

## ANALIZA STĘŻEŃ sIgA W TREŚCI KANAŁU SZYJKI MACICY I JAMY USTNEJ U KOBIET Z *CANDIDA* LUB BEZ GRZYBÓW W ONTOCENOZACH POCHWY I JAMY USTNEJ

ALICJA KURNATOWSKA I JACEK MAGNOWSKI

Ośrodek Leczenia Chorób Pasożytniczych i Grzybic, Katedra Biologii i Parazytologii Lekarskiej, Akademia Medyczna, Al. Kościuszki 85, 90-436 Łódź; E-mail:katbiol@poczta.onet.pl

**ABSTRACT.** Analysis of sIgA concentrations in the contents of the cervical canal of the uterus and of the oral cavity in women with *Candida* or without fungi in ontocenoses of these organs. The aim of the study was to search for fungi in ontocenoses of genital organs and oral cavity (the fungal reservoir for multifocal infections) in women; evaluation of the concentration of sIgA in the contents of the cervical canal of the uterus and of the oral cavity. 102 women (age: 18–35 years) were examined. Fungi were isolated from ontocenoses of the vagina and the oral cavity; axenic strains were differentiated with API 20 C and API 20 C AUX tests (bioMérieux). The concentrations of sIgA in the content of the cervical canal of the uterus and from the oral cavity were evaluated by LC-Partigen IgA (Behring) tests. *Candida* occurrence in the oral cavity was significant ( $p < 0,02$ ) higher than in the vagina. *Candida albicans* (6 codes) was the predominant species; there were also *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* and *C. glabrata*. There were no significant differences between sIgA concentrations and the presence or absence of fungi in the vagina or oral cavity.

**Key words:** *Candida*, cervical canal, oral cavity, sIgA.

### WSTĘP

W podręcznikach mikologii można znaleźć uwagi o ważnej roli odporności miejscowej w zajmowaniu przez grzyby określonych ontocenoz narządowych. Jednakże tylko w jednej pracy wykazano zbieżność między niektórymi chorobami przyzębia i błony śluzowej jamy ustnej a obecnością *Candida* i obniżeniem stężenia sIgA w ślinie (Kurnatowska 1998). Nie ma danych dotyczących stężenia sIgA w śluzie szyjki macicy w obecności i braku grzybów w ontocenozie pochwy, z wyjątkiem wyników w pracy własnej (Magnowski 1999).

Biorąc pod uwagę liczne powikłania chorób narządów płciowych grzybicą wydawało się konieczne zbadanie stężeń sIgA w treści kanału szyjki macicy i jamy ustnej (rezerwuuar grzybów dla zarażeń wieloogniskowych) u tych samych kobiet, z obecnością *Candida* lub bez grzybów w omawianych narządach.

## MATERIAŁ I METODY

Zbadano 102 kobiety, w wieku 18–35 lat, pobierając od nich w pierwszej połowie cyklu miesięczkowego śluz z kanału szyjki macicy oraz treść jamy ustnej, jednocześnie do oceny mikologicznej i immunologicznej.

Materiał przenoszono na płynne podłoże Sabourauda, inkubowano 48 godzin w 37°C. Diagnostykę mikologiczną prowadzono w oparciu o kryteria morfologiczne i biochemiczne, stosując m.in. ocenę makrohodowli i mikrohodowli oraz testy bioMérieux API 20 C i API 20 C AUX, z wykorzystaniem zasady numerycznej identyfikacji (Kurnatowska 1995).

Do badań immunologicznych śluz pobierano po założeniu do pochwy jałowego wziernika ginekologicznego i uwidocznieniu ujścia pochwowego kanału szyjki macicy, posługując się przy tym kalibrowaną pipetą automatyczną (500 µl), z jednorazowymi końcówkami. Materiał w ilości 0,5–1 ml, umieszczano w jednorazowych zamykanych probówkach Ependorfa. Treść jamy ustnej pobierano w ilości 2 ml kalibrowaną automatyczną pipetą (400 µl) z jednorazowymi końcówkami i umieszczano ją w jednorazowych zamykanych probówkach Ependorfa. Następnie próbki przenoszono do temperatury –20°C na okres ok. 3–4 tygodni do czasu przeprowadzenia oznaczeń. Do określenia stężenia immunoglobuliny IgA w śluzie szyjki macicy, a także w treści jamy ustnej wykorzystano testy LC-Partigen IgA firmy Behring. Przed rozpoczęciem badania materiał rozmrażano.

Do rozpuszczania śluzu szyjkowego używano przygotowanego wcześniej 10% roztworu ACC (acetylocysteiny), w 0,9% NaCl. Ilość należnego roztworu ACC określano porównując dwie obok siebie umieszczone próbki, jedna z rozmrożonym, pozbawionym pęcherzyków powietrza śluzem, druga z solą fizjologiczną chlorku sodu, podawaną kalibrowaną pipetą do momentu uzyskania w obu probówkach tych samych poziomów. Po określeniu żądanej objętości, roztwór ACC podawano do próbki ze śluzem szyjkowym, który ulegał upłynnieniu, co umożliwiło pipetowanie. Treść jamy ustnej rozcieńczano 0,9% NaCl, w stosunku 1:10, uzyskując materiał gotowy do badania.

Przed wykonaniem oznaczeń każdą płytkę LC Partigen IgA kalibrowano nakraplając roztwory surowicy wzorcowej w soli fizjologicznej chlorku sodu, w stosunku: 1:1, 1:2 i 1:4; w oparciu o pola powierzchni zachodzących reakcji wykreślano krzywą wzorcową. Następnie nakraplano po 20 µl roztworu śluzu szyjki i oddzielnie treści jamy ustnej, a po 72 godzinach określano pole powierzchni zachodzącej reakcji. Dane te nanoszono na krzywą wzorcową i po uwzględnieniu rozcieńczeń określano zawartość sIgA w mg/dl (mg%) w obu badanych od każdej pacjentki materiałach.

Dla porównania wyników opracowano własny sposób analizy w 4 zbiorach; wykorzystano szeregi rozdzielcze wartości stężeń sIgA mg/dl oraz wieloboki zmienności w odrębnych materiałach biologicznych i grupach z obecnością lub brakiem grzybów w określonych ontocenozach.

## WYNIKI

Ogółem oceniono stężenie sIgA w 96 próbkach pobranych od 102 kobiet, zgłaszających dolegliwości związane z zapaleniem narządów płciowych. Warto dodać, że żadna z nich nie podała w wywiadzie chorób podstawowych lub innych tzw. czynników zwiększonego ryzyka zarażenia grzybami; badaniem uzupełniającym – dotyczącym oceny stanu klinicznego jamy ustnej – nie stwierdzono u nich zmian błony śluzowej lub przyzębia.

W badaniach mikologicznych wykryto grzyby u 2/3 kobiet ( $66,7 \pm 4,7\%$ ) w pochwie oraz u większej liczby w jamie ustnej ( $82,5 \pm 4,8\%$ ); różnica między uzyskanymi odsetkami występowania tych mikroorganizmów w ontocenozach obu narządów była statystycznie istotna ( $p < 0,05$ ). W toku różnicowania cech morfologicznych i biochemicznych aksenicznych szczepów grzybów – wyodrębnionych z ontocenozy pochwy lub jamy ustnej – rozpoznano następujące gatunki: *C. albicans* (Robin, 1853) Berkhout, 1923, *C. tropicalis* (Castellani, 1911) Berkhout, 1923, *C. kefyr* (Beijernick, 1889) van Uden et Buckley, 1889, *C. krusei* (Castellani, 1910) Berkhout, 1923, *C. guilliermondii* Langeron et Guerr, 1938, *C. glabrata* (Anderson, 1917) Meyer et Yarrow, 1978.

Wobec wysokiej zgodności gatunków wykrywanych w omawianych ontocenozach tych samych osób w dalszych analizach uwzględniono grupy kobiet zarażonych *Candida* (C+) lub bez grzybów (C-).

Materiał zgromadzony w badaniach immunologicznych analizowano w 4 zbiorach. Stężenia sIgA zestawiono z próbek treści kanału szyjki macicy w Tabelach 1 i 2, zaś treści jamy ustnej w Tabelach 3 i 4.

Tabela 1. Stężenie sIgA mg/dl w treści kanału szyjki macicy w próbkach pochodzących od kobiet z potwierdzoną obecnością *Candida* (C+) w ontocenozie pochwy

Lp.	Nr próbki	sIgA mg/dl	Lp.	Nr próbki	sIgA mg/dl
1	9	12,44	17	56	11,25
2	14	10,86	18	62	9,38
3	16	11,25	19	63	24,63
4	18	5,42	20	64	10,49
5	19	9,02	21	65	6,66
6	21	6,34	22	66	11,25
7	32	3,20	23	69	23,57
8	34	31,43	24	70	14,09
9	37	0,00	25	73	15,81
10	38	0,00	26	74	15,37
11	39	10,86	27	79	8,35
12	40	2,69	28	82	0,00
13	45	2,45	29	84	13,98
14	50	3,72	30	87	3,15
15	53	9,02	31	92	2,04
16	55	10,86	32	97	8,99

Tabela 2. Stężenie sIgA mg/dl w treści wydzielinie kanału szyjki macicy w próbkach pochodzących od kobiet bez obecności *Candida* (C-) w ontocenozie pochwy

Lp.	Nr próbki	sIgA mg/dl	Lp.	Nr próbki	sIgA mg/dl
1	1	5,13	9	26	2,69
2	2	13,66	10	33	10,12
3	3	4,55	11	35	9,02
4	5	10,12	12	42	0,00
5	8	6,03	13	67	13,54
6	11	0,00	14	68	17,12
7	20	26,82	15	80	0,00
8	24	0,00	16	91	3,87

Tabela 3. Stężenie sIgA mg/dl w treści jamy ustnej w próbkach pochodzących od kobiet z potwierdzeniem obecności *Candida* (C+) w ontocenozie jamy ustnej

Lp.	Nr próbki	sIgA mg/dl	Lp.	Nr próbki	sIgA mg/dl
1	9	6,12	16	62	27,16
2	14	14,30	1	63	15,85
3	18	51,28	18	64	12,82
4	19	42,65	19	65	21,68
5	21	16,66	20	66	78,58
6	32	7,26	21	69	17,46
7	34	28,61	22	70	27,16
8	37	22,74	23	73	17,46
9	38	18,62	24	74	19,10
10	39	25,64	25	79	17,83
11	40	3,82	26	82	20,11
12	45	0,00	27	84	10,93
13	50	27,12	28	87	25,79
14	53	39,88	29	92	11,57
15	55	27,16	30	97	12,89

Tabela 4. Stężenie sIgA mg/dl w treści jamy ustnej w próbkach pochodzących od kobiet bez obecności *Candida* (C-) w ontocenozie jamy ustnej

Lp.	Nr próbki	sIgA mg/dl	Lp.	Nr próbki	sIgA mg/dl
1	1	5,24	10	26	17,26
2	2	6,83	11	33	24,16
3	3	38,21	12	35	22,74
4	5	66,62	13	42	30,15
5	8	57,21	14	56	25,64
6	11	4,69	15	67	10,93
7	16	15,08	16	68	11,57
8	20	17,26	17	80	10,29
9	24	14,25	18	91	12,23

Stężenia sIgA u kobiet zarażonych *Candida* (C+) i niezarażonych (C-) wahały się w treści kanału szyjki macicy od 0,00 do 31,43 mg/dl (C+) oraz od 0,00 do 26,82 mg/dl (C-). U tych samych kobiet stężenia sIgA w treści jamy ustnej mieściły się w granicach od 0,00 do 78,58 mg/dl (C+) oraz od 4,69 mg/dl do 66,62 mg/dl (C-).

Porównując w parach u tych samych kobiet (C+) stężenia sIgA w obu próbkach zwrócono uwagę na pary, w których znalazły się wyniki zerowe dla jednej z nich. W trzech przypadkach (nr 37, 38 i 82) użytą w pracy metodą nie stwierdzono obecności omawianych immunoglobulin w wydzielinie kanału szyjki macicy, chociaż wykryto sIgA w treści jamy ustnej (stężenia: 22,74 mg/dl; 18,62 mg/dl, 20,11 mg/dl). W jednym zaś tylko przypadku wykryto niskie stężenie (2,45 mg/dl) w kanale szyjki macicy i brak było sIgA w treści jamy ustnej.

Wśród kobiet stanowiących grupę porównywaną (C-) wyniki zerowe otrzymano dla sIgA kanału szyjki w czterech przypadkach (nr 11, 24, 42, 80), u wszystkich z nich ujawniono te immunoglobuliny (4,69 mg/dl; 14,29 mg/dl; 30,15 mg/dl; 10,29 mg/dl) w treści jamy ustnej.

Następnie porównano liczby rzeczywiste wszystkich dalszych par danych. Stwierdzono, że stężenie sIgA wyższe w treści jamy ustnej niż w wydzielinie kanału szyjki macicy dotyczy większości kobiet zarażonych *Candida* ( $80,0 \pm 7,3\%$ ), a także bez grzybów ( $75,0 \pm 10,8\%$ ).

Wobec tego wartości stężeń sIgA określonych w próbkach wydzieliny kanału szyjki macicy i treści jamy ustnej uporządkowano według liczb wzrastających tworząc szeregi zmienności, które podano dalszej analizie statystycznej. Wykorzystano parametry rozkładu wartości stężeń sIgA biorąc pod uwagę rodzaj materiału oraz obecność lub brak w nim grzybów.

Zwrócono uwagę, że wartości średnich arytmetycznych ( $\bar{x}$ ) sIgA w wydzielinie szyjki macicy są ponad dwukrotnie niższe od porównywanych wartości stężeń sIgA w treści jamy ustnej, niezależnie, czy wykryto w tych samych materiałach grzyby lub nie stwierdzono ich obecności.

Porównywanie między sobą wartości median (Me), średnich ( $\bar{x}$ ), modalnych (Mo) oraz współczynnika asymetrii (As), wahające się od 1,22 do 1,91, świadczą o niewielkiej skośności wszystkich analizowanych rozkładów.

#### DYSKUSJA

W badaniach naszego Ośrodka za najważniejsze uznaliśmy interakcję układu żywiciel-grzyb, poszerzając m.in. opisywanie reakcji kobiety z grzybicą narządów płciowych o testy immunologiczne, zaś grzyba – o dotychczas nieznanne właściwości biochemiczne związane z jego chorobotwórczością.

Jak wspomniano we wstępie, ocena stężenia wydzielniczej immunoglobuliny A (sIgA) – o zasadniczej funkcji przeciwbakteryjnej, a o nieznanych dotychczas właściwościach przeciwgrzybiczych – wydała się nam ważna.

Dotychczas nie znaleźliśmy w piśmiennictwie opracowań zajmujących się jednocześnie u tej samej osoby stężeniami sIgA w dwóch materiałach biologicznych. Nasze zainteresowanie tym zagadnieniem nie było przypadkowe, gdyż z jednej strony wykazaliśmy wcześniej (Kurnatowska 1995), że w jamie ustnej znajduje się główny rezerwuuar grzybów dla inwazji wieloogniskowych, co mogłoby mieć wpływ na stężenie sIgA, z drugiej – immunoglobulina A w ślinie i płynie dziąsłowym, jak już wiadomo (Ziętek 2000), odgrywa szczególną rolę. Natomiast odpowiedni poziom sIgA w treści kanału szyjki macicy może mieć znaczenie dla uniknięcia niektórych zaburzeń rozrodu u kobiety (Malinowski 2000).

Podejmując omawiane badania oczekiwaliśmy niższych stężeń sIgA w obecności grzybów, niż w materiałach biologicznych bez tych mikroorganizmów. Wbrew naszym oczekiwaniom stężenia wydzielniczej immunoglobuliny A nie różniły się statystycznie znamienne (dla  $p > 0,05$ ) w każdym z badanych przez nas materiałów; jednakże w treści kanału szyjki macicy stężenia sIgA były około 2-krotnie niższe niż w treści jamy ustnej.

Warto dodać, że Mendling (1996) wykazał, że stężenia sIgA w wydzielinie szyjkowo-pochwowej, w ostrej i przewlekłej kandydozie wywołanej przez *C. albicans* były podobne do stężeń uzyskanych dla kobiet zdrowych.

Niestety nie znaleźliśmy źródłowych danych dotyczących norm stężenia sIgA w kanale szyjki macicy lub jamy ustnej; własnych więc wyników nie można porównać z takimi danymi.

#### WNIOSKI

1. Stężenie wydzielniczych immunoglobulin klasy A w treści szyjki macicy jest około 3 razy niższe niż w jamy ustnej.
2. Brak istotnych różnic ( $p > 0,05$ ) między stężeniami tych immunoglobulin wykrywanych w ontocenozach narządów płciowych i jamy ustnej u kobiet zarażonych i niezarażonych grzybami.

#### LITERATURA

- Kurnatowska A. 1995. Wybrane zagadnienia mikologii medycznej. Promedi, Łódź.
- Kurnatowska A.J. 1998. Analiza klinicznych objawów niektórych chorób jamy ustnej a właściwości wyodrębnionych z jej ontocenozy szczepów grzybów. Praca habilitacyjna, AM Łódź.
- Magnowski J. 1999. Analiza kliniczna i mikologiczna kandydozy narządów płciowych i jamy ustnej, z uwzględnieniem właściwości biochemicznych grzybów oraz stężenia sIgA w wydzielinie kanału szyjki macicy i w treści jamy ustnej. Praca doktorska, AM Łódź.
- Malinowski A. 2000. Immunologiczne zaburzenia rozrodu. W: *Immunologia kliniczna* (Red. M. Kowalski), Mediton, Łódź, 557–592.
- Mending W. 1996. Immunological investigation in vaginal mycoses. *Mycoses* 39: 177–183
- Ziętek M. 2000. Immunopatologia błony śluzowej jamy ustnej. W: *Immunologia kliniczna* (Red. M. Kowalski), Mediton, Łódź, 593–606.