

11
2ej-



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
ZARAGOZA

CORRELACION DE IgA SECRETORA CON
INFECCIONES VAGINALES

TESIS CON
FOLIO DE ORIGEN

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :
EDITH CRUZ RAMIREZ





UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

I.	INTRODUCCION	1
	1.1 EL SISTEMA SECRETOR IMMUNE	2
	1.2 VAGINITIS	8
	1.3 DIAGNOSTICO	14
	1.4 ELISA	16
II.	FUNDAMENTACION DEL TEMA	27
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
IV.	OBJETIVOS	30
V.	HIPOTESIS	30
VI.	MATERIAL Y METODOS	31
VII.	RESULTADOS	42
VIII.	ANALISIS DE RESULTADOS	65
IX.	CONCLUSIONES	68
X.	BIBLIOGRAFIA	71

I INTRODUCCION

Las secreciones que bañan las superficies mucosas forman una defensa inmunológica que se le conoce como el sistema inmune secretor, dentro de este sistema existen anticuerpos de las cinco clases que se conocen, la IgA se encuentra en mayor proporción y genera el mecanismo de defensa primaria contra la infección local. Su principal función puede no ser la destrucción de los antígenos sino más bien el impedir el acceso de estas sustancias al organismo e iniciar el reconocimiento antigénico.

La mucosa vaginal es un sitio donde las infecciones tienen cierta frecuencia, se manifiestan generalmente como una vaginitis (inflamación vaginal) en mujeres sexualmente activas; los síntomas predominantes son dolor, ardor, prurito y un signo característico es la leucorrea, que se presenta como una secreción típica del agente etiológico involucrado.

La secreción originada por la vaginitis contiene anticuerpos secretorios como la IgA, estos pueden ser cuantificados por métodos serológicos (ELISA) que ayudan a establecer títulos del anticuerpo como una respuesta inmunológica provocada por la presencia del agente causal.

1.1 EL SISTEMA INMUNE SECRETOR

La parte superior de las mucosas de los seres humanos están en continuidad directa con el medio ambiente, por lo que son, el sitio principal de exposición a los antígenos. Las secreciones que bañan estas superficies forman una defensa inmunológica en el huésped, de tal manera que la concentración de anticuerpos en fluidos mucosos tienen relación directa con la resistencia a agentes infecciosos (1).

Las secreciones pueden ser clasificadas como internas y externas de acuerdo a su contenido de inmunoglobulinas. En la mayoría de las secreciones externas la IgA es predominante, aproximadamente 60-100% del total de inmunoglobulinas presentes, la IgA proporciona el mecanismo de defensa primaria en saliva, calostro, lágrimas, líquido nasal, líquido traqueobronquial, líquido intestinal, líquido cervico-vaginal, etc. En secreciones internas y en suero, la IgG está en mayor proporción (1,2,3).

IgA SECRETORA

La IgA secretora difiere de la IgA sérica, la IgA sérica humana existe principalmente como un monómero 7S, con 10-15% de la forma polimérica y se encuentra en cantidades pequeñas en las secreciones, mientras que la IgA secretora está en forma principal como un dímero 11S y se encuentra en mayor proporción en secreciones (1,3).

ESTRUCTURA DE LA IgA SECRETORA

Es un dímero, adquiere una cadena J y la unidad de un componente secretor (SC).

El peso molecular de la IgA es de 180000, de la cadena J 15000 y del componente secretor 70,000. El peso molecular total de $(IgA)_2 J \cdot SC$ es alrededor de 400,000 y tiene un coeficiente de sedimentación 11S.

La IgA consiste en cuatro cadenas peptídicas, dos cadenas L y dos cadenas H. Las cadenas L son κ y λ , las cadenas H son α . Las dos cadenas son sostenidas entre sí por enlaces estrictamente no covalentes.

El componente secretor se une a la IgA por puentes o enlaces disulfuro, aparentemente se encuentra enrollado alrededor de las porciones FC del dímero y se extiende de una región bisagra hasta la otra (fig 1). El componente secretor es antigénico y posee sitios determinantes, como los determinantes I, que son inaccesibles cuando el SC se combina con IgA, también posee los determinantes A que son accesibles, estos se subclasifican en los que son resistentes y los que son susceptibles a la reducción. El SC reside en la membrana celular del epitelio y puede actuar como receptor para el transporte del mismo con la IgA (1,3,4,7).

La cadena J es una pequeña glucoproteína, está ligada a las cadenas α de la IgA secretora por la virtud de enlaces disulfuro, se incorpora a la inmunoglobulina justo antes de que sea secretada por las células plasmáticas, tiene carácter ácido por su gran contenido de ácido aspártico y ácido glutámico.

También confiere a la IgA la capacidad para que se una al componente secretor (4).

La composición de aminoácidos no es significativamente diferente de la IgA sérica, pero el contenido de carbohidratos es definitivamente grande, del orden del 10% por la gran cantidad que tiene el componente secretor (3).

Una de las características importantes es que es más resistente al ataque proteolítico, la relación integral entre el componente secretor y la IgA dimerica aumenta su estabilidad, ya que el componente secretor libre sufre ataques de enzimas proteolíticas, lo que no sucede cuando está ligado a la IgA (1,3,4).

ORIGEN DE LA IgA SECRETORA

Las células plasmáticas submucosas que residen localmente en los sitios secretorios elaboran de manera principal IgA dimerica que ha continuación aparece en los líquidos de las mucosas. Estas células plasmáticas descansan en oposición íntima con el epitelio suprayacente y están formadas sobre todo por células que producen IgA. Además de la producción local la IgA es secretada directamente a través del epitelio criptico (5).

Existen evidencias serológicas que demuestran que la estimulación antigénica de una superficie mucosa es seguida por la aparición de anticuerpos específicos, en las secreciones del área estimulada (3).

La IgA puede ser incrementada con IgA sérica por un

mecanismo de transferencia pasiva donde hay una filtración en fluidos de tejidos con capilares que son permeables o también como resultado de la irritación mecánica o inflamación (4).

ORIGEN DEL COMPONENTE SECRETOR

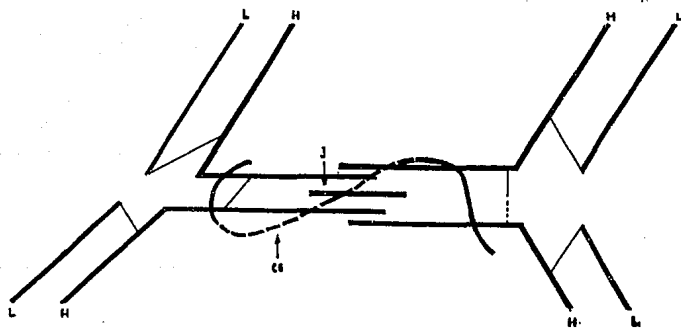
El componente secretor es una glucoproteína, se sintetiza dentro de las células epiteliales glandulares, acinos, conductos de las glándulas salivales, mucosa del aparato respiratorio, epitelio del cervix, tubos uterinos, trompas de falopio, etc. El componente secretor permanece fijo en la membrana lateral de la célula, allí actúa como un receptor específico para IgA (1,3,12).

MECANISMO DE FORMACION Y EXCRECION

La IgA dimerica asociada a la cadena J difunde a través del intersticio de la lamina propia, cruza la membrana basal y entra al espacio intercelular. Puesto que las porciones apicales de dos células epiteliales adyacentes están en oposición íntima, macromoléculas del tamaño de la IgA no puede lograr el acceso directo al lumen. El componente secretor presente en la membrana celular del epitelio lateral y basal puede actuar como receptor, combinándose con la IgA el componente facilita el transporte al interior de la célula epitelial por un proceso de endocitosis que comprende la invaginación de la membrana celular y del englobamiento de la molécula de IgA secretora en vesículas formadas por la membrana. Las vesículas son transportadas a la membrana apical (luminal) de la célula epitelial o a la

superficie de los hepatocitos y despues son expelidas, probablemente por pinocitosis inversa (1). Observar figura 2.

FIG. 1 MODELO PARA IgAs.



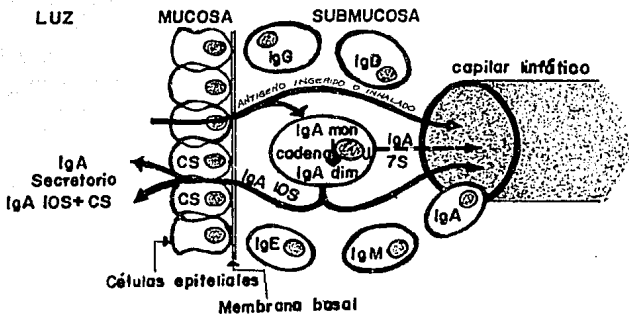
CS = componente secretorio

H = cadena pesada

L = cadena ligera

J = cadena J.

FIG. 2 SITIO DE LA SINTESIS Y TRANSPORTE DE IgAs



CS = componente secretorio

IgA mon = monómero de IgA

IgA dim = dímero de IgA

1.2 VAGINITIS

La vagina presenta una descarga de secreción externa para la formación del fluido vaginal, este fluido cambia sus características cuando se manifiesta alguna infección, a este cambio se le conoce como vaginitis.

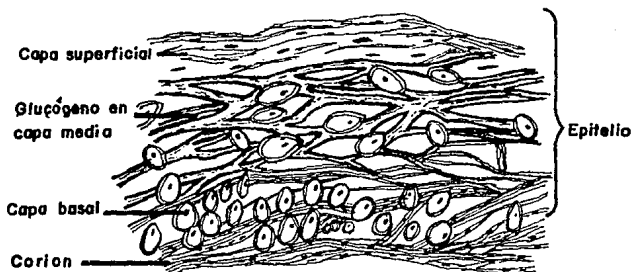
La vagina sana presenta en condiciones normales secreción húmeda constituida por una mezcla compleja de sustancias provenientes de glándulas sebáceas, glándulas sudoríparas, glándulas de Bartholin y Skene's, células exfoliativas, moco cervical, secreciones de cavidad endometrial y trompas de Falopio. Su composición es de carbohidratos complejos y simples, ácidos grasos, electrólitos, anticuerpos y microflora conteniendo diferentes organismos. La secreción húmeda se presenta como una mucosidad gruesa escasa, aunque puede presentar variables aumentando en cantidad los días cercanos a la menstruación (8,9,10).

El mecanismo de autodepuración vaginal se debe al epitelio pavimentoso estratificado de la mucosa que descama sus capas más superficiales; gracias a la actividad estrogenica, estas células descamadas tienen una carga importante de glucógeno (fig 3), que es transformada en glucosa por enzimas celulares formándose después ácido láctico por los bacilos de Doderlein, en consecuencia el pH de la vagina se encuentra ácido (pH 4.5).

Normalmente en la vagina existe una maduración celular, manifestación del mecanismo fagocítico y eliminación constante de detritos. También en la membrana mucosa hay producción de

inmunoglobulinas secretoras, siendo la IgA la primera línea de defensa contra patógenos invasores y se ha observado que esta inmunoglobulina presenta un decremento a mitad del ciclo menstrual en relación a su nivel normal. También existen otros parámetros funcionales importantes de la vagina como son: los influenciados por la edad y particularidades anatómo estructurales. (8,10, 12)

FIG.3 GLUCOGENO EN EPITELIO VAGINAL



Cuando las condiciones normales de pH o flora existente (tabla 1) se modifican se puede originar una vaginitis, que es la inflamación de la mucosa vaginal, esta afección puede ocurrir en cualquier etapa de la mujer observandose con mayor frecuencia durante la vida sexual activa.

Las causas de la vaginitis pueden ser:

- a) Irritantes locales y químicos: alérgenos, duchas, desodorantes, espermicidas, cubiertas, diafragmas y jabones.
- b) Cuerpos extraños: tampones vaginales retenidos, dispositivos sexuales.
- c) Atrofia: después de la menopausia, con infección.
- d) Infección: causada por bacterias, hongos, parásitos y virus.
- e) Fístulas de las vías urinarias o intestino.
- f) Carcinoma del cuello o vagina.
- g) Factores ambientales: liberación sexual, violación sexual, prostitución, asinamiento (8,10,13,14,15,22).

TABLA A
FLORA NORMAL DE LA VAGINA

Lactobacilos microaerofílicos (Bacilos de Doderlein)

Staphylococcus epidermidis

Especies de Peptostreptococcus

Especies de bacteroides

MANIFESTACIONES CLINICAS

Generalmente aparecen ocho manifestaciones clinicas importantes: ardor o dolor vulvovaginal, disuria, dispaurenia, prurito vaginal, prurito rectal, hiperemia, sangrado al tacto y el signo predominante leucorrea (8).

Sin embargo dependiendo del agente etiologico hay variación tanto en manifestaciones clinicas como en el aspecto del fluido vaginal.

TABLA B
AGENTES ETIOLOGICOS

Bacteriana	<u>Gardnerella vaginalis</u> , <u>Shigella</u> , <u>Neisseriae gonorrhoeae</u> , <u>Klebsiella</u> , <u>Streptococcus hemoliticus</u> , <u>Salmonella typhi</u> , <u>Mobiluncus sp.</u>
Micotica	<u>Candida albicans</u>
Parasitaria	<u>Trichomonas vaginalis</u> , <u>Enterobius vermicularis</u> , <u>Entamoeba histolitica</u> , <u>Mycoplasma</u> y <u>Clamidia</u>
Viral	<u>Herpes simple</u> y <u>Herpes zoster</u>

También se pueden presentar asociaciones entre dos o más agentes.

CARACTERISTICAS DE AGENTES ETIOLOGICOS ENCONTRADOS FRECUENTEMENTE
EN CULTIVOS

CANDIDIASIS

Candida albicans puede existir como saprofito en membranas mucosas, se vuelve patógena cuando existe daño en la membrana mucosa. La infección genital de levaduras puede darse con infección bacteriana o viral.

Existen factores predisponentes a la candidiasis, como son: el vestido apretado, las pantimedias, la ropa interior de nylon debido a que incrementan la humedad local; la diabetes, el embarazo y la antibioticoterapia.

Los lactobacilos están presentes en la vagina de mujeres sanas o con vaginitis de levadura; existe un equilibrio natural entre los Lactobacillus y Candida albicans, ya que ambos se proporcionan factores de crecimiento, el Lactobacillus es capaz de crecer en un medio adecuado para hongos y Candida aprovecha como medio de crecimiento la glucosa que el Lactobacillus transforma a partir del glucógeno que es producido por las células epiteliales vaginales.

El cuadro clínico característico presenta una secreción espesa, blanca, gruesa como crema cuajada que se adhiere a la mucosa vaginal; irritación y prurito.

A nivel de respuesta inmunitaria se ha determinado concentraciones de IgG e IgA encontrándose una predominancia de IgG (15,8,9,18,20).

TRICHOMONIASIS

La Trichomona vaginalis es la única especie patógeno humana que se conoce dentro del género Trichomona y puede ser aislada de muestras uretrales de ambos sexos así como de la secreción vaginal. Un elevado pH estimuló el crecimiento de trichomoniasis pero existe discrepancia si la elevación es debido a las trichomonas o viceversa

El cuadro clínico característico es una secreción fina espumosa, cremosa, amarilla o ligeramente verde, acompañada de dolor vaginal; si el flujo es abundante puede existir hiperemia vulvar y edema que se extiende por fuera de los labios ocasionando un dermatitis del perineo, con prurito vulvar y disuria. El cervix puede presentar un aspecto normal o estar enrojecido con petequias.

Se ha determinado que la mujer presenta inmunidad humoral debido a las concentraciones de IgA e IgG que se encontraron en lavados vaginales (9,21).

VAGINITIS BACTERIAL

Las mujeres son consideradas con vaginitis no específica o vaginitis bacteriana, si presentan características clínicas tales como una secreción color gris o blanca, homogénea, de baja viscosidad, pH mayor de 4.5 y además si esta secreción contiene células gúlicas y libera olor a amina cuando se mezcla con hidróxido de sodio al 10%.

El característico olor a amina de la secreción vaginal es

considerado por la volatilización de poliamidas como la putrescina y la cadaverina.

Esta vaginitis se caracteriza por una relativa escases de leucocitos en la secreción vaginal, escases de respuesta inflamatoria y también por presentar ácidos orgánicos; lo cual se verifico por un análisis cromatografico liquido-gas que reporto niveles incrementados de succinato, acetato, butirato y propionato, causado principalmente por *G vaginalis* (productor de acetato), *Bacteroides sp* (productor de succinato) y *Peptococcus sp* (productor de butirato).

Gardnerella es un organismo responsable de vaginitis no especifica, crece en un pH de 6 - 6.5, produce ácido acético como producto final de fermentación; así que un pH elevado puede ser debido a otros microorganismos que presumiblemente realizan el crecimiento de *G. vaginalis*. Estos microorganismos pueden ser *Bacteroides*, *Peptococcus*, *Mobiluncus*, *estreptobacillus* (8,22).

1.3 DIAGNOSTICO

En la búsqueda de la etiología de infecciones vaginales es importante relacionar criterios clinicos con datos de laboratorio donde se consideren los siguientes aspectos:

1. Historia clinica

2. Exploración fisica : se busca un cambio en la piel vulvar, incluyendo un saipullido geografico, fisuras, eritema,, liquenificacion donde se sospecha de candidiasis, lesion vulvar

que puede ser por Herpes o Papilomavirus, inflamación por posible Trichomona.

3. Sintomatología: comezón, ardor, dolor, etc.

4. Estudios de laboratorio

a) Toma de muestra: la paciente no debe hacerse aseo vaginal o utilizar medicamento intravaginal durante por lo menos 72 horas.

b) Examen físico de la secreción: Es importante el aspecto, puede presentarse como grumoso, viscoso, espumoso, seco. Otro parámetro funcional es el color, si es blanco, claro, amarillo, verde.

c) Examen químico: Se le determina pH, mayor de 4.5 puede ser causado por Trichomonas o Gardnerella.

d) Examen microscópico:

-En fresco se puede observar el movimiento flagelar de Trichomonas, células en clave que es característico de Gardnerella, levaduras puede ser Candida, leucocitos.

-Por tinción de Gram puede observarse formas bacilares en cadena o cortos, cocos aislados o en racimo, cocobacilos.

Tinción de Papanicolaou: se pueden observar células malignas.

e) Métodos microbiológicos: Se siembra en medios enriquecidos selectivos y diferenciales como Agar sangre, Agar sabouroud, Agar sal y manitol, Agar biggy, Agar chocolate en condiciones anaerobias.

f) Biopsia: Se realiza una extracción de tejido y se manda al laboratorio de patología para examinar si presenta células anormales.

g) Serología: Se realiza la determinación de anticuerpos para lo

cual se realizan técnicas por inmunofluorescencia, inmuno difusion radial, Elisa que detecta hasta ng/ml. (17,13,23,24).

1.4 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

PRINCIPIO DEL INMUNOENSAYO

En esta técnica se emplean enzimas como sustancias marcadoras de un antígeno o un anticuerpo donde la reacción inmunológica debe seguir una reacción indicadora, para que la actividad enzimática, que está fijada al complejo antígeno-anticuerpo pueda ser determinada fotométricamente. La sensibilidad necesaria para la comprobación se sigue gracias a la gran velocidad de la reacción enzimática, que representa un extraordinario efecto de amplificación, de modo que registra de forma fiable incluso la mínima cantidad de sustancia (27).

ENZIMOINMUNOENSAYO HETEROGENEO

Se basa en la utilización de una fase sólida con el fin de separar el antígeno o el anticuerpo libre del complejo antígeno-anticuerpo (Ag-Ac). En la fase sólida se adhiere el antígeno ó el anticuerpo (27).

ASPECTOS PRACTICOS

FASE SOLIDA

Es imperativo que la fase sólida pueda tomar una cantidad

adecuada de antígeno o anticuerpo de una forma reproducible. La variabilidad de esta etapa es probablemente el factor determinante para la precisión de toda la fase sólida del inmunoensayo.

Varios transportadores han sido usados tales como tubos, microplacas, esferas y discos los cuales pueden ser de celulosa, nylon, polivinilo, poliácrida, poliestireno y partículas de agarosa (27,28).

Las microplacas de poliestireno son fáciles de usar y dan una adecuada reproducibilidad a muchos antígenos solamente por adsorción pasiva en solución alcalina. Están hechas para cubrirse con inmunoglobulinas para la determinación de antígenos (tabla c).

MATERIALES PARA CUBRIR LA FASE SÓLIDA

Las condiciones óptimas para cubrir la fase sólida como concentración de reactivo, tiempo de recubrimiento, temperatura, pH son determinados por una estandarización con reactivos de referencia.

Muchas proteínas dan una sensibilidad satisfactoria en soluciones de 1-10 $\mu\text{g/ml}$ de buffer de carbonato-bicarbonato con pH 9.6 .

Para pegar un antígeno en particular puede ser usado el método indirecto (fig 7); para pegar un anticuerpo específico puede ser usado el método del sandwich (fig 4).

Cuando una fase sólida es cubierta adecuadamente un exceso de

recubrimiento puede ser removido por lavado con PBS-Tween (27,28).

TIEMPO DE LAVADO

Elisa consiste en una serie de incubaciones de reactivos, separadas por etapas de lavado.

El lavado puede ser manual, llenando el tubo o la placa con PBS-Tween dejandolo actuar pocos minutos, después la placa se seca y se adiciona el siguiente reactivo.

En microplaca es conveniente que el lavado de los 96 pozos sea de manera simultánea; en tubos el lavado debe ser de manera secuencial.

MUESTRA

En Elisa las sustancias de peso molecular grande se pegan a la fase solida de una manera no especifica, como en el caso del metodo indirecto (fig 6 y 7) donde las muestras son suero, plasma, saliva, etc. Este tipo de pegado no especifico puede evitarse haciendo una dilución de la muestra con PBS conteniendo un agente húmedo (Tween 20).

En métodos indirectos el suero o plasma pueden contener sustancias (factor reumatoide) que puede reaccionar con otros componentes sericos cuando se fijan a la fase solida, tal situación puede evitarse separando las sustancias por medio de la centrifugación, cromatografía o por el uso de absorbentes como en el caso de las inmunoglobulinas.

CONJUGADOS

Las enzimas deben ser estables, muy reactivas, disponibles en un alto grado de pureza; producir conjugados estables, baratos y seguros para su uso. Muchas enzimas han sido probadas incluyendo acetilcolinesterasa, citocromo, glucoamilasa, lactoperoxidasa, ribonucleasa; pero la fosfatasa alcalina y la peroxidasa de rábano han sido las mas favorecidas en varios trabajos por su bajo costo y facil conjugación porque tienen una gran variedad de sustratos.

El objetivo del conjugado es unir la enzima con el anticuerpo o antígeno dependiendo del caso para obtener la máxima cantidad de reactividad. Esto se lleva a cabo con agentes de unión cruzada, la unión puede realizarse en un paso donde la enzima-anticuerpo y el reactivo de unión cruzada son mezclados.

El glutaraldehído es el mejor reactivo de unión cruzada; el método de dos pasos es conveniente para el uso de la peroxidasa porque de esta manera puede producir conjugados homogéneos.

Otro agente acoplador es el peryodato de sodio, este acoplador puede ser usado en un método de dos pasos para activar peroxidasa formando grupos aldehídos, los cuales reaccionan en el segundo paso con el grupo amino del anticuerpo marcado.

El nivel de purificación de la partícula a marcar depende del tipo de partícula a ensayar; en el caso de anticuerpos no siempre es necesario el uso de anticuerpos purificados por métodos inmunoabsorbentes.

La mejor manera de almacenar los conjugados es en forma concentrada, se deben diluir antes de su uso con PBS-Tween. La dilución de trabajo es determinada de acuerdo al tiempo de incubación del conjugado y el tiempo de reacción del sustrato.

Con pequeños volúmenes usados en el sistema de microplaca, el tiempo de incubación es de 2-3 horas y la incubación del conjugado es de 2-3 horas a temperatura ambiente, o toda la noche.

SUSTRATO

El principal requerimiento del sustrato es para proveer un método de detección sensitiva para la enzima en el conjugado. Muchos autores han usado sustratos cromogénicos los cuales inicialmente son incoloros y cuando son degradados dan una fuerte coloración,

idealmente el sustrato da completamente productos solubles con un gran coeficiente de extinción. El sustrato puede ser barato, seguro y fácil de usar.

En el caso de fosfatasa alcalina un sustrato conveniente es fosfato p-nitrofenil. La reacción de la fosfatasa alcalina puede ser parada con NaOH concentrado y un producto amarillo estable puede ser leído a 450 nm.

Una variedad extensa del sustrato peroxidasa oxidados por el peróxido de hidrógeno están disponibles. Es casi seguro que la O-phenilendiamine es por mucho el mejor sustrato peroxidasa, el producto es completamente soluble y tiene gran coeficiente de

extinción a 492nm. Este sustrato es excelente para leer visualmente la producción de una coloración naranja después de parar con peróxido de hidrogeno.

EL RESULTADO FINAL

El resultado del ensayo ELISA puede ser leído visualmente o medido en un fotómetro.

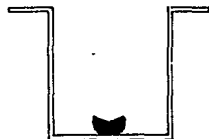
La lectura visual puede ser muy consistente cuando se necesita una respuesta positiva o negativa, los resultados positivos son detectados con una reacción colorida del pozo. Una solución con absorbancia de 0.1 a 0.2 en el rango de amarillo-café (400-500 nm) puede ser distinguible de los pozos negativos que son incoloros.

La lectura fotométrica se utiliza en un ensayo con gran precisión, los resultados son leídos removiendo la solución de reacción sustrato de las placas o tubos y se transfieren a la cubeta de un espectrofotómetro y se lee la absorbancia en la máxima longitud de onda (492 para OPD). La alternativa es medir la absorbancia en un fotómetro donde la solución sustrato esta en el tubo o en la microplaca. (27,28,29)

TIPOS DE ENSAYO

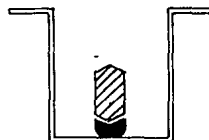
FIG. 4 METODO DEL SANDWICH

1.- Anticuerpo absorbido a la placa



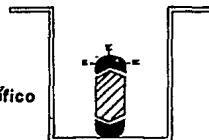
Lavado

2.- Adicionar la solución a probar conteniendo el antígeno



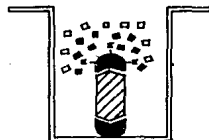
Lavado

3.- Adicionar la enzima unida al anticuerpo específico



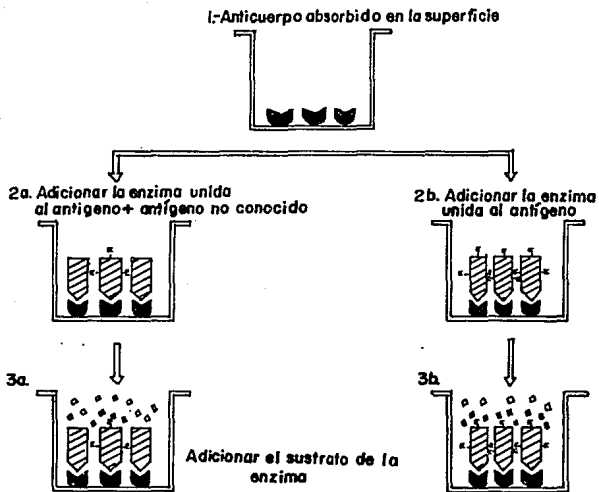
Lavado

4.- Adicionar el sustrato de la enzima



La cantidad hidrolizada = la cantidad presente de antígeno

FIG. 5
METODO COMPETITIVO PARA EL ENSAYO DE ANTIGENO



La hidrólisis del sustrato = la enzima unida al antígeno

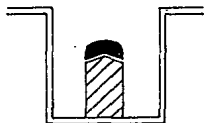
FIG. 6
METODO INDIRECTO PARA ENSAYO DE ANTICUERPOS

1.- Antígeno absorbido a la placa



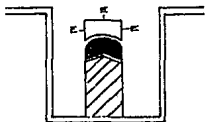
Lavado

**2.- Adicionar suero cualquier anticuerpo
especifico ataca al antígeno**



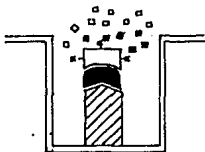
Lavado

**3.- Adicionar la enzima ligada a la antioglobulina
la cual ataca a el anticuerpo**



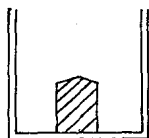
Lavado

4.- Adicionar el sustrato



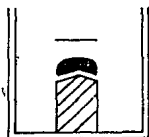
La cantidad hidrolizada = la cantidad presente de anticuerpo

FIG. 7
MODIFICACION DEL METODO INDIRECTO PARA ENSAYO DE ANTIGENO



1.-Placa cubierta con el antígeno

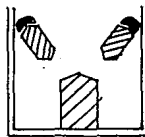
Lavado



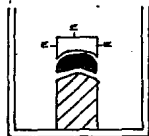
No hay antígeno
 en la muestra
 probada

2.-Prueba de la muestra que contiene
 el antígeno junto con un anticuerpo
 de referencia

Lavado

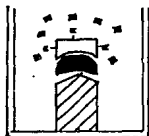
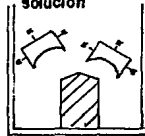


Reacción de antígeno
 en la muestra probada
 con el anticuerpo en
 solución



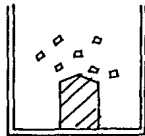
3.-Adicionar el conjugado enzima
 antiglobulina

El conjugado se fija
 a el anticuerpo inmovilizado
 Lavado



4.-Adicionar el sustrato de la enzima

La degradación del
 sustrato indica que
 la muestra ensayada
 no contiene el antígeno



La no degradación del
 sustrato indica que
 la muestra contiene
 el antígeno

TABLA C
 APLICACIONES DE ELISA

	Tipo de determinaciones
Hormonas	HCG, FSH, LH, Insulina, Hormona tiroidea, Progesterona, Testosterona y Cortisol
Componentes sericos	IgG, IgE, Ferritina
Marcador tumoral	AFP (alfa feto proteina) CEA (Antigeno carcino embrionario)
Enfermedades Infecciosas Bacterianas	Anticuerpos contra Salmonella "O", <u>E. coli</u> <u>Vibrio cholerae</u> , <u>Brucella abortus</u> , Neisseria, Clamydia
Enfermedades Micoticas	Anticuerpos contra Aspergillus y <u>Candida albicans</u>
Enfermedades Virales	Anticuerpos contra Rubiola, Citomagalovirus Herpes, Hepatitis B
Enfermedades Parasitarias	<u>Plasmodium falciparum</u> , Tripanosoma

Tambien se han realizado aplicaciones en Veterinaria y Agricultura.

II FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA

En las secreciones externas como saliva, fluido bronquial, lágrimas, fluido vaginal, mucosa nasal, etc, existen anticuerpos secretores como IgG, IgM e IgA donde hay un predominio de la inmunoglobulina A, la cual se conoce como IgA secretora, esta proporciona un mecanismo de defensa primario contra la infección local de microorganismos patógenos como virus, bacterias, hongos y protozoarios. Así mismo se ha demostrado que la concentración de anticuerpos en líquidos secretores tiene una correlación más directa con la resistencia al acceso de sustancias extrañas, al sistema inmunitario, que con los títulos de anticuerpos séricos que se manifiestan en periodos más prolongados.

En las infecciones del tracto genital femenino existen procesos patológicos como la vulvovaginitis, vulvitis, cervicitis, endometritis y enfermedades realmente graves y potencialmente mortales, como la celulitis pélvica y la tromboflebitis séptica. Los microorganismos pueden alcanzar planos superiores como resultado de infección en vulva y en vagina o por diseminación hematológica.

La vulvovaginitis se caracteriza por uno o más de los siguientes signos mal olor, aumento en la secreción vaginal, el cual puede ser espeso o cremoso, de color amarillo o verde, causado por un aumento en la concentración de leucocitos polimorfonucleares; las características del exudado pueden variar dado que existen infecciones mixtas. Los síntomas más comunes son

prurito, irritación o ardor vulvar, dolor y ardor al orinar. Los agentes etiologicos son multiples y pueden ser Gardnerella vaginalis, Trichomonas vaginalis, Candida albicans, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, en niñas Enterobius vermicularis y la combinación de dos o tres de los agentes anteriores entre otros.

El diagnostico se realiza en base a la historia clinica y a la exploracion fisica, posteriormente por un cultivo en condiciones aerobias y anaerobias, extensión en fresco de exudado vaginal y tambien se puede realizar un estudio de Papanicolao.

Dado que en ocasiones por medio de un cultivo de exudado vaginal no es posible determinar al agente etiológico, ya sea por el tiempo que se requiere para realizarlo o por una mala toma de muestra, se ha recurrido a los estudios inmunológicos, como pudiera ser la determinación de anticuerpos por metodos inmunoenzimáticos como ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) donde la reacción inmunologica debe seguir una reacción indicadora para que la actividad enzimatica que está fijada al complejo antígeno-anticuepo pueda ser determinada fotometricamente.

III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad las infecciones vaginales se presentan como un problema de salud pública, a nivel mundial hay una gran frecuencia con consecuencias que pueden llegar a ser mortales, también en la práctica ginecológica representa un conflicto por los múltiples agentes infecciosos predominantes. Existen factores predisponentes como la higiene personal deficiente, irritación y traumatismos locales, cambios de pH, anticonceptivos o duchas vaginales, déficit de estrógenos, los cuales aunados a la falta de cultura e ignorancia hacen que la infección se perpetue.

La mujer sexualmente activa también aumenta la gran incidencia de la enfermedad porque si cambia de pareja o se prostituye transmite agentes infecciosos por vía venerea. Como una propuesta se pretende que cuantificando IgA en secreción vaginal de pacientes sintomáticas se relacione con el agente etiológico lo que representaría una alternativa a el diagnóstico.

IV OBJETIVOS

Obtención de muestras de fluido vaginal en pacientes sintomáticas.

Estandarización del método ELISA para determinar IgA.

Determinación de IgA en muestras de fluido vaginal por medio del método ELISA.

Relacionar valores de IgA en muestras vaginales con el agente etiológico para un posible diagnóstico y tratamiento.

V HIPOTESIS

Como la IgA es un mecanismo de defensa primaria en secreciones externas al cuantificarse en pacientes con vulvovaginitis se espera encontrar el tipo de agente infeccioso y así mismo poder establecer un posible diagnóstico dependiendo del título de anticuerpo.

VI MATERIAL Y METODOS

MATERIAL

Material Biológico

Muestras de fluido vaginal de pacientes con vulvovaginitis

IgA calostrai

Anti-IgA de conejo

Conjugado IgG-anti IgA Cappel

Albumina sérica bovina

Reactivos

Carbonato de sodio anhidro	J. T. Baker
Bicarbonato de sodio	J. T. Baker
Cloruro de sodio	Productos Químicos Monterrey
Fosfato de potasio monobásico	J. T. Baker
Fosfato de sodio dibásico dodeca- hidratado	J. T. Baker
Cloruro de potasio	Merck
Acido cítrico	Merck
Fosfato de sodio monobásico anhidro	J. T. Baker
Peróxido de hidrógeno	Productos Químicos Monterrey

Tween 20	Sigma
Ortofenilendiamina	Sigma
Agua bidestilada	

Material de vidrio

Tubos de ensayo 12x75 y 18x150	Pyrex
Vasos de precipitado 100, 250, 500 y 1000 ml.	Pyrex
Matraz Erlen-Meyer 250, 500 ml.	Kimax
Matraz aforado 250, 500, 1000 y 2000 ml.	Pyrex
Pipetas graduadas 0.1, 1.5 y 10 ml.	Pyrex
Probetas 10, 50, 100 y 500 ml.	Pyrex
Matraz balon 500 ml.	Pyrex
Refrigerante	Pyrex
Cabeza de destilacion	Pyrex
Colector	Pyrex
Pipetas Pasteur	Pyrex

Equipo

Balanza granataria	Ohaus
Balanza analitica	Mettler 80
Potenciometro	Sargent-Weich
Agitador	Vortex-Genie

Pipeta de emboio 20 - 100 μ l.	Brand-W Germany
Espectrofotometro de ELISA	Dynatech MR 250
Incubadora	Rlossa
Refrigerador de 11 pies cúbicos	Mabe
Centrifuga Clínica	Sol-bat
Olla 12 lts.	Presto Steele
Placas de poliestireno para microhemaglu- tinación	Cooke Microtiter
Micropipetas 100 μ l.	Cooke
Termómetro -10 a 200° C	Propper Trophy
Tripie metálico	
Mechero Fisher	
Mechero Bunsen	
Anillo metálico	
Soporte universal	
Gradilla para 72 tubos	
Espátula de acero inoxidable	
Jeringas desechables	Plastipack
Puntas para pipeta automática de 100 μ l.	
Tapones para viales	
Bulbos de plástico para pipeta Pauster	
Papel Parafilm	American Company
Tapones metálicos para tubos de ensaye de 12x75	
Pisetas de 500 ml.	
Gasas	

Soluciones

Amortiguador de recubrimiento de Carbonato-Bicarbonato pH 9.6

Bicarbonato de sodio 2.9 g

Carbonato de sodio 1.59 g

Llevar a 1 litro en agua bidestilada

Se puede almacenar a 4°C por no más de dos semanas

Solución Buffer de Fosfatos-Tween pH 7.4

Cloruro de sodio 8.0 g

Fosfato de potasio monobásico 0.2 g

Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado 2.9 g

Cloruro de potasio 0.2 g

Tween 20 0.5 ml.

Llevar a 1 litro en agua bidestilada, almacenar a 4°C.

Substrato de la Peroxidasas

Amortiguador del substrato pH 5

Acido citrico 0.1 M 24.3 ml.

Fosfato de sodio monobásico anhidro 0.2 M 25.7 ml.

A 50 ml. se le adiciona 20 μ l. de peróxido de hidrógeno. Para cada placa se toman 10 ml. de esta mezcla y se adiciona 4 μ g. de Ortofenilendiamina, el substrato se prepara inmediatamente antes de usarse pues se daña con la luz.

METODO

Las muestras se obtienen de pacientes sintomaticas que previamente pasaron a consulta medica, despues de una exploración fisica se canalizaron al laboratorio clinico.

Antes de tomar la muestra se les hizo las siguientes preguntas:

-Edad

-Fecha del periodo de menstruacion

A las muestras obtenidas se les realizó la titulación de IgA secretora por la técnica de ELISA y a la vez un cultivo microbiológico.

El cultivo de la muestra vaginal fue realizado por personal del Centro Medico de Ciudad Universitaria en coordinacion con tesisistas que trabajaron con pacientes del Centro de Salud Portales de la Secretaria de Salubridad, los resultados del cultivo microbiológico fue correlacionado con los titulos de anticuerpo obtenidos por ELISA.

TECNICAS

Toma de muestra

A la paciente se le cita sin aseo vaginal

1.- Se le coloca en la vagina un espejo vaginal

2.- Después de que se le toma con hisopos la muestra del exudado para cultivo y frotis, se adiciona 2 ml. de PBS con ayuda de una jeringa a manera de lavar el área.

- 3.- Colectar con una pipeta Pasteur la solución con el exudado
 - 4.- Colocar la muestra en tubos de ensayo de 12x75
 - 5.- Mantener la muestra en hielo para su transportación al laboratorio.
 - 6.- Centrifugar la muestra a 2500 rpm durante 5 min.
 - 7.- Separar el sobrenadante con una pipeta Pasteur y colocarla en un vial eso se realiza frente a un mechero.
 - 8.- Etiquetar la muestra, guardarla en congelación hasta su utilización .
- Todo el material utilizado, así como la solución es estéril.

Para estandarizar la técnica ELISA se requirió de una muestra positiva, la cual se verificó que presentara título de IgA por medio de la técnica de inmunodifusión Radial Simple.

inmunodifusión radial simple

Se realizó en una placa de inmunodifusión que determina IgA humana a bajas concentraciones (0.5-7.9 IU/ml). La placa contiene una cadena de antisuero específico para IgA humana en gel-agarosa.

- 1.- Se llenan los pozos con 20 μ l de las diluciones estándar (3 diferentes concentraciones). Del pozo 1 al 3. Para medir un volumen preciso es recomendable usar un Dispenser Behring o una micropipeta.
- 2.- Después colocar 20 μ l. de la muestra problema en los demás pozos.

- 3.- dejar reposar la placa de 10 a 20 min a temperatura ambiente.
- 4.- Meter a refrigeración.
- 5.- despues de 2-3 días, medir el diametro del precipitado.

ELISA

Titulacion de peroxidasa unida a un anticuerpo

- 1.- Tomar 11 tubos y etiquetarlos del 1 al 11, hacer diluciones de anti-IgA con amortiguador de carbonatos, al doble a partir de una concentracion de 1:50. Teniendo cuidado de mezclar bien cada tubo.
- 2.- Colocar en los pozos de la columna 1, 100 μ l de la dilución 1, hacer lo mismo con el resto de las diluciones, la hliera 12 solo lleva PBS Tween.
- 3.- Dejar en camara húmeda durante 18 hrs. a 4°C.
- 4.- Tirar el sobrenadante y bloquear con PBS-Albumina serica bovina al 1% durante 30 minutos. Se colocan 200 μ l a cada pozo.
- 5.- Tirar el sobrenadante y lavar 3 veces con PBS-Tween dejando actuar 1 minuto la solución de lavado, antes de tirar los sobrenadantes.
- 6.- Colocar 7 tubos en una gradilla y etiquetarlos de la A-G, hacer diluciones al doble de IgA a partir de una concentración de 2 mg/ml.
- 7.- colocar 100 μ l del tubo A en la fila A, hacer lo mismo en el resto de los tubos, a la fila H solo se agrega PBS.
- 8.- Dejar la placa a temperatura ambiente en camara humeda

durante 2 horas.

9.- Lavar 4 veces con PBS -Tween igual que en 5.

10.-Adicionar 100 μ l del conjugado de Cappel a cada pozo, colocar en cámara húmeda durante 2 horas.

11.-Lavar 4 veces con PBS-Tween igual que en 5.

12.-Adicionar 100 μ l del sustrato de peroxidasa a cada pozo e incubar a 37° C durante 15 minutos.

13.-Parar la reacción con ácido sulfúrico 4N.

14.-Leer la densidad optica a 492 nm.

Titulación de peroxidasa unida a la IgA

1.- Se colocan 100 μ l de anti IgA dilución 1:3200 en cada uno de los pozos hasta llenar toda la placa.

2.- Dejar en cámara húmeda durante 18 hrs. a 4 C.

3.- Tirar el sobrenadante y bloquear con PBS-Albúmina sérica bovina al 1% durante 30 minutos. Se colocan 200 μ l. a cada pozo.

4.- Tirar el sobrenadante y lavar tres veces con PBS-Tween dejando actuar 1 minuto la solución de lavado, antes de tirar los sobrenadantes.

5.- Colocar 100 μ l de la muestra i en el tubo 1 y así sucesivamente hasta completar toda la placa, al pozo 12H se le coloca solución PBS.

6.- Dejar la placa a temperatura ambiente en cámara húmeda durante 2 horas.

7.- Lavar cuatro veces con PBS-Tween igual que en 4.

- 8.- Adicionar 100 μ l. del conjugado de Cappel a cada pozo, colocar en cámara húmeda durante 2 horas.
- 9.- Lavar cuatro veces con PBS-Tween igual que en 5.
- 10.-Adicionar 100 μ l. del sustrato de peroxidasa a cada pozo e incubar a 37°C durante 15 minutos.
- 11.-Parar la reacción con ácido sulfúrico 4N
- 12.-Leer la densidad óptica a 492 nm.

CULTIVO DE LA MUESTRA VAGINAL

Cultivo microbiológico realizado a muestras de pacientes del Centro de Salud Portales

A cada una de las muestras de exudado vaginal se les realizó una observación microscópica directa y una observación con una gota de solución glucosada.

- Se observó presencia de aminas con una gota de KOH al 10%
- Se determinó pH a la muestra con papel indicador.
- Se realizó tinción de Gram y de Giemsa
- Se sembró la muestra en los siguientes medios de cultivo:
Agar Sangre, agar chocolate (anaerobiosis), agar EMB, agar columbia, agar papa dextrosa, agar sal y manitol.
- Se realizaron pruebas bioquímicas.

Cultivo microbiológico realizado a la muestras de pacientes del Centro Medico de Ciudad Universitaria.

A cada una de las muestras de exudado vaginal se les realizo una observacion microscopica en fresco.

-Se les hizo una tinción de gram.

-Se sembro la muestra en los siguientes medios de cultivo:

Agar sangre, agar sal y manitol y agar biggy.

VII RESULTADOS

Se procesaron 95 muestras de pacientes sintomaticas pertenecientes al Centro de Salud Portales de la Secretaria de Salubridad y al Centro Medico de Ciudad Universitaria.

A las muestras se les determinó un titulo de IgA secretora el cual se relaciono con el agente etiologico.

Se observó la relacion del titulo de IgA secretora con respecto al ciclo menstrual de pacientes regulares.

Se determinó la frecuencia con que se presentaron los agentes etiologicos.

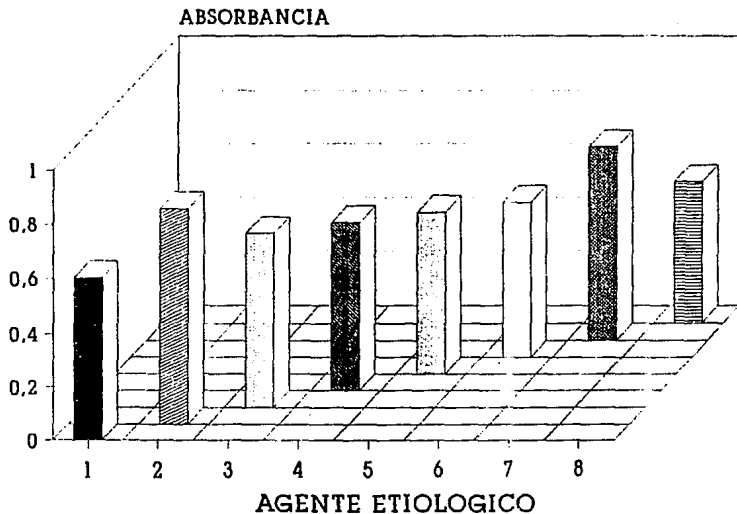
Se obtuvo la frecuencia de la edad de las pacientes.

Tabla 1a

Media del título de Iga secretora en relación con el agente etiológico en pacientes del Centro de Salud

Agente etiológico	Absorbancia
<u>Gardnerella vaginalis</u>	0.601
<u>Candida albicans</u>	0.796
<u>Escherichia coli</u>	0.586
<u>G. vaginalis</u> y <u>Candida sp.</u>	0.641
<u>T.vaginalis</u> , <u>G. vaginalis</u> y <u>Candida sp.</u>	0.620
<u>S. aureus</u> y <u>G. vaginalis</u>	0.596
<u>Staphylococcus sp</u> y <u>G. vaginalis</u>	0.596
<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	0.712
<u>Staphylococcus sp</u>	0.520
<u>Citrobacter sp.</u>	0.508
<u>Candida sp</u> y <u>T. vaginalis</u>	0.805
<u>G. vaginalis</u> y <u>E. coli</u>	0.578
<u>T. vaginalis</u> y <u>G. vaginalis</u>	0.484
<u>S.sp</u> , <u>E. coli</u> y <u>G. vaginalis</u>	0.610
<u>Candida sp</u> y <u>Staphylococcus sp</u>	0.806

RELACION DE LA MEDIA DEL TITULO DE IG A CON EL AGENTE ETIOLOGICO



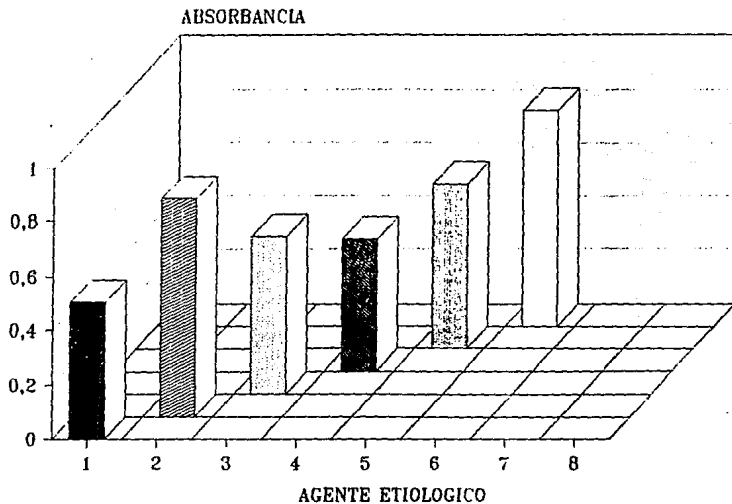
GRAFICA 1a.

CENTRO DE SALUD.

AGENTE ETIOLÓGICO

- 1 Gardereella vaginalis
- 2 Candida albicans
- 3 Gardereella vaginalis y C. sp
- 4 Trichomonas vaginalis G. vaginalis y Candida sp.
- 5 Staphylococcus aureus Gardereella vaginalis
- 6 Staphylococcus sp. G. vaginalis
- 7 Neiseria gonorrhoeae
- 8 Staphylococcus sp.

RELACION DE LA MEDIA DEL TITULO DE IG A CON EL AGENTE ETIOLOGICO



GRAFICA 1a.

CENTRO DE SALUD

AGENTE ETIOLOGICO

Centro de Salud

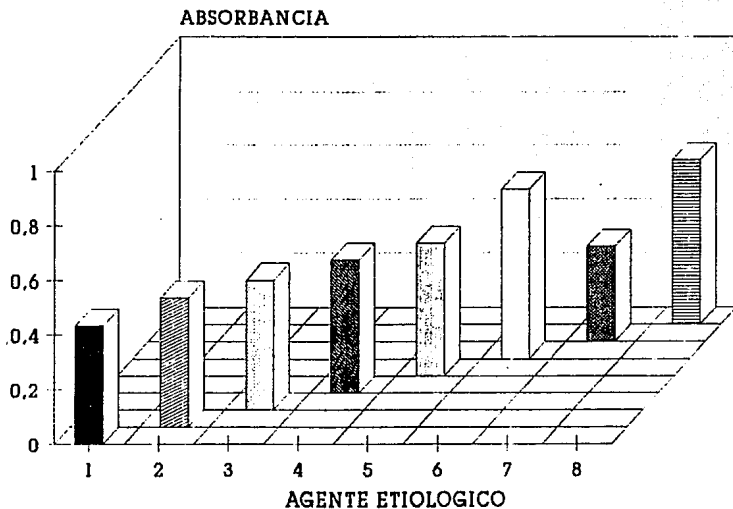
- 1 Citrobacter
- 2 Candida sp y Trichomona vaginalis
- 3 Gardnerella vaginalis y E. coli
- 4 Trichomona vaginalis y G. vaginalis
- 5 Staphylococcus sp., E.coli y G. vaginalis
- 6 Candida sp y Staphylococcus sp

Tabla 1b

Medía del título de IgA secretora en relación con el agente etiológico en pacientes del Centro Médico de C.U.

Agente etiológico	Absorbancia
<u>Gardnerella vaginalis</u>	0.431
<u>Candida albicans</u>	0.474
<u>Escherichia coli</u>	0.475
Levaduras	0.486
<u>Staphylococcus aureus y G. vaginalis</u>	0.623
<u>Staphylococcus aureus</u>	0.349
<u>Streptococcus pyogenes</u>	0.606
<u>E. coli, Proteus mirabilis</u> y Levaduras	0.498
<u>E. coli y S. aureus</u>	0.771
<u>S. aureus y Levaduras</u>	0.389
<u>E. coli, S. aureus y C. albicans</u>	0.693
<u>G. vaginalis y E. coli</u>	0.158
<u>Klebsiella sp. y S aureus</u>	0.459

RELACION DE LA MEDIA DEL TITULO DE IG A CON EL AGENTE ETIOLOGICO



GRAFICA 1b.

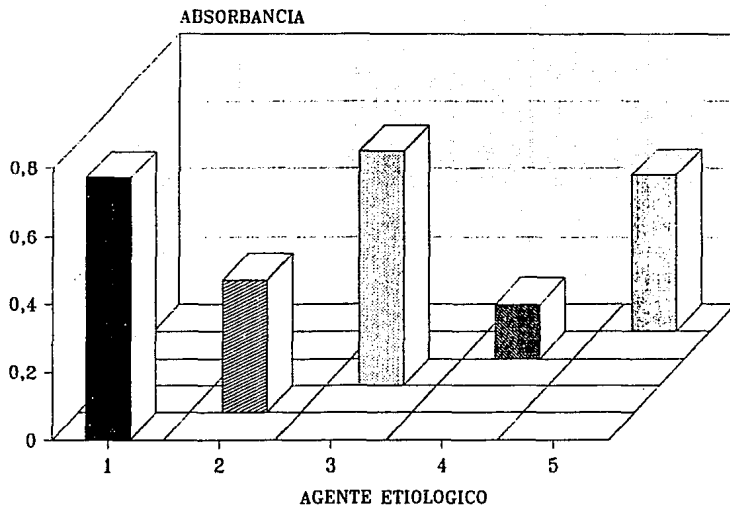
CENTRO MEDICO DE C.U.

AGENTE ETIOLOGICO

CENTRO MEDICO DE C.U.

- 1 Gardnerella vaginalis
- 2 Candida albicans
- 3 Escherichia coli
- 4 Levadura
- 5 S. aureus y G. vaginalis
- 6 Staphylococcus aureus
- 7 Streptococcus pyogenes
- 8 E. coli, P. mirabilis y Levaduras

RELACION DE LA MEDIA DEL TITULO DE IG A CON EL AGENTE ETIOLOGICO



GRAFICA 1b.

CENTRO MEDICO DE C.U.

AGENTE ETIOLOGICO

CENTRO MEDICO DE C.U.

- 1 E. coli y S. aureus
- 2 S. aureus y Levaduras
- 3 E. coli, S. aureus y C. albicans
- 4 Gardnerella vaginalis y E. coli
- 5 Klebsiella sp y S. aureus

TABLA 2

Título de IgA secretora de muestras con cultivo negativo

No de muestra	Absorbancia	No de muestra	Absorbancia
8	0.717	61	0.410
9	0.745	63	0.509
13	0.689	65	0.641
22	0.490	66	0.349
38	0.731	67	0.502
42	0.488	68	0.416
44	0.488	71	0.405
45	0.435	75	0.532
47	0.541	77	0.549
49	0.717	80	0.579
52	0.581	82	0.439
54	0.104	85	0.265
56	0.435	88	0.304
58	0.443	95	0.336
59	0.643		

Signos clínicos

No. de muestra

8	Flujo blanco grueso, placas blanquecinas alrededor del cervix.
9	Leucorrea amarillenta, con placas eritematosas
13	Leucorrea poco abundante grisacea
22	Leucorrea blanca gruesa, no fetida

Los signos de las demás pacientes no se pudieron obtener debido a que no fue posible tomar las muestras personalmente.

TABLA 3a

Media del título de IgA secretora con respecto al ciclo menstrual en pacientes del Centro de Salud

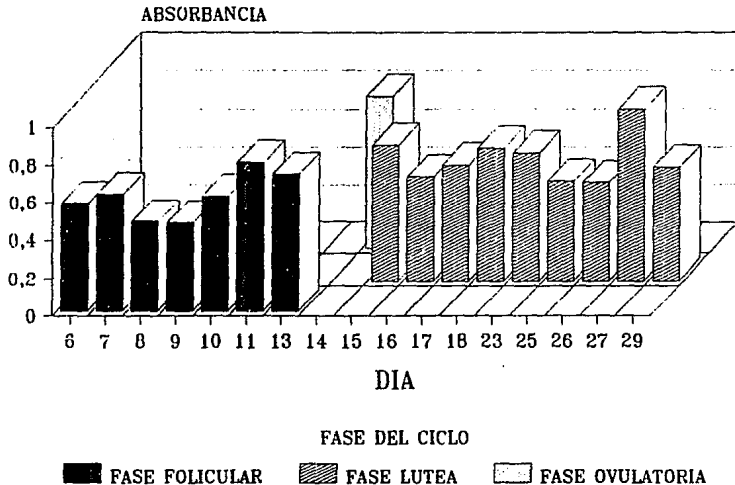
Día	Absorbancia	Fase
6	0.574	Folicular
7	0.625	Folicular
8	0.474	Folicular
9	0.469	Folicular
10	0.614	Folicular
11	0.797	Folicular
13	0.732	Folicular
14	0.806	Ovulatoria
15	0.717	Lútea
16	0.551	Lútea
17	0.615	Lútea
18	0.701	Lútea
23	0.676	Lútea
25	0.528	Lútea
26	0.520	Lútea
27	0.906	Lútea
29	0.603	Lútea

EMBARAZADAS

6 MESES	0.666
2 MESES	0.657

* Solo se tomaron en cuenta títulos de mujeres con ciclo menstrual regular.

RELACION DEL TITULO DE IGA SECRETORA CON EL CICLO MESTRUAL



GRAFICA 2a.

Tabla 3b

Media del Titulo de IgA secretora con respecto
al ciclo menstrual en pacientes del centro medico de C.U.

Dia	Absorbancia	Fase
5	0.492	Folicular
6	0.392	Folicular
7	0.198	Folicular
8	0.459	Folicular
9	0.410	Folicular
10	0.606	Folicular
13	0.452	Folicular
14	0.528	Ovulatoria
15	0.412	Lútea
16	0.612	Lútea
18	0.556	Lútea
19	0.433	Lútea
20	0.424	Lútea
21	0.484	Lútea
23	0.198	Lútea
24	0.372	Lútea
25	0.460	Lútea
26	0.391	Lútea
28	0.532	Lútea
29	0.471	Lútea

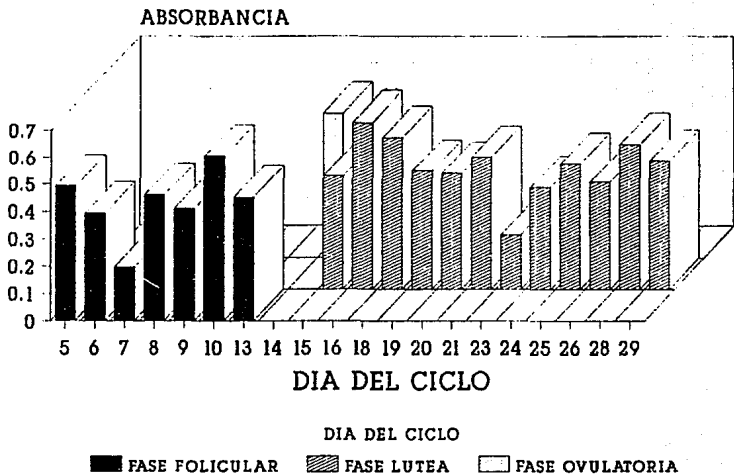
EMBARAZADAS

4 MESES Y MEDIO 0.563

8 MESES 0.389

■ Solo se tomaron en cuenta obsorbancias de mujeres con ciclo menstrual regular.

RELACION DEL TITULO DE IGA SECRETORA CON EL CICLO MESTRUAL



CENTRO MEDICO DE C. U.
GRAFICA 2b.

Tabla 4

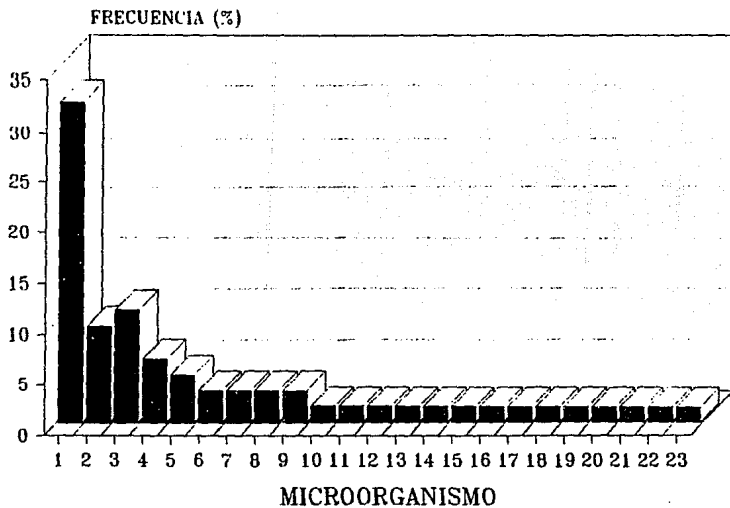
Relación de la frecuencia en porciento de pacientes
con respecto al agente etiológico

Frecuencia (%)	Agente etiológico
31.74	<u>Gardnerella vaginalis</u>
9.52	<u>Candida albicans</u>
11.11	<u>G. vaginalis</u> y <u>C. albicans</u>
6.34	<u>Escherichia coli</u>
4.76	Levaduras
3.17	<u>T. vaginalis</u> , <u>G.vaginalis</u> y <u>Candida albicans</u>
3.17	<u>S. aureus</u> y <u>G. vaginalis</u>
3.17	<u>S. sp</u> y <u>G. vaginalis</u>
3.17	<u>Neisseria gonorrhoeae</u>
3.17	<u>G. vaginalis</u> y <u>E. coli</u>
1.58	<u>Staphylococcus aureus</u>
1.58	<u>Staphylococcus sp.</u>
1.58	<u>Citrobacter sp.</u>
1.58	<u>Candida sp</u> y <u>T. vaginalis</u>
1.58	<u>Streptococcus pyogenes</u>
1.58	<u>E. coli</u> , <u>P. mirabilis</u> y Levaduras
1.58	<u>E. coli</u> y <u>S. aureus</u>
1.58	<u>S. aureus</u> y Levaduras

1.58	<u>E. coli</u> , <u>S. aureus</u> y <u>C. albicans</u>
1.58	<u>Klebsiella sp</u> y <u>S. aureus</u>
1.58	<u>T. vaginalis</u> y <u>G. vaginalis</u>
1.58	<u>S. sp</u> , <u>E. coli</u> y <u>G. vaginalis</u>
1.58	<u>Candida sp</u> y <u>S. sp.</u>

• Las pacientes corresponden a las poblaciones del Centro de Salud y del Centro Medico de Ciudad Universitaria.

RELACION PACIENTE-AGENTE ETIOLOGICO (%)



GRAFICA 3

RELACION PACIENTE-AGENTE ETIOLOGICO (%)

- 1 Gardnerella vaginalis
- 2 Candida albicans
- 3 G. vaginalis y Candida sp
- 4 Escherichia coli
- 5 Levaduras
- 6 T. vaginalis, G. vaginalis y C. sp
- 7 S. aureus y G. vaginalis
- 8 Staphylococcus sp y G. vaginalis
- 9 Neisseria gonorrhoeae
- 10 G. vaginalis y E. coli
- 11 Staphylococcus aureus
- 12 Staphylococcus sp
- 13 Citrobacter sp
- 14 C. sp y Trichomonas vaginalis
- 15 Streptococcus pyogenes
- 16 E. coli, Proteus mirabilis y Levaduras
- 17 E. coli y Staphylococcus aureus
- 18 Staphylococcus aureus y C. albicans
- 19 E. coli, S. aureus y C. albicans
- 20 Klebsiella sp y S.aureus
- 21 T. vaginalis y G. vaginalis
- 22 S.sp, E. coli y G. vaginalis
- 23 Candida sp y Staphylococcus sp

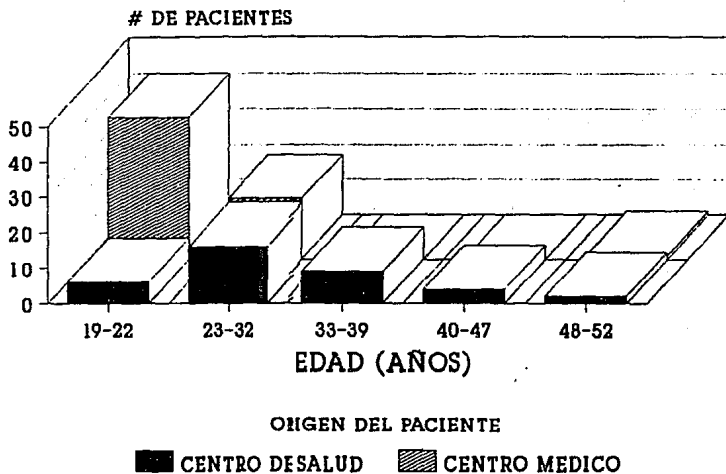
Tabla 5**Frecuencia de edades de pacientes del Centro de Salud**

Número de Pacientes	Rango de Edad (años)
6	19 - 22
16	23 - 32
9	33 - 39
4	40 - 47
2	48 - 52

Tabla 6**Frecuencia de edades de pacientes del Centro Medico de C. U**

Número de Pacientes	Rango de Edad (años)
40	19 - 22
17	23 - 32
0	33 - 39
0	40 - 47
1	48 - 52

FRECUENCIA DE PACIENTES DE ACUERDO A LA EDAD



GRAFICA 4

VIII DISCUSION DE RESULTADOS

1.- En las gráficas 1a y 1b se relacionan las medias de las absorbancias de la IgA secretora con respecto a los agentes etiologicos de las muestras de pacientes del Centro de Salud Portales y del Centro Medico de Ciudad Universitaria las cuales casi siempre son superiores al 0.3, esta absorbancia se podria tomar como un indice de que en muestras patologicas se esperaria un titulo superior o semejante, dichas lecturas corresponden a muestras de pacientes que presentan un agente o asociaciones de dos o tres agentes causales debido a que se realizo la titulacion de IgA secretora no especifica al agente etiologico.

De manera general en las dos poblaciones se presentaron asociaciones de agentes etiologicos diferentes, la poblacion del Centro de Salud presento en mayor proporcion asociacion de tres agentes causales comparado con la del Centro Medico que generalmente presento dos, claramente existe una diferencia entre las dos poblaciones que puede darse por el nivel socioeconómico, cultural y sobre todo de higiene.

2.- En la tabla 2 se presentan lecturas de muestras que tuvieron como resultado un cultivo negativo, se esperaria que las absorbancias fueran bajas o no detectables, sin embargo no sucedio asi; una posible explicacion seria una mala toma de muestra o un mal aislamiento en el cultivo. Un cultivo negativo no garantiza que no exista un agente etiologico causando leucorrea en la paciente, ya que todas las pacientes estudiadas fueron sintomaticas.

3.- Con respecto a las graficas 2a y 2b en donde se asocia el ciclo menstrual con la media del titulo de IgA secretora de las pacientes, se observaron lecturas del anticuerpo muy semejantes tanto en la fase folicular, ovulatoria y lútea. Se esperaba encontrar diferencia en la fase ovulatoria ya que la bibliografía reporta que a la mitad del ciclo menstrual se presenta una disminucion del anticuerpo (12). Sin embargo las lecturas observadas se pueden relacionar a la presencia del agente etiologico como consecuencia de una respuesta inmunologica a una infeccion dada.

También se observo que en mujeres embarazadas el titulo de IgA secretora no decrecio como se esperaba, ya que las hormonas sexuales como la progesterona y los estrogénos en concentraciones por arriba de lo normal como sucede en personas preñadas inhiben de manera importante la formacion de anticuerpos con lo cual se explicaria que el titulo obtenido es por consecuencia de la estimulación antigenica.

4.- De acuerdo a las gráfica 3 donde se observa la relación entre el por ciento del agente etiológico con respecto a las pacientes, se presento *Gardnerella vaginalis* como el agente causal más frecuente en ambas poblaciones, esto coincide con las referencias bibliograficas (14) donde presentan que las vaginitis inespecificas o bacterianas son las más frecuentes.

Con respecto a la presencia de los agentes etiologicos que no se caracterizan por dañar propiamente a la vagina se puede justificar con el hecho de que la paciente podria ejercer la

relacion sexual con su pareja de manera no habitual probablemente genito bucal o anal.

5.- En cuanto a la frecuencia en la edad de las pucientes la grafica 4 muestra que el rango predominante en el Centro Medico de C.U. es de 19 a 22 años lo que explica que su poblacion es meramente estudiantil y que tal vez inician su vida sexual mas temprano en comparacion con la poblacion del Centro de Salud.

La poblacion del Centro de Salud tiene una mayor frecuencia en el rango de 23 a 32 años y generalmente son amas de casa con un estrato social bajo.

IX CONCLUSIONES

- 1.- Toma de muestra: La extracción de la muestra se realizó con un volumen óptimo de dos mililitros de PBS esteril, ya que con un mililitro no se obtenía suficiente fluido para la cuantificación del anticuerpo.
- 2.- Extracción de la muestra: La extracción de la muestra nosotros recomendamos se efectue con pipeta Pasteur a la que se le quiten los bordes y filos mediante calor con el fin de evitar lastimar o lacerar la mucosa vaginal de las pacientes.
- 3.- Estandarización de la técnica ELISA: Para la estandarización se utilizo placas de inmunodifusion radial IgA especifica con el fin de verificar si las muestras presentaban concentración de IgA secretora detectable, para de esta manera conocer que concentración de Anti IgA utilizar en la estandarización de la técnica.
- 4.- Resultados: No se pudo establecer una relacion directa entre el tipo de agente etiológico y el titulo de IgA secretora para un posible diagnóstico, ya que debió realizarse la determinación especifica para el microorganismo, por lo que se sugiere darle seguimiento, de esta manera seria de gran ayuda para el médico.
- 5.- Los resultados obtenidos demuestran que cuando existen uno o varios agentes etiológicos causando cualquier tipo de vaginitis se va a encontrar niveles de IgA secretora altos o

- bajos para lo cual va influir tambien que tan dañada este la mucosa vaginal.
- 6.- No se puede observar la relación que tienen las hormonas sexuales y el ciclo sexual con el nivel de anticuerpos, ya que el proceso de los estrógenos lleva a proporcionar un medio de defensa al igual que la IgA secretora, por lo que un decremento en una u otra originaría el fácil acceso del microorganismo.
 - 7.- Para establecer niveles de IgA secretora en el ciclo sexual se recomienda realizar un seguimiento durante los 28 días en personas sanas.
 - 8.- Las poblaciones estudiadas son de diferentes niveles socioeconómicos, culturales y hábitos higiénicos, ya que los resultados reflejan este hecho principalmente en el tipo de asociaciones del agente causal encontradas.
 - 9.- Queda establecido que la etapa sexualmente activa de la mujer es un factor predisponente para contraer vaginitis, enfermedades venéreas e incluso SIDA.
 - 10.- No se pudo obtener valores o niveles de IgA secretora en personas sanas debido a lo traumático que resulta la toma de muestra y es difícil que las pacientes se presten a esto.
 - 11.- Se observó que el método ELISA es funcional, sensible ya que detecta hasta ng , sencillo, el único inconveniente es su costo por lo cual no es muy accesible para realizarse en un laboratorio de rutina. Generalmente se maneja como una prueba especial en hospitales de tercer nivel.

12.- Debido a la naturaleza de los resultados obtenidos donde se detecta una gran variabilidad de factores afectando una misma problemática no fue posible efectuar un análisis estadístico el cual se propone manejando un grupo mayor de pacientes a las que se les cuantifique la IgA antigeno específica.

X BIBLIOGRAFIA

- 1.- Stites D., Fudenberg H, Stobo J, Wells J. *Inmunologia basica y clinica*. 5a ed. Mexico: El manual moderno, 1985: 190-200 .
- 2.- Tomasi B.J, Blenenstoch J. Characteristic of an immune system common to certain external secretions. Division of experiaental Medicine, University of Vermont, College of medicine 1984; 101-124.
- 3.- Sela M. *The antigens. USA: Academic Press, 1974: 375-376.*
- 4.- Barrett J. T. *Inmunologia, Inmunoquimica e Inmunobiologia*. 4a ed. Mexico: Interamericana, 1985: 101-118.
- 5.- Hanson L.A, Ahistedts, Andersen. The properties biologic of secretory IgA. *J. Reticuloendothel. Soc.* 1980; 28(supply) 1-9.
- 6.- Cebra J, Small P.A. Polypeptide chain structure of rabbit immunoglobulins. III Secretory A Immunoglobulin from calostrum. *Immunochemistry* 1967; 6: 503-512.
- 7.- Kobayashi K. Studies on human secretory IgA comparative studies of the IgA-bound secretory piece and the free secretory piece protein. *Immunochemistry* 1971; 8: 785-800.
- 8.- Fernández del Castillo, Tommasi E, Andreoli C. Actualización Diagnostica y Terapeutica de las vaginitis.. *Atencion Médica* 1976; 6(4): 10-31.
- 9.- Leslie V. H, Hill, Embil J. A. Vaginitis: Curret microbiologic and clinical concepts. *Can Med Assoc J.* 1986; 131(15).

- 10.- Conde Gonzalez C. J. Cervicovaginitis: Una vision panoramica. *Infectologia* 1985; 5(2): 30-31.
- 11.- Kutteh W H, Hatch K D, Blachwell R. E, Mestecky J. Secretory immune system of the female reproductive tract: I. Immunoglobulin an secretory component- containing cells. *Obstet-Gynecol* 1988; 71(1): 56-60.
- 12.- Briese V, Hoffman R, Meissner J, Straube W. Dtection of secretory immunoglobulin in cervical secretion and in cervicovaginal irrigation fluids. *Zentralbi-Gybakol* 1983; 105(4): 229-235.
- 13.- Bailey-Scott. *Diagnostico Microbiologico*. Buenos Aires: Panamericana, 1983: 101-103.
- 14.- Walss R J, Melendez H, Tellez I. Flora bacteriana cervicovaginal en mujeres sanas. *Ginecologia y Obstetricia de Mexico* 1988; 56: 57-61.
- 15.- González S. N, Torales A, Gomez B D. *Infectologia Clinica*. 2a ed. Trillas, 1984: 442-456.
- 16.- Hoeprich P. D. *Tratado de enfermedades infecciosas*. Barcelona: Salvat, 1982: 442-459.
- 17.- De la Cruz G, Calderón E. Diagnostico rapido de infecciones cervicovaginales. *Infectologia* 1985; 1(5): 115-121.
- 18.- Gough P. M, Warnock D.W, Richardson M. D, Mansell N J. IgA and IgG antibodies to *Candida albicans* in the genita tract secretions of women with or without vaginal candidosis. *Sabouradia* 1984; 22(4): 265-271.

- 19.- Burges G, Holley H. P, Virella G. Immunoglobulin class of anti-Candida antibodies in patients with vaginal candidiasis. *Diagn Immunol* 1986; 4(1): 43-46.
- 20.- Schonheyder H, Johansen J. A., Moller-Hansen C, Stenderup A. IgA and IgG serum antibodies to candida albicans in women of child-bearing age. *Sabouradia* 1983; 21(3): 223-231.
- 21.- Alderete J. F. Enzyme linked immunosorbent assay for detecting antibody to Trichomonas vaginalis: use of whole cells and aqueous extract as antigen. *Br-J-Vener-Dis* 1984; 60(3): 164-170.
- 22.- Jawetz E, Melnick J, Adelberg E. *Microbiologia Medica*. 12a ed. Mexico: El manual moderno, 1987: 274-286.
- 23.- Schading, Davie, Shafer. The cytologist and bacterioses of the vaginal-ectocervical area clues, commas an confusion. *The Journal of clinical cytologic and cytopathology* 1989; 33(3).
- 24.- Henry Bernard. *Diagnostico y Tratamiento Clinicos por el Laboratorio*. 8a ed. Barcelona: Salvat editores, 1988: 1309-1361.
- 25.- Lynch M J, Raphael S, Mellor L. D. *Metodos de laboratorio* 2a ed. Mexico: Interamericana, 1988: 1348-1361.
- 26.- Voller A, Didwell D, Bartlett A. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In *manual of clinical immunology* Roset F, 1980: 359-371.
- 27.- Boehringer Mannheim. *Enzimoimmunoensayo según el principio de ELISA principios y aplicacion*. Boehringer Mannheim GmbH.

Mexico.

- 28.- Volier A, Bidwell D, Bartlett A. The enzyme linked immunorbent assay ELISA. Dynatech Laboratories Inc. 1979.
- 29.- Wood G M, Trejdosiewicz L. K, Losowsky M. S. Elisa for measurement of secretory IgA distinct from monomeric IgA. J. Immunological methods 1987; 97: 269-274.
- 30.- Eschenbach D, Hillier S. Advances on Diagnostic testing for vaginitis and cervicitis. The journal of reproductive medicine. 1989;34 (8).
- 31.- Acosta A. G, Barranco A. C, Van Roost E, Vaerman J. P. Isolation and characterization of secretory IgA (SigA) and free secretory component (FSC) from rat bile. Molecular Immunology 1980; 17: 1525-1537.
- 32.- Verman J P, Hermans J. F, Bazin H, Beckers A. Identification and some properties of rat secretory component. J. Immunology 1975; 114: 265-269.
- 33.- Heisterberg L, Branebjerg P. E, Bremmelgaard A; Scheibel J. The role of vaginal secretory immunoglobulin A, Gardnerella vaginalis, anaerobes and Chlamydia trachomatis in postabortal pelvic inflammatory disease. Acta Obstet Gynecol-Scand 1987; 66(2): 99-102.
- 34.- Lammel C J, Sukeet R Lk, Rice P A, Knapp J. S, Schoolnick G. K. Antibody- antigen specificity in the immune response to infection with Neisseria gonorrhoeae. J-Infect-Dis 1985; 152(5): 990-1001.
- 35.- Wira Ch, Sandoe C.P. Specific IgA e IgG antibodies in the secretion of the female reproductive tract: effects of

- immunization and estradio on expression of this response in vivo. Journal of immunology 1987; 38(12).
- 36.- Briese V, Brock k, Hofmann R, Meissner J, Straube W. Secretary immunoglobulin A (S-IgA)/immunoglobulin A (IgA) ratio in cervico-vaginal lavage fluids. Zentralbl-Gynakol 1984; 106(9): 590-595.
- 37.- Petersdorf R, Adams R, Braunwald E. Principios de Medicina 6a ed Mexico: Mc Graw-Hill, 1986: 1246-1249.
- 38.- Goetz O, Dante M, López M. Las referencias bibliograficas en los escritos médicos. Salud Pública. 1988; 30: 760-765.
- 39.- Guyton Arthur. Tratado de Fisiología Médica 6a ed México: Interamericana, 1986: 1186-1188.
- 40.- Di-Fiore M, Mancini Roberto E, De Robertis E. Nuevo Atlas de Histología 3a ed Buenos Aires: El ateneo, 1976: 280-281.