات المهبلية والمصلية لمريضات داء المبيضات المهبلية غالبا ما تشهد زيادة في مستوى (IgA) [10].
 أظهرت نتائج معدلات تركيز نظام المتمم (C3 و C4) زيادة معنوية في معدل التركيز الـ C4 (جدول 2) ، وهي خطوة مهمة لتنشيط الـ (C3) المهم في عملية القضاء على المبيضات ، اذ ينتج في عملية تنشيطه عوامل جذب كيميائي تجذب خلايا الدم البيض لموقع الإصابة [11].
 تم تقييم حساسية الاختبار ونوعية الاختبار المناعي الـ ELISA في تشخيص الإصابة بداء المبيضات المهبلية باستخدام المستضدات الساييتوبلازمية للمبيضات. ان هذا الاختبار قادر على تحديد مستوى الاضداد المضادة للمبيضات Anti Candida IgG Anti bodies لدى المريضات لذا تقترح ان هذا الاختبار يعد مفيدا للتحديد والتشخيص السريع لداء المبيضات المهبلية ، اذ تم مقارنة قيمة الـ (Cut off) بين النساء الطبيعيات والنساء المصابات ، اذ كانت قيمة الـ (Cut off) للنساء الطبيعيات مساوية للـ (1.7963) ، وان معظم مريضات داء المبيضات المهبلية كانت نتائج قراءة الكثافة الضوئية لنماذج أمصالهن هي اعلى من تلك القيمة ، اما الحالتان اللتان أظهرتا نتيجة موجبة على الرغم من ان الإصابة المهبلية كانت لمسبب اخر لاحدهما والحالة الاخرى كانت لامرأة طبيعية ، فهي اما إصابة مسبقا بداء المبيضات المهبلية او نتيجة تفاعل تصالبي مع احياء مجهرية أخرى [12].

المصادر:

1. Granger, S.E.1992. The aetiology and Pathology of Vaginal Candidiasis . Brit.J.Clin Pract.46.
2. Little , C.H ; G. Georgiou M. ; Marceglia A; Ogedgebe H. ; Cone E. R.& Mazz D. 2000. Measurment of T- Cells derived Antigen Binding Molecules and Immunoglobulin G Specific to *Candida albicans* Mannan in Sera Patients with Recurrent Vulvo vaginal Candidiasis .Infect. Immun .:68: 3840 – 3847 .
3. Ishiguro, Homma M. A; ; Sukai T. ; Higashide K.; torii S. and K.Tanaka.1993 .Immunoblotting

Theory of Enzyme immunoassay .
+

12. Tijssen ,P. 1985. Laboratory
Techniques in biochemistry and
Molecular biology , Practice and

Estimation of Immunoglobulins and complements and Using Enzyme linked Immuno sorbant Assay in Identification of Vulvovaginal candidiasis

*Amna. N. Jassim**

*Hadeel. A. Majeed**

*Khalid. A. Habib**

*College of Science for Women- Baghdad University

Abstract:

This study was conducted to determine the Immuno – globulins and complements quantitatively. The result revealed that the concentration of Immunoglobulin M(IgM) was increased significantly in patient group comparing with control group . The concentration of complement protein C4 was increased significantly in patient group comparing with control group.

IgG of *Candida albicans* was detected by using ELISA Technique, the result indicated also that this antibody was found in 628% of the women who infected with Vulvovaginal Candidiasis. The sensitivity and specificity of the test were 63% and 89% respectively.