

Κλινικοεργαστηριακή
Μελέτη

Προσδιορισμός του πολυσακχαριδικού αντιγόνου-mannan-του κυτταρικού τοιχώματος της *Candida albicans* για τη διάγνωση της καντιντιασικής κολπίτιδας

Β. Παπαεμμανουήλ¹
Ν. Γεωργογιάννης²
Α. Ντούμας¹
Α. Παπαδημητρίου²

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η μέτρηση των επίπεδων του πολυσακχαριδικού αντιγόνου mannann της *Candida Albicans* με την ανοσοενζυμική μέθοδο Elisa, που αξιολογήθηκε σαν μία εναλλακτική ευαίσθητη μέθοδο, για τη γρήγορη διάγνωση της κολπικής καντιντίασης.

Το υλικό της μελέτης προήλθε από το κέντρο οικογενειακού προγραμματισμού του Γενικού Κρατικού Νοσοκομείου Νίκαιας όπου συγκεντρώθηκαν και εξετάστηκαν τα κολπικά εκπλύματα 98 γυναικών. Αυτές οι γυναίκες εξετάστηκαν κλινικά και, από τα αντικειμενικά ευρήματα, θεωρήθηκε ότι έπασχαν από φλεγμονή του κόλπου που έμοιαζε με κολπική καντιντίαση. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τρεις: η μικροσκοπική εξέταση, η καλλιέργεια και η ανοσοενζυμική μέθοδο Elisa, προκειμένου να προσδιοριστεί η ποσότητα των βλαστομυκήτων (βιώσιμοι μικροοργανισμοί-επίπεδα mannann). Θετικές καλλιέργειες για *Candida* με την μέθοδο Elisa βρέθηκαν σε ποσοστό 85,1% των ασθενών, έναντι 80% και 73% των άλλων διαγνωστικών μεθόδων. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν σημαντική σχέση μεταξύ υψηλών συγκεντρώσεων του mannann και ασθενών με σοβαρά κλινικά συμπτώματα.

Συμπερασματικά, το αντιγόνο mannann είναι πιο ευαίσθητη μέθοδος από την καλλιέργεια και μπορεί να αξιοποιηθεί περαιτέρω και να χρησιμοποιηθεί για τη γρήγορη εργαστηριακή διάγνωση της χρόνιας και υποτροπιάζουσας καντιντιασικής αιδοιοκολπίτιδας.

Όροι ευρετηρίου: κολπική καντιντίαση, mannann του κυτταρικού τοιχώματος της *Candida*, ανοσοενζυμική μέθοδος Elisa.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι κολπικές καντιντιάσεις προκαλούνται από τους βλαστομύκητες του γένους *Candida* και κυρίως από την *Candida albicans* (C-albicans), η οποία είναι ευκαιριακά παθογόνος μύκητας που μολύνει το 75% των γυναικών της αναπαραγωγικής ηλικίας¹. Η *Candida* spp. αποικίζει το κατώτερο γεννητικό σύστημα της γυναίκας σε συχνότητα 5-55%, δεν έχει όμως διαπιστωθεί σε ποια πυκνότητα ακριβώς θεωρείται αποικισμός ή λοίμωξη^{2,3}.

Τα συμπτώματα της μυκητιασικής αιδοιοκολπίτιδας είναι κνησμός, αίσθημα καύσου, δυσπαρέυνια, γαλακτώδες έκκριμα, οίδημα, ερυθρότητα της πάσχουσας περιοχής και μπορεί να συνυπάρχουν είτε στον αποικισμό είτε στη λοίμωξη^{4,5}.

¹Μικροβιολογικό Εργαστήριο
Γ.Α.Ν. Πειραιά «Μεταξά»

²Μαιευτική-Γυναικολογική κλινική
Γ.Ν. Νίκαιας Πειραιά «Άγιος
Παντελεήμων»

Αλληλογραφία:

Δρ. Β. Παπαεμμανουήλ

Βιοπαθολόγος-Κλινικός Μικροβιολόγος

Ελικώνος 18, Πειραιάς 18 540

Τηλ.: 210-4135258

Κατατέθηκε: 7/7/08

Εγκρίθηκε: 4/9/08

Οι προδιαθεσικοί παράγοντες της καντιντιασικής αιδοιοκολπίτιδας είναι η κύηση, η θεραπεία με κορτικοστεροειδή, η χρήση αντισυλληπτικών χαπιών, η θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης, η χρήση αντιβιοτικών και ο μη ελεγχόμενος σακχαρώδης διαβήτης⁶. Η υποτροπιάζουσα καντιντιασική κολπίτιδα εμφανίζεται σε ποσοστό 5-10% των γυναικών και ορίζεται ως 3 ή περισσότερα επεισόδια λοίμωξης ανά έτος χωρίς να υπάρχουν κάποιοι προδιαθεσικοί παράγοντες στο ιστορικό της.

Η ικανότητα του βλαστομύκητα *Candida albicans* (*C. Albicans*) να προκαλέσει λοίμωξη, εξαρτάται από δύο λόγους: τη λοιμογόνο ικανότητα του μύκητα και την ικανότητα του ξενιστή να εμποδίζει ή να περιορίζει τα όρια της παθογονικότητας του μύκητα. Πιστεύεται ότι η παθογονικότητα, που αποδίδεται στον υπεύθυνο μύκητα, παράγεται *in vivo* όταν ο μύκητας αλλάζει και από αποικιστής γίνεται παθογόνος⁷. Ως εκ τούτου, είναι πιθανόν ο αριθμός των βλαστοκυττάρων που υπάρχουν να καθορίζουν τα αντικειμενικά ευρήματα (κλινικά σημεία) που οφείλονται στην καντιντιασική κολπίτιδα⁸. Έτσι λοιπόν, κατά τον Evans και συν.⁹ και τον Le Blanc και συν.¹⁰, η παρουσία μεγάλου αριθμού βλαστοκυττάρων στον κόλπο σχετίζεται με κολπική καντιντίαση που συνοδεύεται από σοβαρά κλινικά συμπτώματα, ενώ ένας χαμηλός αριθμός βλαστοκυττάρων συνοδεύεται από αποικισμό.

Ο Odds και συν.¹¹ προτείνουν ότι, αν στην καλλιέργεια δείγματος κολπικού υγρού βρεθούν λιγότερο από 10 αποικίες *Candida spp* θεωρείται ως ασυμπτωματικός φορέας, και μόνο αν υπάρχουν δύο από τα κλασικά κλινικά συμπτώματα της κολπικής καντιντίας, δηλαδή κνησμός και άφθονες κολπικές εκκρίσεις, τότε να συνδέονται με τον αριθμό των αποικιών της *Candida spp*. Σήμερα, όλες οι μελέτες καθορίζουν το ποσό της υπάρχουσας *Candida spp* στον κόλπο από τον αριθμό των αποικιών που σχηματίζονται, κατόπιν καλλιέργειας δειγμάτων κολπικών υγρών ή κολπικών εκπλυμάτων. Αυτή η μέθοδος είναι ανακριβής διότι η αρίθμηση των αποικιών της *Candida* καταλήγει σε υποτίμηση του πραγματικά υπάρχοντα αριθμού.

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ανοσοενζυματικής μεθόδου Elisa που ανιχνεύει ποιοτικά και ποσοτικά το πολυσακχαριδικό αντιγόνο mannan του κυτταρικού τοιχώματος της *C. Albicans*. Έτσι, αξιολογήθηκε η ύπαρξη της *C. Albicans*, συγκρίνοντας τις τιμές των επιπέδων του mannan που προσδιορίστηκαν με ELISA με τον αριθμό αποικιών της *Candida spp* κατόπιν καλλιέργειας από τα κολπικά εκπλύματα γυναικών με κολπική καντιντίαση, με σκοπό όχι μόνο τη σύγκριση των 2 μεθόδων, αλλά και την ικανότητα της νέας μεθόδου στη διάγνωση υποτροπιάζουσας καντιντίας ή απλού αποικισμού.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Το υλικό της μελέτης αποτελείται από τα κολπικά

ΕΠΩΝΥΜΟ:				
ΟΝΟΜΑ:				
ΗΛΙΚΙΑ:	ΤΕΡ:		ΚΑΤΑΓΩΓΗ:	
ΑΙΣΘΗΜΑ ΚΑΥΣΟΥ:	+	++	+++	++++
ΚΝΗΣΜΟΣ:	+	++	+++	++++
ΔΥΣΠΑΡΕΥΝΙΑ:	+	++	+++	++++
ΑΛΓΟΣ ΥΠΟΓΑΣΤΡΙΟΥ:	+	++	+++	++++
ΣΥΧΝΟΥΡΙΑ:	+	++	+++	++++
ΔΥΣΟΥΡΙΑ:	+	++	+++	++++
ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΥΠΟΤΡΟΠΗΣ ΚΟΛΠΙΤΙΔΩΝ:	ΝΑΙ ΟΧΙ			
ΧΡΗΣΗ ΑΝΤΙΒΙΩΣΗΣ:				
ΧΡΗΣΗ ΑΝΤΙΣΥΛΛΗΠΤΙΚΩΝ:				
ΔΙΑΒΗΤΗΣ:				
ΕΡΥΘΡΟΤΗΤΑ ΑΙΔΟΙΟΥ:	+	++	+++	++++
ΚΟΛΠΙΚΑ ΥΓΡΑ:	+	++	+++	++++
ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΤΡΑΧΗΛΙΤΙΔΑ:	+	++	+++	++++
ΔΥΣΟΣΜΙΑ:	+	++	+++	++++

Εικόνα 1. Το ερωτηματολόγιο-ιστορικό που χρησιμοποιήθηκε στην έρευνα.

εκπλύματα 98 γυναικών που προσήλθαν στο κέντρο οικογενειακού προγραμματισμού του Γενικού Νοσοκομείου Νικαίας Πειραιά με συμπτώματα φλεγμονής του κατώτερου γεννητικού συστήματος, που έμοιαζαν με μυκητιασική αιδοιοκολπίτιδα. Γυναίκες που είχαν λάβει αντιμυκητιασική θεραπεία τις τελευταίες 4 εβδομάδες αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Το ερωτηματολόγιο-ιστορικό που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στην εικόνα 1.

Η ηλικία των γυναικών κυμάνθηκε από 26-39 ετών. Η σοβαρότητα της αιδοιοκολπίτιδας βαθμολογήθηκε από το 0 έως το 3 (στην κατηγορία με βαθμό 1 ανήκαν γυναίκες με ήπια συμπτώματα, στην κατηγορία με βαθμό 2 ανήκαν γυναίκες με πιο προχωρημένα συμπτώματα και στην κατηγορία με βαθμό 3 ανήκαν γυναίκες με έντονα συμπτώματα όπως ερυθρότητα και οίδημα). Παράλληλα, συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα μελέτη η εξέταση κολπικών εκπλυμάτων 20 γυναικών που δεν παρουσίαζαν σημεία κολπικής φλεγμονής κατά την κλινική εξέταση (υγιείς μάρτυρες). Σε όλες τις γυναίκες πραγματοποιήθηκε έλεγχος ουρογεννητικών λοιμώξεων για σύφιλη, γονόκοκκο, τριχομονάδες, χλαμύδια, αιμόφιλο, μυκόπλασμα και ουρεόπλασμα.

Τα κολπικά εκπλύματα ελήφθησαν κατόπιν εκχύσεως 10 ml αποστειρωμένου νερού στον κόλπο με μία

Πίνακας 1. Συχνότητα ανεύρεσης μυκήτων σε 80 από 94 καλλιέργειες κολπικών εκπλυμάτων γυναικών με συμπτώματα κολπικής καντιντίασης

Είδος μύκητα	Αριθμός θετικών δειγμάτων	Ποσοστό
<i>Candida albicans</i>	67	83,75%
<i>Candida glabrata</i>	5	6,25%
<i>Candida tropicalis</i>	3	3,75%
<i>Candida parapsilosis</i>	2	2,5%
<i>Candida krusei</i>	3	3,75%

σύριγγα και, κατόπιν εισροφήσεως, έγινε η λήψη των εκπλυμάτων. Έγινε μικροσκοπική εξέταση των δειγμάτων. Η παρουσία και η ποσότητα των βλαστομυκήτων στα δείγματα καθορίστηκε με δεκαπλάσιες αραιώσεις κάθε κολπικού εκπλύματος σε απεσταγμένο νερό. 0,1 ml από κάθε διάλυμα καλλιεργήθηκε σε τριβλία 8,5 cm διαμέτρου με Sabourand glucose agar, που περιείχε chloramphenicol (0,5g/l). Ο αριθμός των αποικιών, που αναπτύχθηκαν μετά από 48 h στους 37°C με υπολογισμό των αραιώσεων, ανήλθαν από 20-300 αποικίες ανά τριβλίο. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε αριθμό αποικιών (colony forming units–cfu/ml). Οι μύκητες που αναπτύχθηκαν, τακτοποιήθηκαν με τη μέθοδο εκβλαστήσεως του σωλήνος (germe tube test)³ και με το σύστημα API 20 Aux (Biomerieux, Marcy h' Etoile, France).

Από κάθε δείγμα κολπικού εκπλύματος ελήφθη ποσότητα 1 ml, αναμίχθηκε με 0,4 ml 100mM EDTA σε 100ml glycine–buffered saline και έβρασε για 3 min. Το στερεό υπόλειμμα πετάχτηκε και το υπερκείμενο που περιείχε το απόσταγμα του mannan αντιγόνου, αφού υπέστη θερμοκή επεξεργασία, αναροφήθηκε. Το mannan αντιγόνο του κυτταρικού τοιχώματος της *Candida* προσδιορίστηκε ποιοτικά και ποσοτικά με την ανοσοενζυματική μέθοδο (Sandwich) Elisa^{12,13,14}, τόσο στα κολπικά εκπλύματα των συμπτωματικών γυναικών, όσο και σε αυτά των υγιών μαρτύρων. Τα αντιδραστήρια για τον προσδιορισμό των επιπέδων του mannan πολυσακχαριδικού κυτταρικού αντιγόνου της *Candida* ήταν της εταιρείας Serion (Gebrauchsanweisung–Deutsch).

Η ερμηνεία δείγματος ασθενή ως θετικό δίνεται όταν ο υπολογισμός δίνει 2,3 μονάδες ή περισσότερες. Τα αποτελέσματα της δοκιμής σε μονάδες ανά ml είναι η ποσότητα mannan που αντιστοιχεί σε 2,3 ng πρωτεΐνης της *Candida*. Η δοκιμή ανιχνεύει τόσο τους βιώσιμους, όσο και τους μη βιώσιμους οργανισμούς, καθώς και τα συστατικά τους.

Τα είδη *Candida* που θα μπορούσαν να δώσουν διασταυρωμένες αντιδράσεις με τη μέθοδο Serion Elisa antigen *Candida* είναι: η *Candida guilliermondi*, η

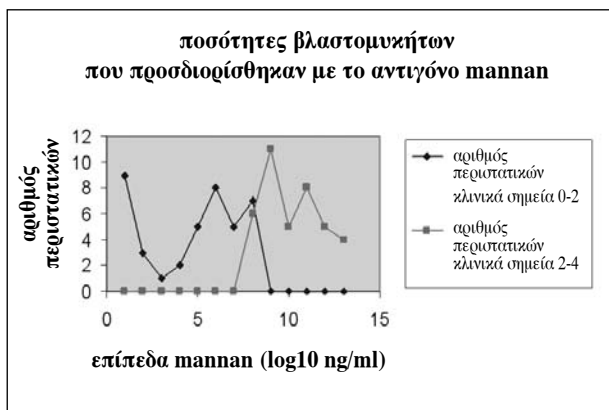
Candida glabrata, η *Candida parapsilosis*, η *Candida tropicalis* και η *Candida orientalis*.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το t-test για την ανάλυση των ποσοτικών δεδομένων και με τη δοκιμασία χ^2 για την ανάλυση ποιοτικών δεδομένων. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Wilcoxon για τις μη κανονικές κατανομές των ποσοτικών μεγεθών. Σε μη κανονικές κατανομές ή και σε διατάξιμα μεγέθη, χρησιμοποιήθηκε και ο συντελεστής του Spearman (SPSS software).

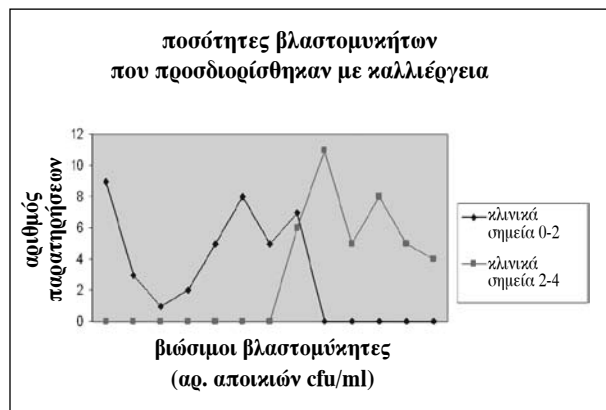
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από τις 98 εξετασθείσες γυναίκες με κλινικά συμπτώματα μυκητιασικής λοίμωξης, οι τέσσερις είχαν συνυπάρχουσα μη-καντιντιασική κολπική λοίμωξη και εξαιρέθηκαν από τη μελέτη. Θετικές καλλιέργειες για *Candida* spp ανευρέθηκαν σε 80 γυναίκες (ποσοστό 81%), ενώ αρνητικές σε 14 ασθενείς (ποσοστό 14,9%). Από τις θετικές καλλιέργειες που ανέπτυξαν *Candida* spp, οι 67 αφορούσαν *Candida albicans* ποσοστό 83,75%, ενώ οι υπόλοιπες ανέπτυξαν κάποιο άλλο είδος μύκητα. Στον πίνακα 1, φαίνεται η συχνότητα ανεύρεσης και το είδος των μυκήτων μετά από καλλιέργεια των κολπικών εκπλυμάτων. Στα 80 δείγματα, που έδωσαν θετικές καλλιέργειες για *Candida*, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του αντιγόνου mannan. Επίσης, προσδιορίστηκε το mannan αντιγόνο σε πέντε δείγματα από τα 14 που δεν ανέπτυξαν μύκητες κατά την καλλιέργεια, ενώ δεν προσδιορίστηκαν καθόλου επίπεδα mannan σε 9 από 14. Δηλαδή σε 5 περιπτώσεις με αρνητική καλλιέργεια για μύκητες, η μέθοδος Elisa ανίχνευσε θετικά αποτελέσματα για mannan αντιγόνο. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων που βρέθηκαν και με τις 3 χρησιμοποιηθείσες μεθόδους, δηλαδή της μικροσκόπησης, της καλλιέργειας και της ανίχνευσης του αντιγόνου mannan *Candida* με τη μέθοδο Elisa, αποδεικνύει τη μεγαλύτερη ευαισθησία του αντιγόνου mannan (85% έναντι 80% της καλλιέργειας και 73% της μικροσκόπησης).

Στην ομάδα των 20 γυναικών-υγιών μαρτύρων δε βρέθηκαν μύκητες, ούτε μικροσκοπικώς ούτε κατόπιν



Διάγραμμα 1. Ποσοτικός προσδιορισμός των βλαστομυκήτων με μέτρηση των επιπέδων mannan πολυσακχαριδικού αντιγόνου στον κόλπο και σύγκριση αυτών με τα κλινικά σημεία.



Διάγραμμα 2. Ποσοτικός προσδιορισμός των βλαστομυκήτων με μέτρηση των αποικιών και σύγκριση αυτών με τα κλινικά σημεία.

καλλιέργειας, και δεν ανιχνεύθηκαν επίσης επίπεδα mannan αντιγόνου.

Εκείνο που αξίζει να σημειωθεί είναι ότι βρέθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των επιπέδων του mannan που ανιχνεύθηκαν στα κολπικά εκπλύματα γυναικών με κλινικά σημεία που βαθμολογήθηκαν από 0–1 (δηλαδή απουσία αντικειμενικών ευρημάτων ή ήπια αιδοιοκολπίτιδα) και των 2 ή 3 (μέτρια έως πολύ σοβαρή φλεγμονή του κόλπου). Τα αποτελέσματά μας έδειξαν σημαντική σχέση μεταξύ επιπέδων στο mannan και των κλινικών σημείων, δηλαδή υψηλή συγκέντρωση επιπέδων mannan αντιγόνου στις γυναίκες που είχαν σοβαρή φλεγμονή του κόλπου (βαθμολογία 2 ή 3).

Στα διαγράμματα 1 και 2, φαίνεται ο ποσοτικός προσδιορισμός των βλαστομυκήτων (όπως καθορίστηκε με μέτρηση των αποικιών και των επιπέδων του mannan πολυσακχαριδικού αντιγόνου στον κόλπο) και σύγκριση αυτών με τα κλινικά σημεία. Το αντιγόνο mannan παρουσιάζει μεγαλύτερη ποσοτική αύξηση στις ασθενείς με κλινικά συμπτώματα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η διάγνωση της μυκητιασικής αιδοιοκολπίτιδας βασίζεται στο ιστορικό, στην κλινική εξέταση της ασθενούς, στη μικροσκοπική εξέταση και στην καλλιέργεια του δείγματος. Υπάρχει δυσκολία για τον ακριβή καθορισμό του όρου «μυκητιασική κολπίτιδα» και το διαχωρισμό του από τον απλό αποικισμό του κόλπου από *Candida*. Η ευρύτερη σήμερα αποδεκτή άποψη για το ρόλο της *Candida* spp είναι η εξής: η *Candida* spp θεωρείται παθογόνος όταν συνυπάρχουν και συμπτώματα και κλινικά σημεία αιδοιοκολπίτιδας και θετική μικροσκοπική εξέταση ή καλλιέργεια του κολπικού δείγματος για *Candida* spp. Όταν έχουμε θετική καλλιέργεια

του κολπικού δείγματος χωρίς συμπτώματα ή κλινικά σημεία αιδοιοκολπίτιδας¹¹, τότε η *Candida* spp είναι απλός αποικιστής του κόλπου και όχι παθογόνος.

Σε αυτή τη μελέτη, μία νέα ανοσοενζυμική μέθοδος για τον προσδιορισμό του αντιγόνου mannan της *Candida* χρησιμοποιήθηκε παράλληλα με την καλλιέργεια και τη μικροσκοπική εξέταση για τη διάγνωση της μυκητιασικής κολπίτιδας από *Candida* spp. Η ανοσοενζυμική μέθοδος Elisa εφαρμόζεται ευρέως με επιτυχία για την ανίχνευση του πολυσακχαριδικού αντιγόνου mannan του κυτταρικού τοιχώματος, στον ορό του αίματος για τη διάγνωση των συστηματικών μυκητιάσεων από *Candida* spp^{15,16,17}. Επίσης, εφαρμόζεται και για τον προσδιορισμό του mannan σε άλλα ανοσοβιολογικά υγρά^{18,19,20}.

Η εφαρμογή της μεθόδου Elisa για τον προσδιορισμό του mannan βρέθηκε να έχει υψηλή επαναληψιμότητα και ευαισθησία (ανιχνεύθηκε σε ποσότητες που ξεκινούσαν από 2,5 ng x ml⁻¹). Πολλά δείγματα μαζί μπορούν να εξεταστούν σε μία μικρόπλακα και τα αποτελέσματα του mannan από τα κολπικά εκπλύματα δεν καταστρέφονται μετά από φύλαξη στους -20°C για μία περίοδο τουλάχιστον 6 μηνών.

Η στατιστικώς σημαντική συσχέτιση (t-test, p=0.05), που διαπιστώθηκε μεταξύ του αριθμού των αποικιών ανά ml κολπικού εκπλύματος και των επιπέδων του αντιγόνου mannan, αποδεικνύει ότι η ποσοτική τεχνική της Elisa είναι τελικά τόσο χρήσιμη όσο και οι τεχνικές αρίθμησης βιώσιμων βλαστομυκήτων στον κόλπο.

Όλες οι γυναίκες που δεν παρουσίαζαν κλινικά σημεία (δηλαδή δεν είχαν στοιχεία φλεγμονής στο κόλπο-υγείς μάρτυρες) έδωσαν αρνητική καλλιέργεια και δεν παρουσίαζαν επίπεδα mannan στα κολπικά εκπλύματα. Στις γυναίκες που βρέθηκε θετική καλλιέργεια για *Candida* και συγχρόνως ανιχνεύσιμα επίπεδα mannan

υπήρχαν και σημαντικά κλινικά συμπτώματα, δηλαδή η υψηλή βαθμολογία συμπτωμάτων αντιστοιχούσε σε υψηλές συγκεντρώσεις mannan αντιγόνου στα κολπικά δείγματα.

Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με τα αποτελέσματα άλλων ερευνητών^{12,22}, που εξέτασαν κολπικά δείγματα γυναικών με καντιντιασική κολπίτιδα με 2 μεθόδους:

α) κατόπιν καλλιέργειας και

β) κατόπιν προσδιορισμού του mannan αντιγόνου.

Αυτοί βρήκαν στατιστικώς σημαντική σχέση μεταξύ αριθμού αποικιών μυκήτων μετά από καλλιέργεια και επίπεδα mannan αντιγόνου που προσδιορίστηκαν με Elisa, στα κολπικά δείγματα γυναικών με κολπική καντιντίαση. Επιβεβαιώνουν μάλιστα τη σχέση που βρήκαμε και εμείς, δηλαδή τη σχέση που υπάρχει μεταξύ υψηλών επιπέδων mannan αντιγόνου και της σοβαρότητας των κλινικών συμπτωμάτων και σημείων των ασθενών.

Ενδιαφέρον είναι να εξετάσουμε γιατί 14 γυναίκες, που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη μας εμφανίζοντας κλινικά συμπτώματα καντιντιασικής αιδοιοκολπίτιδας, δεν ανάπτυξαν μύκητες στις καλλιέργειες των δειγμάτων τους, ούτε και επίπεδα αντιγόνου mannan στα κολπικά εκπλύματα. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να ερμηνευτεί από αρκετούς παράγοντες. Ενδεικτικά, θα αναφερθούμε στην εφαρμοζόμενη τεχνική της καλλιέργειας με χαμηλή ευαισθησία.

Στην παρούσα μελέτη, ο κίνδυνος για ψευδώς αρνητικές καλλιέργειες ελαχιστοποιήθηκε, χρησιμοποιώντας ως δείγματα κολπικά εκπλύματα, σε αντίθεση με τη λιγότερο ευαίσθητη μέθοδο των στελεχών για τη λήψη των κολπικών δειγμάτων. Παρόλα αυτά, η *C. albicans* είναι ικανή να εισχωρεί στα βαθύτερα στρώματα του επιθηλίου του κόλπου²¹ και μπορεί να βρίσκεται ενδοκυττάρια^{21,22}. Απλό έκπλυμα του κόλπου με νερό πιθανώς δεν είναι επαρκές για να αποσπάσει τους μικροοργανισμούς από το επιθήλιο, αλλά θα μετακινούσε το διαλυτό mannan, το οποίο έχει απελευθερωθεί από τους βλαστομύκητες στον κόλπο.

Όσον αφορά τα 5 δείγματα που απέβησαν αρνητικά για καλλιέργεια και βρέθηκαν όμως θετικά κατά τον προσδιορισμό των επιπέδων του mannan, μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι, εφαρμόζοντας τη μέθοδο Elisa για τον προσδιορισμό του mannan αντιγόνου, προσδιορίζεται το ολικό ποσό του πολυσακχαριδικού αντιγόνου που υπάρχει απελευθερωμένο στον κόλπο, ενώ οι μύκητες είναι είτε νεκροί, είτε έχουν διεισδύσει στα βαθύτερα στρώματα του κολπικού επιθηλίου. Οι μύκητες μπορεί να είναι νεκροί και να μην ανιχνεύονται με καλλιέργεια του κολπικού, λόγω πρόσφατης λήψης αντιμυκητιασικών φαρμάκων ή άλλων λόγων, δεν παύουν όμως και νεκροί να απελευθερώνουν το αντιγονικό

τους στοιχείο, που στην προκειμένη περίπτωση είναι το mannan²³. Η επιμονή του mannan αντιγόνου στα κολπικά γυναικών που έδωσαν καλλιέργειες αρνητικές για μύκητες μπορεί να είναι αποτέλεσμα παρελθούσης λοίμωξης ή αποικισμού από *C. albicans* (άλλωστε και οι πέντε γυναίκες είχαν ιστορικό υποτροπιάζουσας καντιντίασης).

Οι 5 αυτές γυναίκες, που στα κολπικά τους εκπλύματα προσδιορίστηκε mannan αντιγόνο αλλά δεν αναπτύχθηκαν μύκητες κατόπιν καλλιέργειας, παρουσίαζαν κλινικά σημεία και συμπτώματα κολπικής καντιντίασης. Πιθανώς, το mannan αντιγόνο από μόνο του είναι ικανό να προάγει κάποια κολπική λοίμωξη²³.

Συχνά, το mannan αντιγόνο βρίσκεται δεσμευμένο με τα αντισώματα ως διαλυτά άνοσα συμπλέγματα και έχει αναφερθεί πως κάποια συμπλέγματα είναι ικανά να ξεκινησουν το μηχανισμό της φλεγμονώδους αντίδρασης κατευθείαν με την προσέλκυση του συμπληρώματος και των πολυμορφοπύρηνων^{24,25}. Έχει αποδειχθεί ότι το mannan, από μόνο του, είναι ικανό να δραστηριοποιήσει την εναλλακτική οδό του συμπληρώματος. Επιπλέον, είναι σαφές ότι το mannan αντιγόνο της *Candida* έχει την ικανότητα να καταστέλλει την κυτταρική ανοσία²³ και η παρουσία αυτού του πολυσακχαριδικού αντιγόνου στον κόλπο, ακόμη και όταν δεν υπάρχουν βιώσιμα κύτταρα *Candida*, μπορεί να καταστέλλει την τοπική ανοσιακή απάντηση και να διευκολύνει τις επαναδραστηριοποιήσεις της λοίμωξης²³.

Ως εκ τούτου, το σύνολο των βλαστομυκήτων (ζωντανών-νεκρών), και όχι απλά ο αριθμός των βιώσιμων βλαστομυκήτων, μπορεί να είναι σπουδαίο γεγονός. Πιθανώς, ο υπολογισμός του αντιγόνου mannan μαζί με τον αριθμό των αποικιών που αναπτύχθηκαν από κολπικά εκπλύματα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για τη μορφολογία των επικρατούντων κυττάρων *Candida spp* και επίσης για την επάρκεια του ανοσολογικού συστήματος του ξενιστή. Για παράδειγμα, μεταξύ των ατομικών δειγμάτων, μία υψηλή τιμή από mannan candida τη σχέση $\frac{\text{αριθμός αποικιών Candida}}{\text{mannan candida}}$, μπορεί να είναι ενδεικτική για την ευρεία εισβολή στους ιστούς από μυκητιασικούς σχηματισμούς και συσσώρευση μη βιώσιμων βλαστομυκήτων, ενώ μία χαμηλή σχέση μπορεί να αντιπροσωπεύει μία λοίμωξη με ανάπτυξη κυρίως βλαστοσπορίων²⁴.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, η μέθοδος που μελετήθηκε φαίνεται να είναι περισσότερο ευαίσθητη από τις κλασικές, με μεγαλύτερη επαναληψιμότητα και με δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί στη διαφορική διάγνωση υποτροπιάζουσας καντιντίασης και απλού αποικισμού από *Candida albicans*.

Τέλος, είναι αναγκαία η περαιτέρω μελέτη κολπικών εκπλυμάτων γυναικών χωρίς συμπτώματα καντι-

ντιαισικής κολπίτιδας, που όμως είναι αποικισμένες με *Candida* spp, ώστε να εξάγουμε συμπεράσματα για το είδος της κολπικής φλεγμονής που συμβαίνει.

Summary

Papaemmanouil V, Georgogiannis N, Doulas D, Papadimitriou A.

Detection of Candida cell wall polysaccharide mannan for the diagnosis of vaginal Candidiasis

Helen Obstet Gynecol 20(4):356-362, 2008

The purpose of this study is the measurement of polysaccharide antigen mannan of *Candida albicans* using an enzyme-linked immunosorbent assay method (Elisa), which was evaluated as an alternative way for the rapid diagnosis of vaginal candidosis.

The material of the study was provided by the centre of family planning of General Hospital of Nikea. Vaginal assays were collected from 98 women with symptoms or signs of vulvo-vaginal candidosis. The patients were clinically examined before being categorized in infected and non-infected by *Candida albicans*. The levels of this antigen were compared with microscopy and culture methods. There were used three methods: microscopical examination, culture type method and Elisa method to determine the quantity of yeast (Viable count yeasts-mannan levels).

Positive cultures for *Candida albicans* were obtained in 85,1% of women using Elisa, in 80% using classical cultures and in 73% using microscopical examination. Our results show an association between mannan levels and clinical signs, which is stronger in severe vulvovaginitis.

In conclusion, our method seems to be more sensitive than the classical one and our estimation for mannan levels is that it could be developed and used for the rapid and safe diagnosis of chronic and recurrent vulvovaginal Candidosis.

Key words: *vaginal candidosis, Candida cell wall mannan, Elisa immunoassay.*

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Fidel P.L, Barouse M, Espinosa T, Camarrati C. History and New insights in to host defence against candidiasis. *Trends Microbiol* 2004, 12: 220-227.
2. Hopwood V, Crowely T, Horrocks CT et al. Vaginal Candidiasis: relation between yeast counts and symptoms and clinical signs in non pregnant women. *Genitourin Med* 1988; 64: 331-337.
3. Odds FC Ecology of *Candida* and epidemiology of candidosis. In: Odds FC Ed *Candida and Candidosis: a review and bibliography*. 2nd ed. London: Bal-
4. White DJ. Vulvovaginal candidiasis. *Sex Transm Infect* 2006 Dec; 82 suppl 4iv: 28-30.
5. Nyivjesy P. Causes of chronic vaginitis: analysis of a prospective database of affected woman. *Obstetric Gynecol* 2006 Nov; 108 (5): 1185-1191.
6. Barrousse M, Espinosa T, Dunplap K, Fidel PL, Ir. Vaginal epithelial cell anti-*Candida albicans* activity is associated with protection against symptomatic vaginal candidiasis. *Infect Immun*. 2005; 73 (11): 7765-7767.
7. Barrousse M, Van Der Pol BI, Fortenberg D, and Fidel PL, Ir Vaginal yeast colonization, prevalence of vaginitis and associated local immunity in adolescents. *Sex Transm Infect* 2004; 80: 48-53.
8. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans* *Trends Microbiol* 2001; 327-335.
9. Evans EGV, Lacey CJ, and Carney IA. Criteria for the diagnosis of vaginal candidosis: evaluation of a new latex agglutination test. *Eur J Obstet Gynecol and Repr Biol* 1986; 22: 365-371.
10. Le Blanc D, Barrousse M, and Fidel PL, Ir. Role for dendritic cells in Immunoregulation during experimental vaginal candidiasis *Infect Immun* 2006; 74 (6): 3213-3221.
11. Odds FC, Webster CE, Simmons PD. *Candida* concentration in the vagina and their association with signs and symptoms of vaginal candidosis. *J Med Vet Mycol* 1988; 26: 277-283.
12. Sendid B, Tabouret M, Poirot JL, Mathiew D, Fruit J. New Enzyme immunoassay for Sensitive Detection of circulating *Candida albicans* Mannan and antimannan Antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic Candidiasis. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (5): 1510-1517.
13. Yeo S.F, Wong B, Current Status of Non culture Methods for Diagnosis of Invasive fungal Infections. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 465-484.
14. Sendid B, Poirot JL, Tabouret M, Bonnin A, Poulain D. Combined detection of mannanemia and anti-mannan antibodies as a strategy for the diagnosis of systemic infection caused by pathogenic *Candida* species *J Med Microbiol* 2002; 51 (5): 433-442.
15. Ibanez-Nolla J, Torres-Rodriguez JM, Nolla M, Leon MA. The utility of serology in diagnosing candidosis in non-neutroponic critically ill patients. *Mycoses* 2001; 44 (1-2): 47-53.
16. Rimek D, Singh J, Koppe R. Cross-Reactivity of the platelia *Candida* Antigen Detection Enzyme immunoassay with fungal antigen Extracts. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3395-3398.
17. Fujita S, Takamura T, Nagahara M, Hashimoto T, Evaluation of a newly developed down-flow immu-

- noassay for detection of serum mannan antigens in patients with candidaemia. *J Med Microbiol* 206; 55: 537–546.
18. Reiss E, Immunochemistry of fungal antigens (part B): Pathogens, p. 439–468, In JW Murphy, H. Friedman and M. Bendinelli (ed.) *Fungal Infections and immune response*. 1993 Plenum Press, New York.
 19. Verduyn Lunel F.M, Voss A, Kuijper E, Gelinck L, et al. Detection of the Candida Antigen Mannan in Cerebrospinal Fluid Specimens from patients suspected of having Candida Meningitis. *J. Clin Microbiol* 2004; 42: 867-870.
 20. White PL, Archer AE, Bornes RA. Comparison of Non–Culture–Based Methods for Detection of Systemic Fungal Infections with an Emphasis on Invasive Candida Infections. *J. Clin. Microbiol* 2005; 43: 2181–2187.
 21. Cheng G, Wozniak K, Walling M, Fidel P. Comparison between candida albicans Agglutinin–Like sequence gene expression patterns in human clinical specimen and models of vaginal Candidosis. 2005; 73(3): 1656–1663.
 22. Fidel PLJ, Barrousse M, Espinosa T, Camaratti M, Live intravaginal Candida challenge in humans reveals new hypotheses for the immunopathogenesis of vulvovaginal candidiasis. *Infect Immun* 2004; 72: 2939–2946.
 23. Pike IH, Evans EGV, Carney J. Mannan estimation as a measure of the growth of Candida albicans. *J Medand Vet Mycol* 1991; 29: 83–91.
 24. Nelson RD, Shibata N, Podzorski R.P, and Herron MJ. Candida mannan: Chemistry, suppression of cell–mediated immunity and possible mechanisms of action. *J Clin Microbiol Rev* 1991; 4: 1–19.
 25. Kanbe T, Cutler JE. Minimum chemical requirements for Adhesin activity of the acid–Stable part of Candida albicans cell wall phosphomannoprotein complex. *Infect Immun* 1998; 66(12): 5812–5818.