

40
2m



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**CORRELACION DEL TITULO DE ANTICUERPOS DE
TIPO IgA e IgG POR LA TECNICA DE ELIZA
(ENSAYO INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMAS)
EN SALIVA DE ADULTOS CON O SIN INFLAMACION
PARODONTAL Y EL INDICE PARODONTAL GINGIVAL**

T E S I S

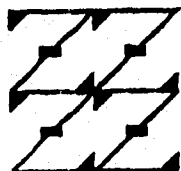
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

ANA BERTHA MELENDEZ VALDEZ

**U N A M
F E S
Z A R A G O Z A**



**LO HUMANO EJE
DE NUESTRA REFLEXION**

MEXICO, D.F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN
EL LABORATORIO L - 313 DE
INMUNOLOGIA DE LA FACULTAD DE
ESTUDIOS SUPERIORES**

ZARAGOZA

MEXICO D.F. 1996

ASESORES

Director de tesis:

Q.F.B. YOLANDA FLORES CABRERA

Asesor:

C.D. Ma TERESA DE JESUS ZARAGOZA MENESES.

JURADO:

PRESIDENTE	<i>Dr. Ruben Marroquin Segura</i>
VOCAL	<i>Q.F.B Yolanda Flores Cabrera</i>
SECRETARIO	<i>C.D Ma. Teresa Zaragoza Meneses</i>
SUPLENTE	<i>Q.F.B. Ma. Luisa Delgado Briseño</i>
SUPLENTE	<i>Q.F.B. Angel Barajas Chavarria</i>

AGRADECIMIENTOS

A LOS PROFESORES:

Dr. RUBEN MARROQUIN SEGURA

Q.F.B. YOLANDA FLORES CABRERA

C.D Ma TERESA ZARAGOZA MENESES.

Q.B.P. EVERARDO ESCAMILLA

Q.F.B. LUIS MORA

ING. RUBEN AGUILAR IRENE

**POR HABERME APOYADO A LO LARGO DE ESTE TRABAJO Y
POR SUS CONOCIMIENTOS TRANSMITIDOS.**

**SU APORTACION FUE MUY VALIOSA PARA MI DESARROLLO
PROFESIONAL.**

**A YOLA, MI GRATITUD POR SU DISPOSICION EN TODO
MOMENTO.**

DEDICATORIAS

A Dios :

**POR PERMITIRME LLEGAR
A ESTE MOMENTO TAN
ANHELADO DE MI VIDA.**

A MI MADRE:

**TE DEDICO MI TESIS CON TODO MI
AMOR, ADMIRACION Y UN PROFUNDO
RESPECTO, AGRADECIENDOTE EL
INMENSO APOYO EN AQUELLAS
NOCHES DE DESVELO, POR TU GRAN
PACIENCIA Y LA CONFIANZA QUE EN
MI DEPOSITASTE PARA QUE TUS
ESFUERZOS Y SACRIFICIOS NO FUERAN
EN VANO.**

**GRACIAS TE DOY PORQUE EL
LLEGAR A MI META NO ES OTRA COSA
QUE EL REFLEJO DE TODA TU
ENTREGA Y DEDICACION ORIENTADOS
HACIA MI BUENA EDUCACION; ES LA
MEJOR HERENCIA QUE ME PUDISTE
OTORGAR.**

**ME ESFORZARE POR SER MEJOR
CADA DIA, PUES JUNTAS PASAMOS POR
UNA ETAPA EN LA QUE COMPARTIMOS
NUESTROS SUEÑOS Y JUNTAS LO
HICIMOS REALIDAD.**

DIOS TE BENDIGA.

A MI ABUELITA:

**CON TODO MI CARIÑO Y AMOR, POR
LOS MOMENTOS MARAVILLOSOS
QUE VIVIMOS JUNTAS Y POR SU
GRAN APOYO EN LOS MOMENTOS
DIFICILES.**

A MIS HERMANOS:

**LOURDES, IRENE Y SILVESTRE
PORQUE CON SU PRESENCIA LE
HAN DADO MOMENTOS
MARAVILLOSOS A MI VIDA Y POR
TODO LO QUE SIGNIFICAN PARA
MI.**

LOS QUIERE ANA B.

**A LA FAMILIA VALDEZ, A MIS
AMIGOS, MAESTROS Y A TODOS
AQUELLOS QUE DURANTE MI
ESTANCIA EN LA UNIVERSIDAD
CREYERON EN MI PORQUE
JUNTOS LOGRAMOS ESTA
REALIDAD.**

**A QUIENES ME HAN BRINDADO
UNA AMISTAD
DESINTERESADA,
PROGRESISTA Y SIEMPRE
DISPUESTA.**

A MIS AMIGOS DE SIEMPRE, ...PORQUE AHORA SE QUE NO ESTOY SOLA.

RESUMEN

Las alteraciones parodontales están asociados a la cantidad de placa dentobacteriana (PDB) la cual esta formada por microorganismos que logran adherirse a los dientes, encías y otras superficies bucales conduciendo en ocasiones las alteraciones inflamatorias gingivales (gingivitis), en la que los microorganismos bucales siguen proliferando y desencadenan los mecanismos de defensa normales del huésped.

Generalmente este tipo de alteraciones cursa en forma asintomática, por lo cual el empleo de técnicas altamente sensibles y específicas como el inmuno ensayo ligado a enzimas (ELISA) resulta de gran ayuda para el diagnóstico oportuno.

En esta investigación se determino el título de anticuerpos de tipo IgA e IgG específicos para Rothia dentocariosa y Bacteroides fragilis en muestras de saliva basal de adultos de 20 a 60 años con inflamación parodontal empleando antígeno proteico obtenido de cultivos puros y conjugados comerciales anti-IgG y anti-IgA ligados a peroxidasa de rábano por el método de ELISA indirecto y su relación con el índice gingival periodontal de O'Leary et. al.

Encontrando que cuando el grado de inflamación clínica es bajo no hay correlación con el título de anticuerpos para la población estudiada.

ABREVIATURAS.

AgY	Antígeno Y
EIA	Ensayo inmunoenzimático
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas).
IgA	Inmunoglobulina A
IgAs	Inmunoglobulina A secretora
IgD	Inmunoglobulina D
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IP	Índice Periodontal
IPG	Índice Periodontal Gingival
IPD	Índice de Enfermedad Periodontal
mcg	microgramos
mcl	microlitros
PDB	Placa dentobacteriana
PMN	Polimorfonucleares
RIA	Ensayo inmunoradiactivo

INDICE

CONTENIDO	PAGINA
I. Introducción	2
MARCO TEORICO	4
Estructura normal y anormal de periodonto.	5
Microflora normal de boca.	9
Enfermedad parodontal.	11
Definición de enfermedad parodontal.	11
Clasificación de la enfermedad parodontal.	12
Etiología.	14
Agentes etiológicos.	16
Patogénia.	18
Epidemiología.	19
Diagnóstico.	22
Tratamiento.	23
Mecanismos de inmunidad.	24
Inmunoglobulinas.	24
Estructuras antigénicas en cavidad oral; IgA, IgG.	26
Método de ELISA.	28
Fundamento.	31
Técnicas generales.	32
II. Planteamiento del problema.	34
III. Fundamentación del tema.	35
IV. Hipótesis.	37
V. Objetivos.	38
VI. Diseño experimental.	39
Diagrama de flujo.	40
Métodos.	41
Recursos.	49
VII. Resultados.	53
VIII. Análisis de resultados.	74
IX. Conclusiones.	76
X. Anexos.	78
XI. Referencias.	84

INTRODUCCION.

La cavidad oral es rica en nutrientes y proporciona un ambiente ideal para el crecimiento de bacterias aerobias, facultativas y anaerobias; para que estos microorganismos puedan colonizar deben adherirse firmemente a la superficie o encontrar un habitat protector.

La colonización de los dientes da como resultado la formación de placa dentobacteriana (PDB) que es una capa de bacterias, nutrientes, ácidos y enzimas bacterianas.

El parodonto es el tejido de protección y apoyo del diente, comprende tejidos como: encía, hueso alveolar, ligamento periodontal y cemento radicular; este tejido se encuentra sujeto a cambios morfológicos y funcionales; los cambios patológicos caracterizados por inflamación y/o destrucción de las estructuras de soporte del diente se designan como enfermedad parodontal y se caracteriza por ser un proceso crónico, progresivo y generalmente asintomático.

Se inicia con la inflamación de los tejidos gingivales provocada por la acumulación de placa dental en la que siguen proliferando microorganismos bucales principalmente anaerobios como el género Bacteroides que son bastones anaerobios obligados, no esporulados, gram negativos; anaerobios facultativos como Actinomyces y aerobios como Rothia que son cocos difteroides o filamentos, aerobios, gram positivos que desencadenan los mecanismos de defensa normal del huésped, específicos e inespecíficos.

Los mecanismos de defensa inespecíficos no requieren de una exposición previa del agente nocivo; como la fagocitosis, integridad de mucosa oral, constitución del diente, saliva y fluido gingival.

Los mecanismos específicos requieren de exposición a un microorganismo particular y la respuesta se limita a ese microorganismo, éste mecanismo está a cargo de linfocitos T y linfocitos B sensibilizados que maduran a células plasmáticas productoras de anticuerpos (Inmunoglobulinas IgM, IgE, IgA, IgD, IgG).

Dentro de la cavidad oral existen dos sistemas complejos interrelacionados entre sí. Un sistema que destruye antígenos y el otro el sistema IgA secretor cuya función es evitar el ingreso de un antígeno a través de las mucosas.

En la saliva se encuentran predominantemente IgA secretora (IgAs), IgG y en menor grado IgM, la fuente principal de IgG e IgM es el líquido gingival. La cuantificación e identificación de Inmunoglobulinas puede realizarse por métodos inmunoenzimáticos como el inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) consistente en un proceso inmunológico en el que la reacción antígeno-anticuerpo es seguida por una cuantificación enzimática.

La Integración de técnicas Inmunológicas en el campo odontológico es importante para la detección temprana de alteraciones bucales.

En este trabajo se presenta la relación entre el Índice Periodontal Gingival y el nivel de anticuerpos IgA e IgG por la técnica de ELISA para *Rothia dentocariosa* y *Bacteroides fragilis*, microorganismos relacionados con la enfermedad periodontal en muestras de una población de 20 a 60 años con o sin enfermedad periodontal.

***MARCO
TEORICO***

ESTRUCTURA NORMAL Y ANORMAL DEL PERIODONTO.

El periodonto (peri:alrededor; odontos:diente) es el tejido de protección y apoyo del diente; se compone de encía, ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar. El cemento se considera como una parte del periodonto porque junto al hueso, sirve de apoyo a las fibras del ligamento periodontal (Fig 1 y Fig 2). El periodonto esta sujeto a variaciones morfológicas y funcionales así como a cambios con la edad ^{1,2}.

Clinicamente la encía normal se distingue por su color rosa coral, el espesor y el grado de queratinización del epitelio; es firme y no sangra al sondearla. La mucosa alveolar es roja, lisa, brillante y granulada. La encía insertada es punteada, la encía marginal no lo es. No presenta inflamación ni clínica ni macroscópicamente ya que esta exenta de acumulación "significativa" de células inflamatorias y rara vez se hace evidente en surco gingival a nivel microscópico en estos tejidos ³.

Las alteraciones inflamatorias de la encía se desarrollan en unos pocos días de crecimiento bacteriano sobre la superficie dentaria. clinicamente la inflamación se caracteriza por cambios de color y de textura de los tejidos marginales. Al cabo de 10 a 20 días de acumulación de placa, se establece una franca gingivitis en la mayoría de los casos, lo cual se caracteriza por el enrojecimiento de la encía, la inflamación y el sangrado de los tejidos blandos en forma espontánea o cuando se les sondea suavemente debido al mayor aporte sanguíneo del área, se pierde el contorno normal de la encía y la alteración del tamaño es una característica común ^{4,5}.

La magnitud del infiltrado en el tejido conectivo aumenta para ocupar aproximadamente 10-15% del volumen del tejido conectivo de la encía libre. Microscópicamente en el infiltrado se observan células inflamatorias, incluyendo plasmocitos, linfocitos, blastocitos, macrófagos y neutrófilos. la encía insertada pierde su punteado y en los estados más avanzados existe ulceración.

**RELACIONES ANATÓMICAS E HISTOLÓGICAS DE LA ENCÍA
Y EL PERIODONTO MARGINAL**

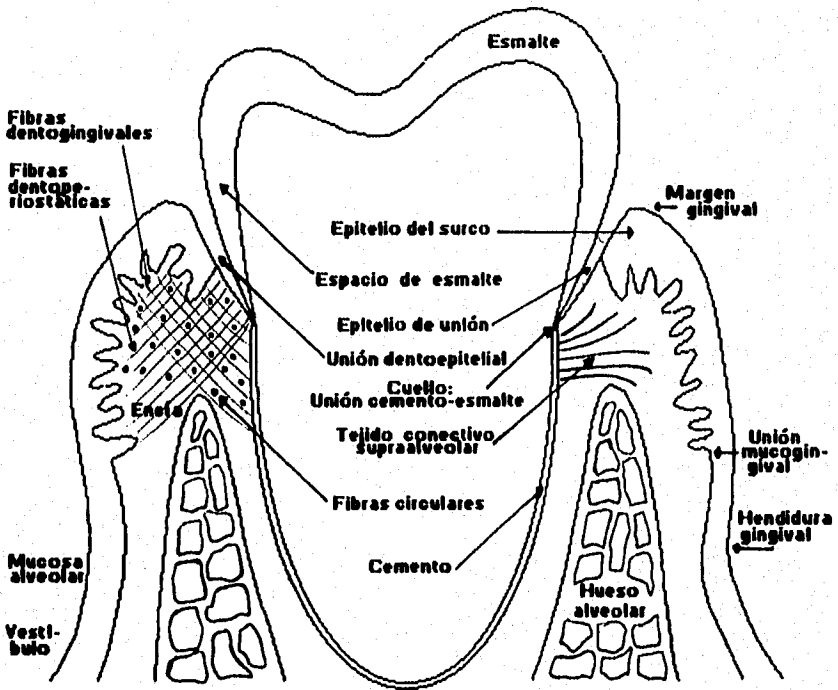


FIGURA 1.
FUENTE: 6

RELACIONES ANATÓMICAS DE LA ENCÍA NORMAL.

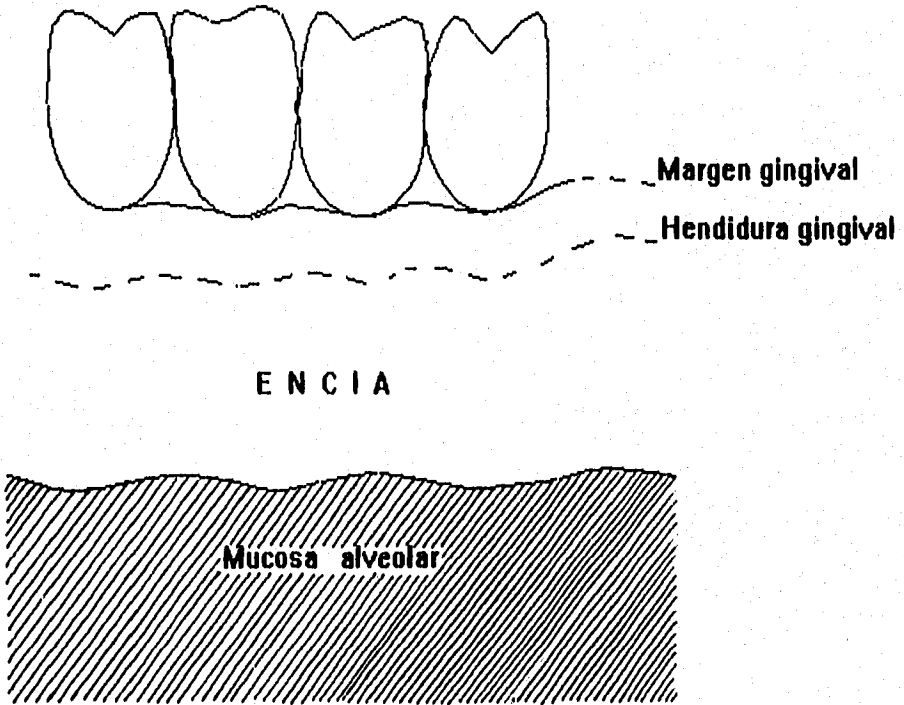


FIGURA 2.

FUENTE: ⁶

MICROFLORA NORMAL DE BOCA.

La cavidad bucal con su flora microbiana constituye un sistema ecológico complejo de crecimiento abierto. Esto significa que nutrientes y microorganismos son repetidamente introducidos y retirados del sistema. Las áreas con diferentes ambientes fisicoquímicos y nutricionales como la mucosa del carrillo, la lengua, las hendiduras gingivales (surcos) y la superficie de los dientes favorecen la adherencia y el crecimiento de tipos selectos de microorganismos^{7, 8}.

Tanto el flujo salival como el flujo del líquido gingival, la masticación, los procedimientos de higiene bucal y la descamación de las células epiteliales ayudan a remover las bacterias de las diferentes superficies bucales.

"Hoy se reconocen más de 200 grupos bacterianos y especies de bacterias morfológica y bioquímicamente distintos como habitantes normales de la cavidad bucal humana" (Moore, 1987). Aún restan por clasificar muchas cepas microbianas aisladas de la cavidad bucal humana^{9, 10}.

Si una persona con encía sana se abstiene de las medidas de higiene bucal, se acumulan bacterias sobre los dientes. Después de las 8 horas de abstinencia hay 10^3 a 10^4 bacterias por mm^3 de superficie dentaria.

Las primeras bacterias que aparecen son capaces de sobrevivir ante las diversas condiciones presentes en el ambiente y proporcionan los sustratos y micro ambientes necesarios para la colonización de microorganismos secundarios¹¹⁻¹³.

La mucosa del carrillo facilita el establecimiento de los tipos predominantemente facultativos sobre todo el *Streptococcus viridans* y *Actinomyces viscosus*. Las hendiduras gingivales, en donde hay flujo de exudado líquido, crean un ambiente favorable para las comunidades de microbios anaerobios y anaerobios facultativos gram negativos como *Haemophilus*, *Eikenella* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Killian y col., 1979), en tanto que las superficies del diente tienen un ambiente que permite la instalación de microfloras anaerobias, anaerobias facultativas y aerobias^{14, 15}.

El desplazamiento relativo en la composición microbiana de la placa de una flora gram positiva a otra gram negativa corresponde a la iniciación de una inflamación clínicamente observable. En un día la cantidad de bacterias se multiplica de 10^2 a 10^3 veces.

La microflora de la cavidad bucal consiste de bacterias, levaduras, algunos hongos, micoplasmas, protozoarios y virus.

ENFERMEDAD PERIODONTAL.

El término periodonto fue aceptado como el término para designar los tejidos de revestimiento y periodontitis como el nombre general para las enfermedades inflamatorias que afectan estos tejidos.

La enfermedad parodontal se define como una variedad de estados clínicos caracterizados por la inflamación y/o destrucción de las estructuras de soporte de los dientes, es decir, el periodonto.

La gingivitis y la periodontitis que son las formas más comunes de enfermedades parodontales están íntimamente relacionadas con la acumulación de placa en las zonas del surco gingival¹⁶.

La placa dentobacteriana (PDB), la cual está formada por microorganismos que se adhieren sobre la superficie de los dientes, la encía y otras superficies bucales formando una masa blanda constituida por glucoproteínas cuya fuente es la saliva y polisacáridos extracelulares sintetizados por las diferentes bacterias de la placa, ha demostrado ser uno de los factores etiológicos principales de esta patología¹⁷.

Las alteraciones patológicas de la encía en su mayor parte son cambios de tipo inflamatorio, se ha asegurado que las características de la lesión inicial solamente reflejan un aumento en la actividad de los mecanismos de defensa normales del huésped que operan dentro de los tejidos gingivales^{18, 19}.

La lesión inflamatoria inicial puede conducir a la formación de una bolsa periodontal, la cual se define como una "profundización patológica del surco gingival" en la cual siguen proliferando los microorganismos bucales.

CLASIFICACIÓN.

Clasificación clínica de la enfermedad parodontal.

La enfermedad parodontal comprende como mínimo 4 entidades clínicas distintas²⁰:

- 1.- **Gingivitis marginal** que suele ser una hiperemia indolora del borde gingival sin supuración ni destrucción de la superficie.
- 2.- **Gingivitis ulcerosa**, que es un proceso inflamatorio más agudo que la gingivitis marginal, con necrosis de zonas pequeñas o grandes de la superficie gingival expuesta.
- 3.- **Periodontitis**, que es una destrucción crónica que penetra en el surco gingival y se aproxima a las raíces dentarias, formando bolsas y acompañada de fenómenos inflamatorios y de supuración de grado variable, desde oculta a profusa (Glickman utiliza el término *Enfermedad periodontal destructiva crónica*).
- 4.- **Traumatismo parodontal**, que lesiona el ligamento periodontal. Cuando es intenso puede producir absorción de la raíz, pero no determina la formación de bolsas ni alteraciones superficiales de ningún tipo.

I. Enfermedades que afectan a la superficie de la encía.

- 1.- **Inflamación sin destrucción de la superficie.**
 - a) **Gingivitis marginal.**
 - b) **Gingivitis difusa generalizada.**
 - c) **Hiperplasia gingival.**

2.- Inflamación con destrucción de la superficie.

a) Gingivitis ulcerosa necrótica aguda (GUNA).

b) Gingivoestomatitis herpética.

c) Gingivitis descamativa.

d) Úlceras orales.

II. Enfermedades que afectan a las estructuras profundas.

1.- Enfermedad parodontal destructiva crónica o periodontitis.

2.- Absceso periodontal.

3.- Traumatismo periodontal.

a) Traumatismo primario.

b) Traumatismo secundario.

ETIOLOGÍA.

Las enfermedades parodontales son multifactoriales y en términos generales no existe un sólo factor etiológico que sea responsable de las alteraciones patológicas. Aún en casos de que puedan describirse entidades clínicas definidas, pueden existir causas múltiples, dando como resultado una imagen compleja. Además lo que parecen ser diversas entidades patológicas múltiples pueden ser en realidad diferentes etapas de la misma enfermedad modificada en su expresión por el tiempo y por la reacción del individuo^{21, 22}.

Debido a esta complejidad se han clasificado una serie de factores como locales y sistémicos. Los factores locales son aquellos que actúan por vía externa directamente sobre las estructuras periodontales por ejemplo: factores irritativos, que a través de un mecanismo bacteriano provocan la reacción inflamatoria del tejido gingival o factores traumatizantes, que ejercen su acción sobre la corona del diente, transmitiéndose por este a las estructuras de soporte. No se ha aclarado la importancia de los factores traumatizantes en el proceso gingival. Los factores sistémicos son aquellos factores internos orgánicos, que responden a su vez a diferentes causas, relacionadas o no con enfermedades generales y que condicionan la respuesta tisular ante la agresión de los factores locales.

De entre los factores locales se cree teóricamente que los productos bacterianos pueden ocasionar el desarrollo y progreso de la alteración parodontal de las siguientes formas ²³: destruyendo directamente los tejidos parodontales mediante enzimas de origen bacteriano; activando el sistema lítico endógeno, generando factores quimiotácticos; alterando localmente la permeabilidad del tejido; formando complejos antígeno-anticuerpo; sintetizando linfocitos; inhibiendo el proceso de reparación del huésped, bloqueando las respuestas antimicrobianas de leucocitos polimorfonucleares (PMN) ^{24,25}.

AGENTES ETIOLÓGICOS.

Quando la gingivitis queda establecida, los puntos infectados revelan un aumento en la cantidad de bacterias anaerobias, las cuales continúan el proceso inflamatorio que puede avanzar a una periodontitis destructiva exacerbando la respuesta inmune²⁶⁻²⁹.

Los microorganismos orales involucrados con esta alteración se mencionan a continuación por géneros:

Actinomices

Bacteroides

Bifidobacterium

Capnocytophaga

Eubacterium

Fusobacterium

Leptotrichia

Selenomonas

Staphylococcus

Streptococcus

Veillonella

De los géneros anteriores sobresalen los siguientes y se mencionan las especies de interés clínico:

BACTEROIDES

B. gingivalis

B. intermedius

B. gracilis

B. melaninogenicus

B. denticola

B. loeschei

B. corporis

B. buccae

Bacteroides

PATOGENIA.

Inmunológicamente la patogenia presenta tres estados: inicial, temprano y establecido. La lesión inicial corresponde a una inflamación aguda que puede ser inducida experimentalmente al aplicarse extractos de placa dentobacteriana sobre la encía normal. La lesión temprana se caracteriza por infiltrado celular linfoide con predominio de linfocitos T característicos de las lesiones que se ven en los sitios de reacción de hipersensibilidad mediada por células. Las lesiones establecidas pueden permanecer estables por periodos de tiempo indefinidos y pueden progresar³⁰⁻³².

Las bacterias que logran adherirse más firmemente sobre la superficie del diente provocan la aparición de los primeros signos de la respuesta inmune, entre ellos la migración de leucocitos PMN hacia el surco gingival poniendo en marcha la fagocitosis. En tanto que los macrófagos tienen entre otras funciones la de regular mecanismos linfocitarios y la presentación antigénica de la cual depende el posterior desarrollo de una respuesta humoral (células B) mediada por anticuerpos (IgA, IgG, IgM, IgE, IgD) o una respuesta celular (células T) mediada por células³³⁻³⁷.

EPIDEMIOLOGÍA.

La epidemiología trata de los factores y condiciones que determinan la aparición y distribución de enfermedades, salud, defectos, incapacidad y muerte entre los grupos de individuos aunque también tiene que ver con la determinación de los factores que favorecen el origen y difusión de un proceso patológico o un estado fisiológico en una comunidad^{38, 39}.

El proceso de las alteraciones parodontales es de tipo crónico y progresivo, teniendo como inicio la inflamación de los tejidos gingivales, llevando por este motivo el nombre de gingivitis.

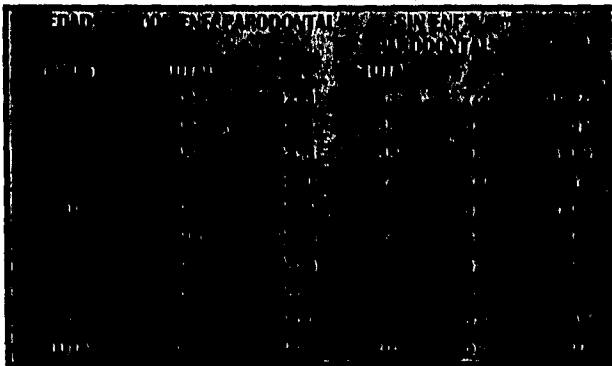
La gingivitis es una enfermedad que generalmente no produce sintomatología, por lo que es difícil que el paciente la detecte pudiendo evolucionar hasta una periodontitis la cual consiste en una inflamación gingival con destrucción del tejido conectivo⁴⁰⁻⁴³.

Existen varios índices para medir el estado parodontal en el paciente.

El Índice Periodontal Gingival (IPG) es una modificación del Índice de Enfermedad Periodontal (IPD) de Ramfjord, cuyo propósito es examinar individuos y determinar quien necesita ser sometido a tratamiento periodontal. El IPG valora tres componentes de la enfermedad parodontal: estado gingival, estado periodontal (profundidad del surco) y globalmente materia alba, cálculos y restauraciones desbordantes. Este índice se desarrolla con el objetivo específico de detectar la enfermedad parodontal tempranamente para que el tratamiento pueda instituirse rápidamente⁴⁴.

Se han realizado en todo el mundo numerosos estudios epidemiológicos , sobre todo en niños y jóvenes, con el fin de hallar la propagación y distribución de estas afecciones cuya gravedad muestra diferencias de un estudio a otro lo cual se atribuye a las deficiencias en el control de placa así como a los factores geográficos, sociales y etnológicos.

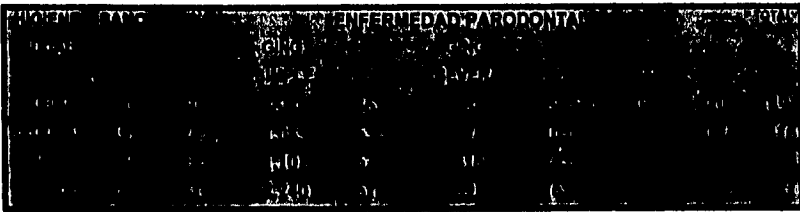
A continuación se muestra un cuadro de la epidemiología nacional de una población escolar con y sin enfermedad periodontal y el promedio general del IP por edad en el D.F.⁴⁰



Se observa un comportamiento irregular de 6 a 9 años con un aumento del IP de 0.97 a 1.14 a los 10 años disminuye a 1.09, y a los 11 años sigue bajando y llega a 1.06, a los 12 años aumenta a 1.08, a los 13 años baja nuevamente hasta 1.05 y a los 14 años aumenta a 1.14.

Se encontró un promedio general en el IP de 1.07 en niños de edad escolar, lo que corresponde a una gingivitis simple .

El siguiente cuadro muestra la relación de higiene bucal y enfermedad periodontal en la población escolar del D.F.⁴⁰



HIGIENE BUCA	ENFERMEDAD PERIODONTA

Se observa un aumento de alteración periodontal a medida que la higiene bucal disminuye. Cuando la higiene bucal es mala la inflamación gingival puede avanzar hasta periodontitis, aunque el porcentaje de alteración es mayor para gingivitis simple cuando la higiene bucal es regular.

DIAGNOSTICO.

El diagnóstico periodontal se establece mediante el examen clínico minucioso y sistemático de los tejidos periodontales y de la cavidad bucal en general; donde la observación, sondeo, palpación, percusión, determinación de la movilidad dentaria y pruebas pulpares son esenciales para determinar la extensión de la enfermedad, planificar el tratamiento y para determinar el pronóstico^{45, 46}.

Realmente no existe una correlación exacta entre la gravedad de las lesiones gingivales y la periodontitis. Puede ocurrir una gingivitis moderada con una periodontitis grave y viceversa.

La periodontitis es considerada como la extensión directa de la gingivitis que avanza y ha sido descuidada, en algunos casos resulta difícil distinguir la gingivitis avanzada de la periodontitis incipiente⁴⁷.

La gingivitis ulceronecrosante aguda es un proceso inflamatorio más agudo que la gingivitis marginal. Se presenta con necrosis de áreas pequeñas o grandes de la superficie gingival expuesta. El diagnóstico se establece por inspección; el aspecto de las papilas necróticas y el olor necrótico característico son patognómicos⁴⁸.

TRATAMIENTO.

El tratamiento eficaz depende de una buena valoración clínica. Esta valoración se basa en el conocimiento de como los tejidos del individuo han respondido ante los factores etiológicos de la enfermedad.

La higiene oral es una fase fundamental del tratamiento periodontal, así los cuidados dentales como es el cepillado correcto, constante y eficaz; el uso de hilo dental, estimuladores interdentarios y enjuagues bucales constituyen el modo más efectivo de prevenir problemas gingivales y mantener la permanencia de la dentición en un estado de salud a través de toda la vida del individuo. Este es el objetivo principal de toda la terapéutica periodontal¹⁶.

Para el paciente que presenta lesiones existen alternativas de tratamiento como son limpieza, restauración y prótesis de las lesiones cariosas relacionadas con la enfermedad, tratamiento endodóncico, cirugía periodontal o extracción dentaria⁵⁰⁻⁵¹.

MECANISMOS DE INMUNIDAD.

*El sistema inmunitario dispone de numerosos mecanismos para destruir los agentes patógenos, cada uno de ellos idóneo para un determinado tipo de germen patógeno en un momento determinado de su ciclo vital. Estos mecanismos defensivos reciben a menudo el nombre de sistemas efectores*⁵³.

En uno de los sistemas efectores, los anticuerpos pueden combatir ciertos agentes extraños al organismo mediante su unión con estos.

Con mayor frecuencia, la importancia del anticuerpo se basa en activar el complemento o bien en actuar como una opsonina para promover la fagocitosis.

INMUNOGLOBULINAS.

*Los anticuerpos son Inmunoglobulinas que reaccionan de manera específica con el antígeno que estimula su producción. Constituyen hasta el 20 % de las proteínas plasmáticas*⁵³.

Las inmunoglobulinas son glucoproteínas constituidas de cadenas polipeptídicas ligeras (L) (P.M.= 25,000 g/mol) y pesadas (H) (P.M.= 50,000 a 70,000 g/mol).

La molécula más sencilla de inmunoglobulina consta de cuatro cadenas polipeptídicas, dos H y dos L. Las cuatro cadenas se unen por puentes disulfuro covalentes.

Las cadenas L y H poseen dos regiones: variable y constante. Las regiones variables originan la fijación del antígeno, en tanto que las constantes se ocupan de varias funciones biológicas, por ejemplo, activación del complemento y fijación a receptores de superficie.

La unión antígeno - anticuerpo se hace por medio de fuerzas electrostáticas y de Vander Waals y por enlaces de hidrógeno e hidrófobos.

Existen cinco clases de inmunoglobulinas, entre ellas la IgA que predomina en secreciones como calostro, saliva y lágrimas y en vías respiratorias, intestinales y genitales. Cada molécula IgA secretora (P.M. = 400,000) consiste de dos unidades H₂L₂ más una molécula de cadena J (unión) (unida covalentemente a la porción Fc de la inmunoglobulina) y de componente secretorio. El componente secretorio es un polipéptido sintetizado por las células epiteliales, que ayuda a la IgA a llegar hasta la superficie mucosa^{54, 55}.

La molécula de IgG esta formada por dos cadenas L y dos cadenas H enlazadas por puentes disulfuro. Debido a que tiene dos sitios de fijación de antígeno idénticos, Se dice que es divalente. Hay cuatro subclases: IgG1 a IgG4, de acuerdo a las diferencias antigénicas en la cadena H y al número y ubicación de los puentes disulfuro. El anticuerpo IgG1 constituye la mayor parte (65%) de la concentración total de IgG, la IgG2 se dirige contra antígenos polisacáridos y es una defensa importante del huésped contra bacterias encapsuladas^{56, 57}.

La IgG es el anticuerpo predominante en la respuesta secundaria y representa una defensa importante contra bacterias y virus. La IgG es el único anticuerpo que cruza la placenta; sólo su porción Fc se une a receptores en la superficie de las células placentarias. Por tanto es la Inmunoglobulina más abundante en el recién nacido.

ESTRUCTURAS ANTIGÉNICAS EN CAVIDAD ORAL.

INMUNOGLOBULINA A.

Esta inmunoglobulina es monomérica con un grado de sedimentación de 7S, mientras que en secreciones se encuentra en forma di y trimérica con 11 - 13S grados de sedimentación.

La IgA sérica no puede activar el sistema del complemento, su estructura básica se asemeja a la de IgG.

Las unidades poliméricas de IgA secretora consisten de unidades monoméricas unidas por una cadena polipeptídica corta llamada cadena J. La molécula polimérica de IgA es sintetizada por células plasmáticas en la lámina propia de membranas mucosas. En este paso hacia el interior del lumen de cualquier órgano que la este secretando adquiere una "pieza secretoria" de las células epiteliales (fig. 3) la cual se cree que aumenta la resistencia de la IgA a la digestión proteolítica después de que esta ha sido secretada⁵⁸.

La IgA secretora puede activar el sistema del complemento en presencia de lisosimas para matar ciertos microorganismos coliformes.

MODELO PARA LA INMUNOGLOBULINA IgAs.

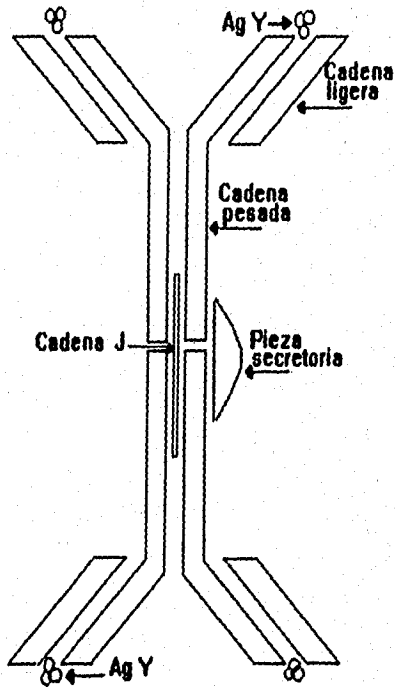


FIGURA 3.

FUENTE: ⁵⁸

INMUNOGLOBULINA IgG.

Esta es la inmunoglobulina más abundante en los fluidos corporales internos y es producida principalmente durante la respuesta inmune secundaria. Las cadenas gamma contienen tres regiones constantes (C gamma1, C gamma2, C gamma3) las cuales están involucradas en las diferentes funciones efectoras de la molécula. Las tres subclases más abundantes (IgG1, IgG2 e IgG3) activan la vía clásica del complemento la C gamma2 principalmente. Únicamente las subclases IgG1 e IgG3 interactúan con el receptor Fc sobre células fagocíticas y estas requieren una contribución de ambas principalmente C gamma2 y C gamma3.

MÉTODO DE ELISA.

Los inmunoensayos son determinaciones inmunológicas de sustancias biológicamente activas y clínicamente interesantes cuyas concentraciones son tan pequeñas que requieren analizarse por procedimientos más sensibles y específicos.

Los enzimoimmunoensayos e inmunoanálisis son de dos tipos principales; homogéneos y heterogéneos. En los análisis homogéneos la enzima se conjuga con el hapteno y no requiere separación de convalido libre; este análisis se halla restringido a sustancias de bajo peso molecular. En los inmunoanálisis heterogéneos la separación del reactivo convalido marcado con enzima del reactivo marcado libre es una etapa esencial.

Estos ensayos conocidos como análisis por enzimas fijadas a Inmunoabsorbentes (ELISA) dependen del hecho de que los anticuerpos o el antígeno se pueden ligar a una enzima, reteniendo el complejo tanto la actividad inmunológica como la enzimática^{59, 60}.

Las distintas técnicas de ELISA se pueden clasificar en dos grandes grupos: técnicas no competitivas y competitivas. Cualquiera de estos tipos puede usarse para medir niveles de antígeno y de anticuerpo específico en una muestra.

A continuación se mencionan algunas aplicaciones para ELISA⁵⁹. Este método es utilizable para el análisis de cualquier anticuerpo, si el antígeno adecuado se puede inmovilizar convenientemente en una fase sólida.

El ELISA se ha empleado especialmente en el campo de las enfermedades infecciosas, aunque el desarrollo de enzimoanálisis de alta sensibilidad para virus de hepatitis B y rotavirus ha satisfecho una necesidad de métodos exactos no isotópicos.

La respuesta humoral a las vacunas de tétanos y difteria, ha sido también evaluada por el método de ELISA y se han descrito enzimoanálisis para malaria, tripanosomiasis y esquistosomiasis, por nombrar sólo algunas de las principales enfermedades tropicales⁶¹.

Se han desarrollado sistemas de ELISA para analizar anticuerpos contra ácido desoxirribonucleico, histona y tiroglobulina, y para detectar complejos inmunes y factor reumatoide.

Es especialmente en el área endocrinológica donde se han promovido los enzimoanálisis para antígenos proteicos hormonales tales como Gonadotropina coriónica humana, hormona luteinizante, hormona foliculo estimulante, lactógeno placentario humano e insulina, y para esteroides, como estrógenos, progesterona, testosterona y cortisol. Otro campo importante de aplicación del inmunoanálisis es la detección de proteínas oncofetales⁶².

Mientras que los métodos enzimáticos de comprobación permiten alcanzar un límite inferior de comprobación de unos 5 a 10 microgramos / ml en muestras de suero, los procedimientos inmunológicos de prueba permiten una ulterior reducción de la sensibilidad en 2-3 números elevados a la décima potencia. Ello permite registrar incluso sustancias en la zona de los picogramos (10^{-10}). Mediante la combinación de la reacción inmunológica con un indicador altamente sensible (trazadores radiactivos o enzimas), el débil efecto inmunológico se ve reforzado por una amplificación electrónica (proceso de descomposición radiactivo en el RIA) o por un aprovechamiento del efecto multiplicador de un marcador enzimático (EIA), de forma que se consigue una elevada sensibilidad en los inmunoensayos.

FUNDAMENTO.

Estos ensayos (Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima, ELISA) dependen del hecho de que los anticuerpos o el antígeno se pueden ligar a una enzima, reteniendo el complejo tanto la actividad Inmunológica como la enzimática⁶⁹.

En estos ensayos, el antígeno o anticuerpo se adosa usualmente a un soporte de fase sólida para facilitar la separación de los reactivos libres y combinados. Se ha hallado que antígenos y anticuerpos se pueden unir covalentemente al material particulado, tal como celulosa o poliacrilamida, y que también se puede obtener una adsorción pasiva satisfactoria a tubos, perlas, discos o microplacas de nylon, poliestireno, polivinilo o polipropileno (fig. 4).

A la reacción Inmunológica debe seguir una reacción Indicadora para que la actividad enzimática, que esta fijada al complejo antígeno-anticuerpo, pueda ser determinada fotométricamente.

TÉCNICAS GENERALES.

I. Análisis de anticuerpos⁵⁹⁻⁶³.

i. Indirecto (Fig. 4).

ii. Competitivo.

iii. Anti - IgM.

II. Análisis de antígeno⁵⁹⁻⁶³.

i. Competitivo.

ii. Principio del "sandwich".

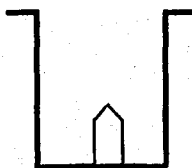
iii. Inhibición.

**METODO INDIRECTO DE ELISA EN MICROPLACAS PARA
LA DETECCION Y DETERMINACION DE ANTICUERPOS**

METODO INDIRECTO

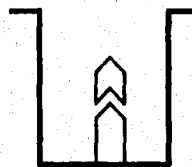
1.- Antígeno adsorbido a la placa

LAVAR



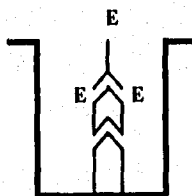
2.- Añadir muestra: anticuerpo específico
se une a la placa.

LAVAR

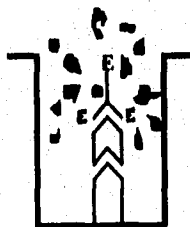


3.- Añadir antiglobulina marcada con
enzima que se une al anticuerpo.

LAVAR



4.- Añadir sustrato.



CANTIDAD HIDROLIZADA = CANTIDAD DE ANTICUERPO PRESENTE

FIGURA 4.

FUENTE: 59

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La enfermedad periodontal se inicia como un proceso de lesiones inflamatorias gingivales provocadas por la acumulación de placa dental la cual esta formada por microorganismos que logran adherirse sobre los dientes, la encía y otras superficies bucales. Estas lesiones pueden conducir a la formación de una bolsa periodontal la cual se define como una "profundización patológica del surco gingival" en la que siguen proliferando los microorganismos bucales que desencadenan los mecanismos de defensa normales del huésped^{17, 45}.

El sistema de defensa inespecífico inicia su actividad de manera muy eficaz, esta integrado básicamente por granulocitos polimorfonucleares y macrófagos, así como por el sistema del complemento. El sistema específico reconoce las estructuras extrañas al organismo diferenciándolas de las propias y eliminándolas, este sistema esta integrado por linfocitos B e inmunoglobulinas.

Debido a que la alteración periodontal es una enfermedad que generalmente no produce sintomatología⁴⁰; el paciente puede desarrollarla de manera desapercibida por lo cual es necesario implementar técnicas que colaboren en su diagnóstico. La aplicación de inmunoensayos podría representar un gran avance en la detección y tratamiento temprano de este tipo de afecciones.

En la presente investigación se determinará el título de anticuerpos de tipo IgAs e IgG por la técnica de ELISA en personas adultas con cualquier grado de alteración periodontal considerando que esta patología aumenta la respuesta inmune e incrementa el título de anticuerpos de tipo IgA e IgG en saliva.

FUNDAMENTACION.

La proporción de población afectada por alteraciones periodontales esta asociada relativamente a la edad específica de la población y directamente a la cantidad de placa dentobacteriana (PDB).

El proceso de estas afecciones es de tipo crónico y progresivo, iniciándose con la inflamación de los tejidos gingivales, las lesiones son indoloras y generalmente no producen sintomatología, en muchas ocasiones es difícil que el paciente la detecte y de manera desapercibida puede desarrollarse alteración periodontal con destrucción del tejido conectivo⁴⁰.

Es apropiado considerar a las alteraciones periodontales como un grupo de entidades inflamatorias crónicas de los tejidos que rodean al diente con formación de una bolsa periodontal y que lleva a la pérdida del hueso alveolar.

"Siendo la enfermedad periodontal una de las tres más prevalentes en el mundo"⁶⁴, actualmente una de las principales preocupaciones de la odontología esta dirigida a la prevención de alteraciones periodontales, por lo cual se han realizado diversos estudios de la periodoncia dándole diversos enfoques.

Uno de estos aspectos es el inmunológico. Las bacterias que forman la placa dentobacteriana pueden trastornar la relación simbiótica huésped-parasito despertando la respuesta inmune.

La respuesta inmune no específica o inmunidad celular puede considerarse como una serie de procesos iniciados específicamente por los linfocitos T y se caracteriza por una reacción inflamatoria rica en macrófagos altamente activados.

La respuesta inmune se caracteriza por tener especificidad, heterogeneidad y memoria; esta mediada por inmunoglobulinas o anticuerpos sintetizados por la célula plasmática proveniente de los llamados linfocitos B.

Los anticuerpos son más numerosos conforme aumenta la severidad de la alteración periodontal y la profundidad patológica del surco gingival que es la fuente principal de IgG e IgM. La inmunoglobulina de tipo IgA es la más abundante en secreciones salivales.

La presente investigación pretende correlacionar el título de anticuerpos salivales del tipo IgA e IgG específicos, evaluados por la técnica de ELISA en saliva de adultos jóvenes con el índice gingival periodontal. Así como tratar de establecer un trabajo multidisciplinario entre el Químico Farmacéutico Biólogo y el odontólogo a fin de iniciar un tratamiento temprano y evitar daños irreversibles en tejidos periodontales.

HIPÓTESIS.

Si Rothia dentocariosa y Bacteroides fragilis inducen una respuesta inflamatoria en periodonto, los títulos de anticuerpos de tipo IgAs e IgG específicos se encontraran elevados.

OBJETIVO GENERAL.

Correlación del título de anticuerpos de tipo IgA e IgG por la técnica de ELISA en saliva de adultos de 20 a 60 años divididos en grupos de 20 a 30, 31 a 40, 41 a 50 y 51 a 60 años con o sin inflamación periodontal y el índice gingival periodontal de O'Leary.

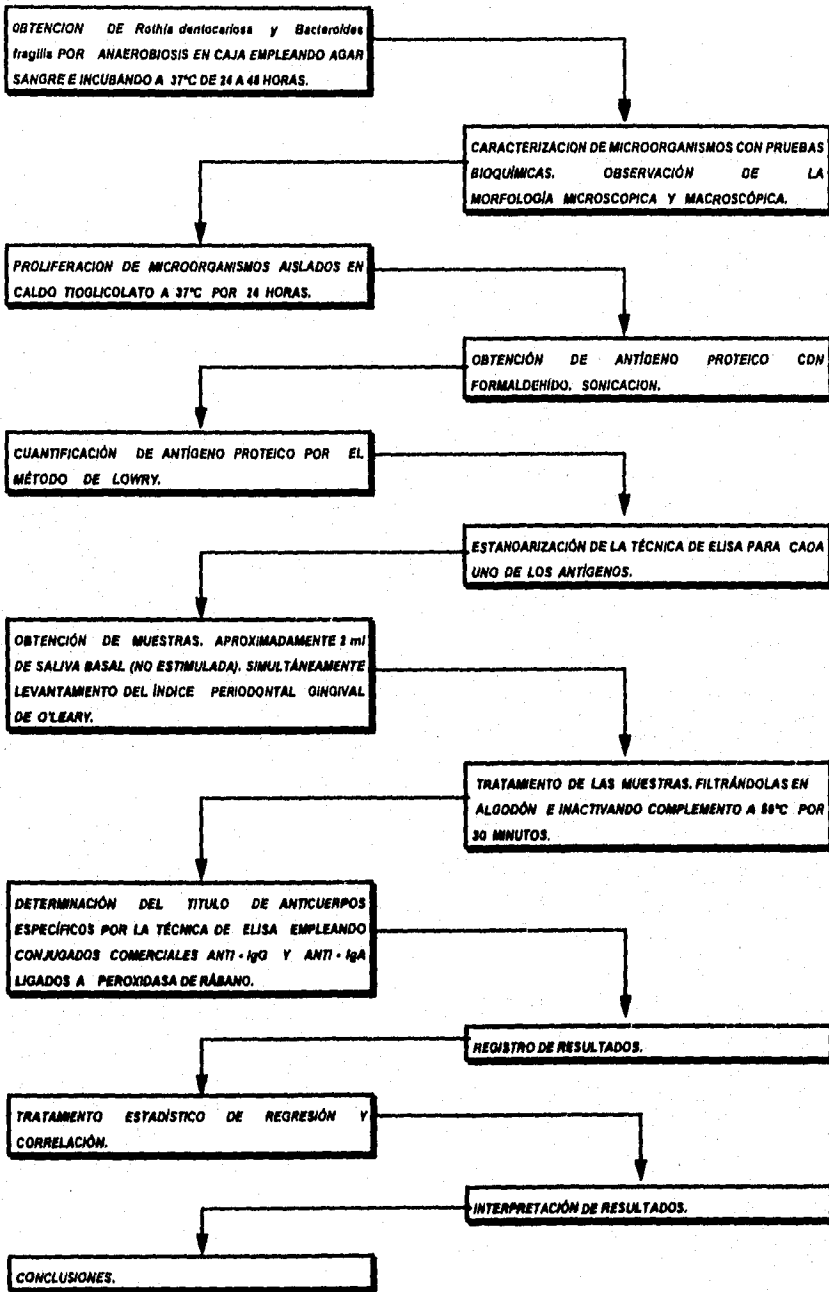
OBJETIVOS PARTICULARES.

- * Obtención de antígeno proteico a partir de cultivos puros de Rothia dentocariosa y Bacteroides fragilis.**
- * Medir el índice periodontal gingival considerando los códigos y criterios de O'Leary.**
- * Estandarización de la técnica de ELISA para Rothia dentocariosa y Bacteroides fragilis.**
- * Determinación del título de anticuerpos de tipo IgA e IgG por la técnica de ELISA en saliva descomplementada.**
- * Determinar la relación entre el nivel de anticuerpos de tipo IgAs e IgG y el grado de inflamación periodontal.**

DISEÑO EXPERIMENTAL.

- 1.- **Obtención de las cepas puras de *Rothia dentocariosa* y *Bacteroides fragilis***
- 2.- **Caracterización de las cepas puras a probar. Pruebas bioquímicas.**
- 3.- **Obtención del antígeno proteico a partir de cultivos puros caracterizados.**
- 4.- **Cuantificación del antígeno proteico por el método de Lowry.**
- 5.- **Obtención de la muestra.**
- 6.- **Levantamiento del Índice Gingival Periodontal de O'Leary. Registro del Índice.**
- 7.- **Tratamiento de las muestras de saliva (filtrada e inactivando complemento).**
- 8.- **Estandarización de la técnica de ELISA para *Rothia dentocariosa* y *Bacteroides fragilis* empleando una muestra de saliva con títulos altos de anticuerpos específicos.**
- 9.- **Determinar en saliva tratada el título de anticuerpos de tipo IgA e IgG por el método de ELISA para *Rothia dentocariosa* y *Bacteroides fragilis*.**
- 10.- **Registro de resultados.**
- 11.- **Tratamiento estadístico de los datos.**
- 12.- **Análisis de resultados.**
- 13.- **Conclusiones.**

DIAGRAMA DE FLUJO.



MÉTODOS.

1.- Obtención de las cepas puras de Rothia dentocariosa y Bacteroides fragilis. Aislamiento.

Del tubo con caldo tioglicolato que contiene el cultivo original se siembra en caja con agar sangre por estria cruzada para aislar, incubando en aerobiosis y anaerobiosis (para la anaerobiosis se utiliza hidróxido de sodio al 30% y pirogalol al 50%) a 37°C de 24 a 48 horas. Observar morfología colonial de las diferentes colonias y hacer frotis utilizando tinción de Gram; observar morfología microscópica.

Posteriormente sembrar en caldo tioglicolato e incubar a 37°C de 24 a 48 horas. Observar crecimiento en el tubo.

Se repite el procedimiento hasta obtener cepas aisladas, realizar frotis y tinción de Gram, observar morfología microscópica.

2.- Caracterización de las cepas puras. Pruebas bioquímicas ⁶⁶.

Sembrar por agitación la cepa a utilizar en los siguientes caldos: urea, glucosa, lactosa, maltosa, inositol, manitol, rafinosa, salicín, arabinosa, sacarosa, leche tomasolada, nitritos, nitratos.

Sembrar por picadura con asa recta en los siguientes medios semisólidos: SIM, gelatina bacteriológica, esculina.

Sembrar por estria en el medio sólido inclinado: almidón.

Incubar las pruebas bioquímicas a 37°C. Leer los resultados a las 24 horas de incubación y confirmar la lectura a las 48 horas de incubación. Realizar prueba de catalasa.

3.- Obtención del antígeno proteico con formaldehído⁶⁷.

Sembrar el microorganismo en matraz con 200 ml de caldo tioglicolato e incubar a 37°C de 18 a 24 horas. Después de este periodo de incubación agregar al cultivo un volumen igual de solución salina formalinizada hasta el 0.6 % dejando a temperatura ambiente de 24 a 48 horas; probar la esterilidad del producto, sembrando una pequeña cantidad en un tubo con caldo tioglicolato estéril, incubar a 37°C por 24 horas.

Cosechar del cultivo en matraz centrifugando a 3000 r.p.m. durante 30 minutos, desechar el sobrenadante; el sedimento bacteriano se resuspende con aproximadamente 5 ml de solución salina formalinizada al 0.3% diluyendo con esta misma solución hasta igualar la turbidez con la del tubo num. 3 del nefelómetro de McFarland (900 millones de bacterias/ml).

La suspensión así obtenida se envasa en un frasco ampula tapado asépticamente y engargolar con retapa de aluminio para guardar la suspensión en el refrigerador hasta su uso.

NEFELÓMETRO DE McFARLAND.

Se basa en la turbidez contra concentración bacteriana²³. Se preparan soluciones de cloruro de bario al 1 % y ácido sulfúrico al 1 %. Se agregan las cantidades indicadas en el siguiente cuadro a tubos del mismo diámetro.

McFARLAND	BACH	H ₂ SO ₄	NUM. BACTERIAS REPRESENTADAS
TUBO	(ml)	(ml)	(ml/ccs/ml)
1	0.1	9.9	300
2	0.2	9.8	750
3	0.3	9.7	1500
4	0.4	9.6	3000
5	0.5	9.5	4500
6	0.6	9.4	6000
7	0.7	9.3	7500
8	0.8	9.2	9000
9	0.9	9.1	10500
10	1.0	9.0	12000

SONICACIÓN DE ANTÍGENOS PROTEÍCOS.

Poner la suspensión de antígenos proteícos en un vaso de precipitado limpio, colocarlo en baño de hielo y someterlo a sonicación durante 12 minutos efectivos en lapsos de 30 segundos durante los cuales se hace cambio del baño de hielo (si es necesario).

4.- Cuantificación de antígeno proteico por el método de Lowry.

El cobre en solución alcalina forma un complejo de color azul con las proteínas el cual absorbe a 600 nm. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de proteínas presentes.

Se realiza una curva patrón colocando una serie de 10 tubos que contengan solución de ovoalbúmina en concentraciones de 50, 100, 150, 200, ..., 500 microgramos/ml en SSI. El blanco se hace con 1 ml de SSI. En otro tubo se coloca 1 ml de la muestra problema. A todos los tubos se les agregan 3 ml del reactivo de Lowry (preparado al momento) y se dejan reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después se adiciona 0.1 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu y se deja reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente, agitando ocasionalmente. Leer en un espectrofotómetro a 600 nm.

5.- Obtención de la muestra.

En tubos estériles se obtendrá una muestra de saliva basal de aproximadamente 2 ml de adultos con o sin inflamación parodontal.

Criterios de inclusión, exclusión y eliminación:

Se incluyeron muestras de aquellas personas que se encontraban en el rango de edad de 20 a 60 años con o sin enfermedad parodontal. Se excluyeron del estudio personas con edad menor a 20 o mayor a 60 años.

De las muestras obtenidas se eliminaron aquellas que presentaban sangre y las que por causas ajenas fueron estimuladas.

6.- Levantamiento del Índice Periodontal Gingival de O'Leary.

La evaluación del índice periodontal gingival (IPG) ha sido usado para determinar quien necesita ser sometido a tratamiento periodontal.

El objetivo fundamental es determinar cual es el diente o su tejido circundante con la lesión más avanzada en cada segmento.

Los criterios específicos para el estado gingival del IPG son los siguientes:

0 = Tejido fundamental adaptado a los dientes, consistencia firme con estructura fisiológica.

1 = Inflamación de leve a moderada, indicada por cambios de color y consistencia, afectando a un diente o más en el mismo segmento, pero que no rodea totalmente cada diente.

2 = Los cambios antes mencionados aislados o combinados rodean completamente a un diente o más en un mismo segmento.

3 = Inflamación intensa manifestada por la pérdida de la cavidad superficial (ulceración), hemorragia espontánea, pérdida de la continuidad vestibulolingual o de una papila interdientaria, desviación marcada del contorno normal como abultamiento o agrandamiento que cubra más de 1/3 de la corona anatómica, recesión y grietas.

La zona con el valor más alto de la puntuación gingival para la totalidad del segmento y el estado gingival de la boca se obtiene dividiendo la suma de las puntuaciones gingivales entre el número de segmentos.

7.- Tratamiento de la muestra.

La saliva se filtra en algodón para eliminar componentes celulares gruesos y mucina.

La muestra se pone a baño maría a 56°C durante 30 minutos para inactivar complemento y de esta forma evitar su fijación.

8.- Estandarización de la técnica de ELISA para *Rothia dentocariosa* y *Bacteroides fragilis* empleando una muestra de saliva con títulos altos de anticuerpos específicos determinada por aglutinación.

En una placa de microtitulación se harán diluciones al doble del antígeno, partiendo de una concentración de 8 microgramos (mcg)/100 microlitros (mcl) para la fila A, 4 mcg/100 mcl para la fila B, 2 mcg/100mcl para la fila C, 1 mcg/100mcl para la fila D, 0.5 mcg/100mcl para la fila E, 0.25 mcg/100mcl para la fila F y 0.125 mcg/100mcl para la fila G; la fila H será el testigo de antígeno, por lo tanto no lleva antígeno. Incubar la placa a 4°C por 18 horas, lavar la placa con PBS-tween, bloquear con ovoalbúmina al 1 %, Incubar 30 minutos (37°C), lavar con PBS-tween. Asimismo la saliva con títulos altos de anticuerpos específicos se diluirá 1:2, 1:4, 1:5, 1:8, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:80, 1:100 en PBS y se adiciona en las columnas 1, 2, 3, ..., 11 respectivamente siendo la columna 12 el testigo de anticuerpo, por lo tanto, no lleva anticuerpo. El pozo (H,12) será el blanco.

Incubar a 37°C/1 hora, lavar cuatro veces con PBS - tween y agregar en cada pozo 100 mcl de conjugado anti-IgA peroxidasa de rábano. Incubar a 37°C/1 hora. Agregar 100 mcl de amortiguador de sustrato con ortofenilendiamina.

9.- Determinación del título de anticuerpos de tipo IgAs e IgG por el método de ELISA para *Rothia dentocariosa* y *Bacteroides fragilis* en saliva con complemento inactivado.

Una vez encontradas las concentraciones se diluirá el antígeno en amortiguador de recubrimiento (carbonatos) para llegar a la concentración de antígeno determinado en la estandarización, llenar todos los pozos de una placa de microtitulación con 100 microlitros de antígeno excepto el pozo 96 dejando incubar la placa a 4°C durante 18 horas, lavar la placa con PBS - tween y bloquear con ovoalbúmina al 1 % durante 30 minutos para prevenir cualquier unión inespecífica, lavar cuatro veces con PBS - tween para eliminar el antígeno no fijado y adicionar en cada pozo 100 mcl de saliva diluida (*) exepcto el pozo 96, incubar a 37°C durante 1 hora y posteriormente lavar cuatro veces con PBS -tween. Adicionar a cada pozo 100 mcl de conjugado anti-IgA-peroxidasa de rábano e incubar a 37°C durante 1 hora.

**Agregar 100 mcl de amortiguador de sustrato con ortofenilendiamina e
incubar a 37°C durante 15 minutos. Después de ese tiempo adicionar 50
mcl de ácido sulfúrico 2.5 N para detener la reacción. Leer la densidad
óptica a 490 nm.**

**Seguir el mismo procedimiento para el conjugado anti-IgG-peroxidasa de
rábano.**

(*) Dilución determinada en la estandarización.

RECURSOS.

I. MATERIAL BIOLÓGICO.

- * *Cepas bacterianas puras de Rothia dentocariosa y Bacteroides fragilis*
- * *Saliva humana basal con complemento.*
- * *Ovoalbúmina.*
- * *IgA e IgG estándar. Behringwerke AG.*

II. MEDIOS DE CULTIVO Y PRUEBAS BIOQUÍMICAS.

MEDIO:	ESPECIFICACIÓN:
* <i>Base agar sangre.</i>	<i>Merck</i>
* <i>Caldo tioglicolato.</i>	<i>Bioxón</i>
* <i>Gelatina bacteriológica</i>	<i>Bioxón</i>
* <i>Glucosa y rojo de fenol</i>	<i>Bioxón</i>
* <i>Lactosa y rojo de fenol</i>	<i>Bioxón</i>
* <i>Maltosa y rojo de fenol</i>	<i>Bioxón</i>
* <i>Inositol y rojo de fenol</i>	<i>Bioxón</i>
* <i>Manitol y rojo de fenol</i>	<i>Bioxón</i>
* <i>Rafinosa y rojo de fenol</i>	<i>Bioxón</i>
* <i>Salicin y rojo de fenol</i>	<i>Bioxón</i>
* <i>Arabinosa y rojo de fenol</i>	<i>Bioxón</i>

MEDIO:	ESPECIFICACIÓN:
* Sacarosa y rojo de fenol	Bioxón
* S.I.M.	Bioxón
* Leche tornasolada	
* Gelatina bacteriológica	
* Esculina	
* Nitritos/Nitratos.	
* Almidón	

III. REACTIVOS.	ESPECIFICACIÓN
* Colorantes para tinción de Gram.	
* Agua bidestilada.	
* Hidróxido de sodio.	J.T. Baker
* Pirogalol.	J.T. Baker
* Peróxido de hidrógeno	Monterrey
* Cloruro de sodio.	Monterrey
* Formaldehido.	J.T. Baker
* Ácido sulfúrico.	Técnica Química S.A.
* Cloruro de bario	J.T. Baker
* Conjugado anti IgA-peroxidasa de rábano y anti-IgG peroxidasa de rábano comercial. Sigma Chemical Company	Cappel

IV.	EQUIPO.	ESPECIFICACIÓN.
	* <i>Balanza granataria</i>	<i>Ohaus</i>
	* <i>Balanza analítica</i>	<i>Mettler H80</i>
	* <i>Agitador vortex</i>	<i>Genie</i>
	* <i>Olla de presión</i>	<i>Presto (10 lt.)</i>
	* <i>Estufa</i>	<i>Riessa</i>
	* <i>Microscopio óptico</i>	<i>Zei</i>
	* <i>Equipo de destilación</i>	<i>Pyrex</i>
	* <i>Refrigerador</i>	<i>Mabe</i>
	* <i>Sonicador</i>	<i>Labconco</i>
	* <i>Espectrofotómetro Spectronic 20</i>	<i>Bausch & Lomb</i>
	* <i>Lector de placas de ELISA</i>	<i>Dynatech</i>
	* <i>Micropipetas (20 a 100 microlitros)</i>	<i>Brand</i>

V.	MATERIAL DE VIDRIO.	ESPECIFICACIÓN
	* <i>Portaobjetos</i>	<i>75 x 25 mm.</i>
	* <i>Vasos de precipitado de:</i> <i>50, 100, 200, 500 y 1000 ml.</i>	<i>Pyrex</i>
	* <i>Matraces erlenmeyer de: 125 y 500 ml</i>	<i>Pyrex</i>
	* <i>Cajas de petri de 10 cm. de diámetro</i>	<i>Pyrex</i>
	* <i>Tubos de ensayo</i>	<i>Pyrex</i>
	* <i>Tubos con tapa de rosca</i>	<i>Pyrex</i>
	* <i>Pipetas graduadas de 1, 2, 5 y 10 ml</i>	<i>Pyrex</i>
	* <i>Pipetas pasteur</i>	
	* <i>Probetas de 25, 50, 500 y 1000 ml</i>	<i>Pyrex</i>
	* <i>Celdas para espectrofotómetro</i>	<i>Bausch & Lomb</i>

VI. MATERIAL VARIO.

- * **Asas bacteriológicas.**
- * **Espátulas de acero inoxidable.**
- * **Piseta de 250 ml.**
- * **Soporte universal.**
- * **Triple metálico.**
- * **Tela de asbesto.**
- * **Mechero bunsen.**
- * **Mechero fisher.**
- * **Papel parafilm.**
- * **Tijeras.**
- * **Jeringas desechables estériles.**
- * **Algodón.**
- * **Gradillas.**
- * **Bulbos de plástico para pipetas pasteur.**
- * **Placas de microtitulación.**
- * **Puntas para micropipeta.**

VIII. LUGAR:

**Laboratorio L-313 de la Facultad de Estudios Superiores
Zaragoza.**

RESULTADOS.

CUADRO 1

GRUPO 1 : EDAD DE 20 A 30 AÑOS.

EDAD	SEXO	I. P. G.		<i>Rothia dentocariosa</i>		<i>Bacteroides fragilis</i>	
		ESTADO GINGIVAL/ HIGIENE		A B S O R B A N C I A S			
				IgA	IgG	IgA	IgG
23	F	0	B	0,179	0,404	0,225	0,05
24	F	0	B	0,261	0,059	0,256	0,042
26	F	0	B	0,064	0,489	0,215	0,216
22	F	0	B	0,256	0,009	0,259	0,074
20	M	0	B	0,167	0,227	0,212	0,127
22	M	0	B	0,174	0,317	0,222	0,024
22	M	0	B	0,168	0,167	0,184	0,184
20	M	0	B	0,261	0,022	0,266	0,001
24	M	0	B	0,253	0,047	0,249	0,06
25	M	0	B	0,271	0,212	0,259	0,083
30	M	0	R	0,171	0,166	0,211	0,117
20	F	1	B	0,182	0,31	0,22	0,078
21	F	1	B	0,209	0,066	0,232	0,030
22	F	1	B	0,17	0,232	0,214	0,191
28	F	1	B	0,2	0,41	0,22	0,036
21	F	2	B	0,168	0,391	0,277	0,121
23	F	1	R	0,16	0,17	0,184	0,21
26	F	1	R	0,159	0,209	0,191	0,124
28	F	1	R	0,134	0,095	0,245	0,2
26	M	1	R	0,17	0,23	0,215	0,099
22	M	1	R	0,171	0,435	0,209	0,097
25	M	1	R	0,171	0,086	0,165	0,096
26	M	1	R	0,236	0,127	0,247	0,052
21	F	2	R	0,174	0,305	0,22	0,107
26	F	2	R	0,174	0,305	0,197	0,212
29	F	2	R	0,164	0,342	0,175	0,031
29	F	2	R	0,168	0,118	0,206	0,185
23	F	2	R	0,157	0,181	0,197	0,063
28	F	2	R	0,178	0,207	0,212	0,02
30	F	2	R	0,176	0,268	0,201	0,131
23	M	2	R	0,162	0,148	0,167	0,165
23	F	3	R	0,17	0,323	0,194	0,206
26	F	3	R	0,2	0,166	0,211	0,072
23	M	3	R	0,149	0,132	0,131	0,258
25	F	2	M	0,171	0,117	0,165	0,265
26	F	3	M	0,166	0,412	0,214	0,139
29	F	3	M	0,167	0,329	0,2	0,142

CUADRO 2

GRUPO 2 : EDAD DE 31 A 40 AÑOS.

EDAD	SEXO	I. P. G.		<i>Rothia dentocariosa</i>		<i>Bacteroides fragilis</i>	
		ESTADO GINGIVAL/ HIGIENE		A B S O R B A N C I A S			
				IgA	IgG	IgA	IgG
38	F	0	B	0,189	0,21	0,22	0,122
32	F	1	B	0,182	0,299	0,209	0,03
39	F	1	B	0,185	0,19	0,214	0,203
34	F	2	B	0,177	0,243	0,209	0,113
32	F	1	R	0,185	0,117	0,208	0,26
31	F	1	R	0,25	0,013	0,271	0,016
37	F	1	R	0,16	0,297	0,218	0,075
40	F	1	R	0,167	0,5	0,226	0,139
31	F	2	R	0,173	0,153	0,201	0,182
35	F	2	R	0,181	0,252	0,218	0,11
36	F	2	R	0,189	0,22	0,208	0,065
39	F	2	R	0,173	0,318	0,236	0,057
37	F	2	R	0,173	0,071	0,211	0,294
33	F	2	R	0,189	0,1	0,214	0,263
38	F	2	R	0,162	0,165	0,172	0,163
31	M	2	R	0,162	0,285	0,209	0,16
33	M	2	R	0,173	0,29	0,211	0,125
37	M	2	R	0,259	0,099	0,258	0,051
40	F	3	R	0,17	0,147	0,208	0,25
34	M	3	R	0,197	0,227	0,197	0,039
34	F	3	M	0,153	0,489	0,2	0,218
31	M	3	M	0,185	0,092	0,201	0,246
32	M	3	M	0,67	0,179	0,2	0,23

SEXO: F (Femenino), M (Masculino). I.P.G.: ESTADO GINGIVAL: 0=Consistencia firme, 1=Inflamación de leve a moderada en algunas zonas del diente, 2=Inflamación alrededor de todo el diente, 3=Inflamación intensa; HIGIENE: B= Buena, R= Regular, M= Mala.

CUADRO 3

GRUPO 3 : EDAD DE 41 A 50 AÑOS.

EDAD	SEXO	I. P. G.		<i>Rothia dentocariosa</i>		<i>Bacteroides fragilis</i>	
		ESTADO GINGIVAL/ HIGIENE		A B S O R B A N C I A S			
		IgA	IgG	IgA	IgG		
50	M	0	B	0,179	0,236	0,204	0,12
41	F	1	B	0,174	0,436	0,214	0,051
50	F	1	B	0,167	0,312	0,209	0
41	F	2	B	0,157	0,038	0,181	0,294
43	F	2	B	0,164	0,301	0,214	0,154
46	F	2	B	0,181	0,252	0,223	0,202
46	F	2	B	0,184	0,173	0,203	0,159
48	M	2	B	0,189	0,183	0,209	0,226
43	F	2	R	0,173	0,331	0,215	0,067
48	F	2	R	0,184	0,088	0,181	0,185
50	F	2	R	0,173	0,128	0,215	0,244
50	F	2	R	0,184	0,292	0,208	0,085
45	M	2	R	0,181	0,456	0,211	0,067
45	F	3	R	0,173	0,482	0,214	0,16
48	F	3	R	0,154	0,38	0,174	0,089
44	M	3	R	0,185	0,23	0,215	0,042
50	M	3	R	0,178	0,318	0,198	0,054
50	F	2	M	0,164	0,257	0,215	0,192
42	F	3	M	0,18	0,404	0,185	0,127
49	F	3	M	0,165	0,135	0,185	0,133

SEXO: F (Femenino), M (Masculino). I.P.G.: ESTADO GINGIVAL: 0=Consistencia firme, 1=Inflamación de leve a moderada en algunas zonas del diente, 2=Inflamación alrededor de todo el diente, 3=Inflamación intensa; HIGIENE: B= Buena, R= Regular, M= Mala.

CUADRO 4

GRUPO 4 : EDAD DE 51 A 60 AÑOS.

EDAD	SEXO	I . P . G .		<i>Rothia dentocariosa</i>		<i>Bacteroides fragilis</i>	
		ESTADO GINGIVAL/ HIGIENE		A B S O R B		A N C I A S	
				IgA	IgG	IgA	IgG
56	F	0	B	0,164	0,32	0,22	0,126
57	F	0	B	0,179	0,262	0,201	0,123
60	F	2	B	0,241	0,11	0,252	0,066
58	M	2	R	0,176	0,498	0,284	0,127
60	M	2	R	0,166	0,148	0,204	0,215
52	F	3	R	0,165	0,085	0,212	0,118
52	M	3	R	0,179	0,068	0,208	0,22
58	M	3	R	0,164	0,457	0,208	0,108
53	F	3	M	0,065	0,195	0,208	0,259

SEXO: F (Femenino), M (Masculino). I.P.G.: ESTADO GINGIVAL: 0=Consistencia firme, 1=Inflamación de leve a moderada en algunas zonas del diente, 2=Inflamación alrededor de todo el diente, 3=Inflamación intensa; HIGIENE : B= Buena, R= Regular, M= Mala.

ANÁLISIS DE REGRESIÓN Y CORRELACION.

LOS DATOS DE REGRESIÓN LINEAL SE OBTIENEN A PARTIR DE LA ECUACION DE LA RECTA:

$$y = mx + b$$

Donde: m= pendiente, b= ordenada al origen

$$m = \frac{n \cdot \sum xy - \sum x \cdot \sum y}{n \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2} \quad y \quad b = \frac{\sum y - m \cdot \sum x}{n}$$

DATOS DE CORRELACION.

$$r = \frac{n \cdot \sum xy - \sum x \cdot \sum y}{\sqrt{[n \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2][n \cdot \sum y^2 - (\sum y)^2]}}^{1/2}$$

Donde: r = coeficiente de correlación, r^2 = coeficiente de determinación
y c = covarianza

$$c = \sum xy - n \cdot \bar{x} \cdot \bar{y} / (n - 1)$$

VARIABLES CONSIDERADAS:

x = Índice periodontal gingival (I.P.G.)

y = Título de anticuerpos IgA e IgG en saliva (ELISA) para

R. dentocariosa y B. fragilis.

CRITERIOS CONSIDERADOS:

H_0 Hay asociación entre variables

H_a No hay asociación entre variables

F crítica = 4.08 (95% de confianza).

F crítica < F calculada Se acepta H_0 (Hay asociación entre variables)

F crítica > F calculada Se rechaza H_a (No hay asociación entre variables)

(Se siguió el mismo criterio para todos los títulos)

Regresión lineal y correlación.

DE TABLA 1.

Rothia dentocariosa: IgA

$n= 37$ $b= 21.2430$ $m= -46.1790$ $r^2= 0.0526$
 $F_{calculada} = 1.9497$ $F_{crítica} > F_{calculada}$ No hay asociación
 $C= -0.01170225$

Rothia dentocariosa: IgG

$n= 37$ $b= 0.1896$ $m= 0.1112$ $r^2= 0.0377$
 $F_{calculada} = 1.3656$ $F_{crítica} > F_{calculada}$ No hay asociación
 $C= 0.03253858$

Bacteroides fragilis: IgA

$n= 37$ $b= 0.2300$ $m= 0.0515$ $r^2= 0.1611$
 $F_{calculada} = 1.4990$ $F_{crítica} > F_{calculada}$ No hay asociación
 $C= -0.01427747$

Bacteroides fragilis: IgG

$n= 37$ $b= 0.0955$ $m= 0.0810$ $r^2= 0.0669$
 $F_{calculada} = 2.3303$ $F_{crítica} > F_{calculada}$ No hay asociación
 $C= 0.02592792$

DE TABLA 2.

Rothia dentocariosa: IgA

n= 23 b= 0.1422 m= 0.1290 r²= 0.040

F_{calculada} = 1.1550 F_{crítica} > F_{calculada} No hay asociación

C= 0.21928853

Rothia dentocariosa: IgG

n= 23 b= 0.2291 m= 0.0355 r²= 1.85 x 10⁻³

F_{calculada} = muy pequeña F_{crítica} > F_{calculada} No hay asociación

C= -2.776679 x 10⁻³

Bacteroides fragilis: IgA

n= 23 b= 0.2348 m= -0.0481 r²= 0.1186

F_{calculada} = 2.7770 F_{crítica} > F_{calculada} No hay asociación

C= -6.290514 x 10⁻³

Bacteroides fragilis: IgG

n= 23 b= 0.0790 m= 0.0150 r²= 0.0710

F_{calculada} = 1.5814 F_{crítica} > F_{calculada} No hay asociación

C= 0.02095059

Para las tablas 3 y 4 la r² es muy pequeña por lo cual el análisis de varianza para la regresión es malo.

TABLA 5.**Porcentaje del estado gingival entre hombres y mujeres**

ESTADO GINGIVAL	% MUJERES	% HOMBRES	% TOTAL
0	17.86	8.98	16.95
1	16.85	27.49	21.35
2	30.37	18.98	30.32
3	15.70	10.00	22.99

I.P.G.: ESTADO GINGIVAL: 0=Consistencia firme, 1=Inflamación de leve a moderada en algunas zonas del diente, 2=Inflamación alrededor de todo el diente, 3=Inflamación intensa

TABLA 6.**Porcentaje de la higiene bucal entre hombres y mujeres**

HIGIENE BUCAL	% MUJERES	% HOMBRES	% TOTAL
1	27.27	10.17	18.72
2	27.27	10.17	18.72
3	27.27	10.17	18.72
4	27.27	10.17	18.72

TABLA 7

Porcentaje por grupos de edad entre hombres y mujeres

GRUPOS POR EDAD	% MUJERES	% HOMBRES	% TOTAL
I: 20 A 30 años	26.97	14.60	41.57
II: 31 A 40 años	19.10	6.74	25.84
III: 41 A 50 años	16.85	5.62	22.47
IV: 51 A 60 años	6.62	4.49	11.11

TABLA 8

Porcentaje por grupos de edad con el estado gingival

GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV
17.3	12.62	11.12	22.11
17.3	17.3	17.3	17.3
17.3	17.3	17.3	17.3
17.3	17.3	17.3	17.3

I.P.G.: ESTADO GINGIVAL: 0=Consistencia firme, 1=Inflamacion de leve a moderada en algunas zonas del diente, 2=Inflamación alrededor de todo el diente, 3=Inflamación intensa

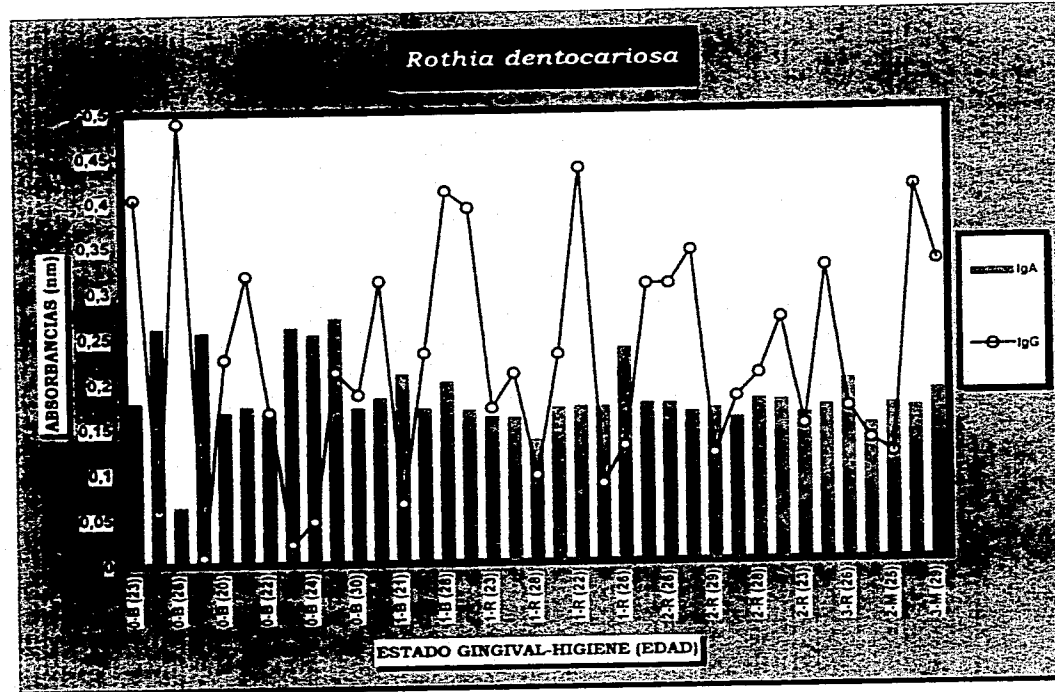
TABLA 9

Relación por grupos de edad con la higiene

HIGIENE BUCAL	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
BUENA	43.24	17.39	22.40.00	23.82
REGULAR	49.72	69.66	74.00	62.65
MALA	8.10	13.04	15.00	11.11

GRAFICA 1

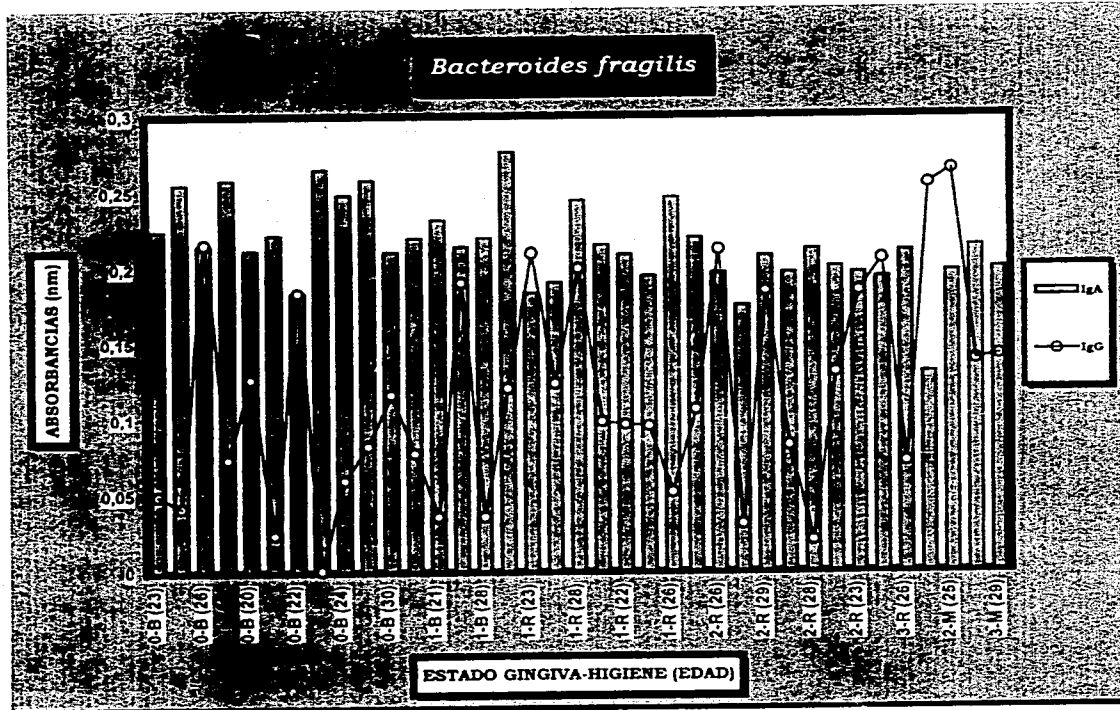
RELACION DE ABSORBANCIAS ENTRE IgAs E IgG



EDAD DE 20 A 30 AÑOS

GRAFICA 2

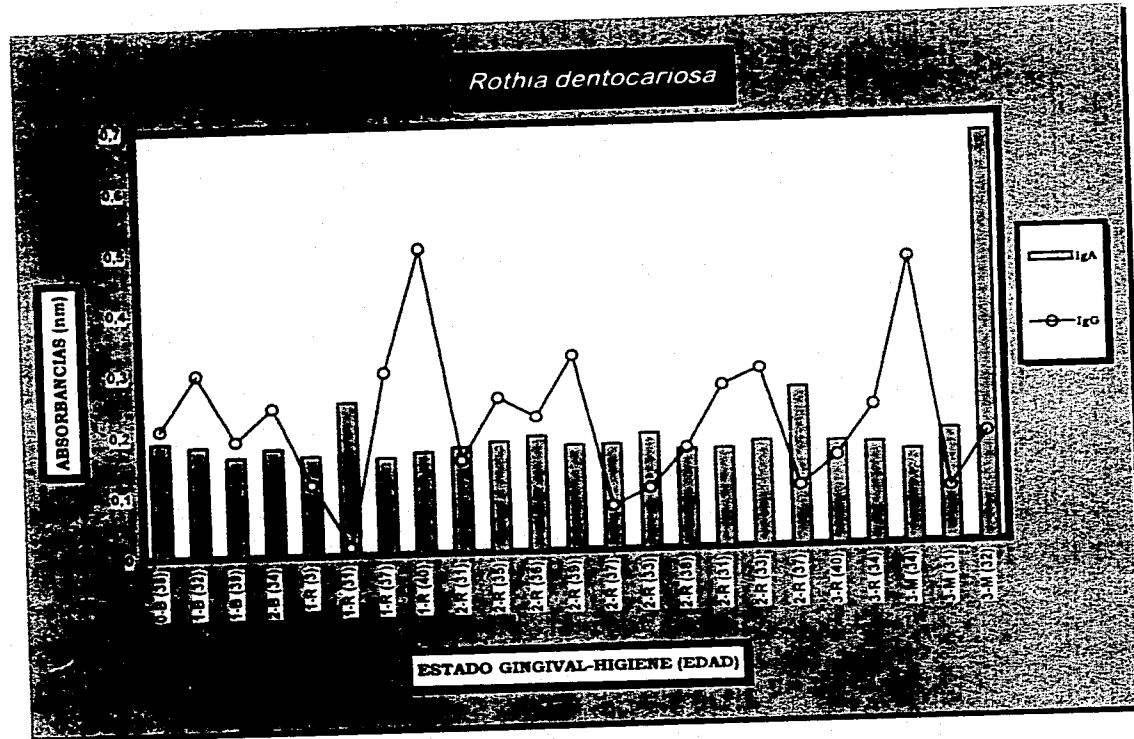
RELACION DE ABSORBANCIAS ENTRE IgAs E IgG



EDAD DE 20 A 30 AÑOS

GRAFICA 3

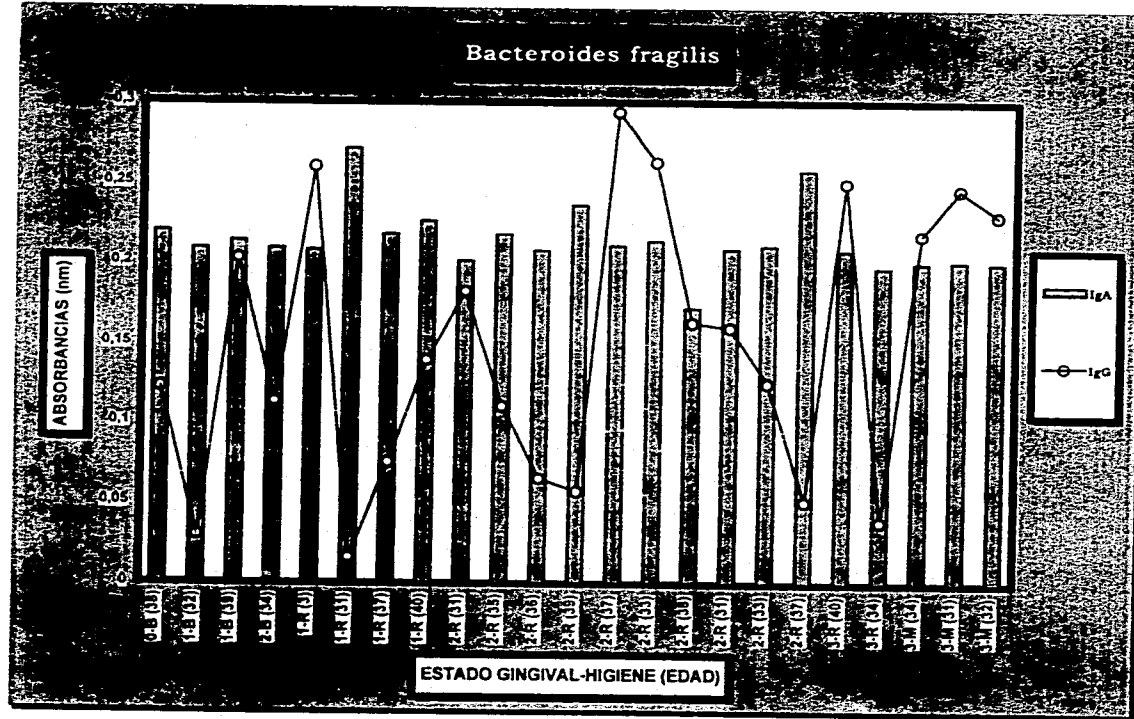
RELACION DE ABSORBANCIAS ENTRE IgAs E IgG



EDAD DE 31 A 40 AÑOS

GRAFICA 4

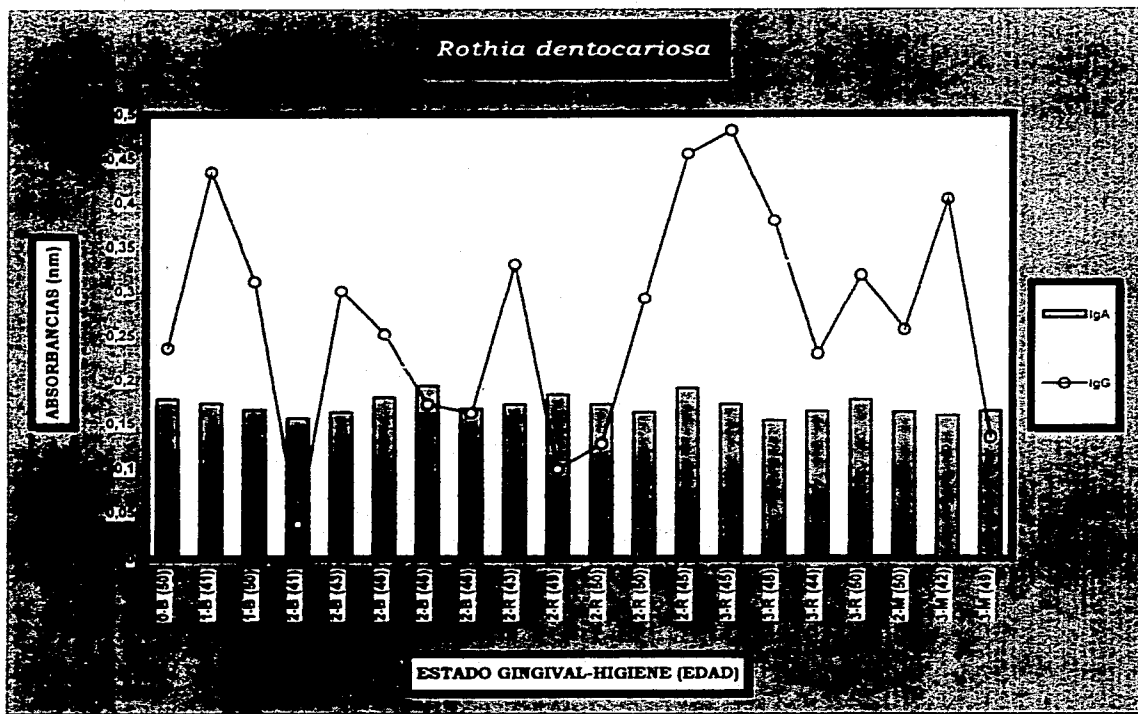
RELACION DE ABSORBANCIAS ENTRE IgAs E IgG



EDAD DE 31 A 40 AÑOS

GRAFICA 5

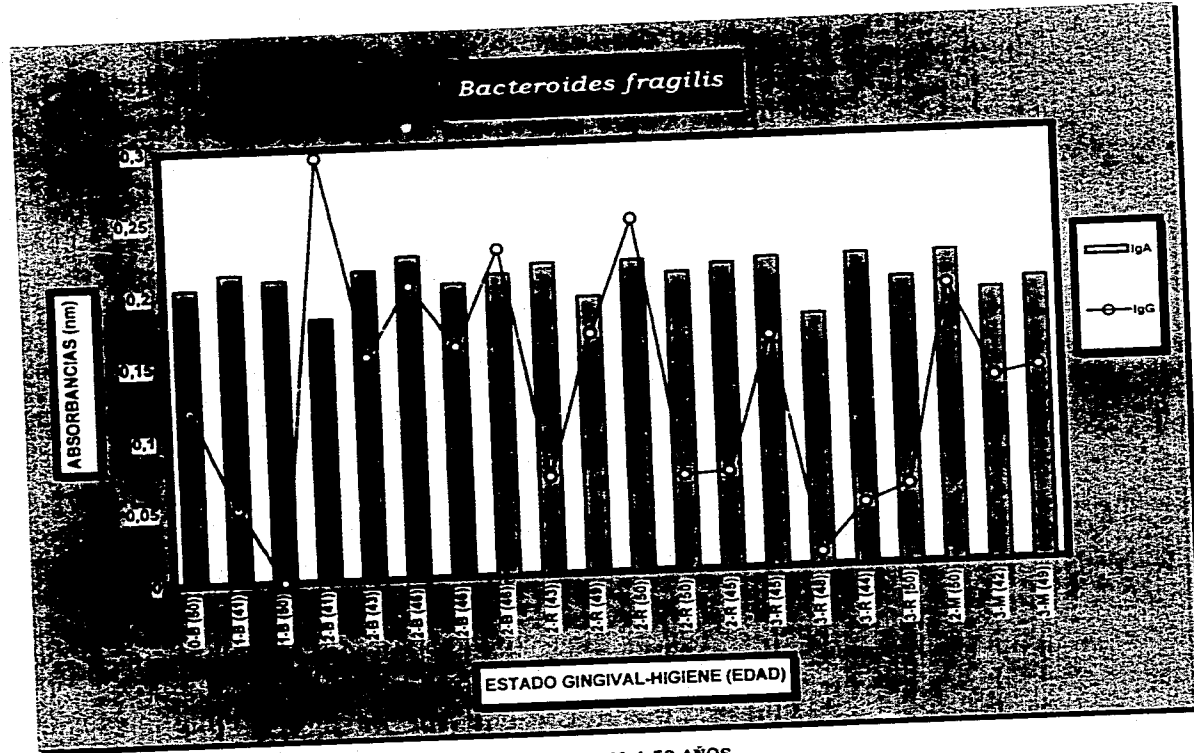
RELACION DE ABSORBANCIAS ENTRE IgAs E IgG



EDAD DE 41 A 50 AÑOS

GRAFICA 6

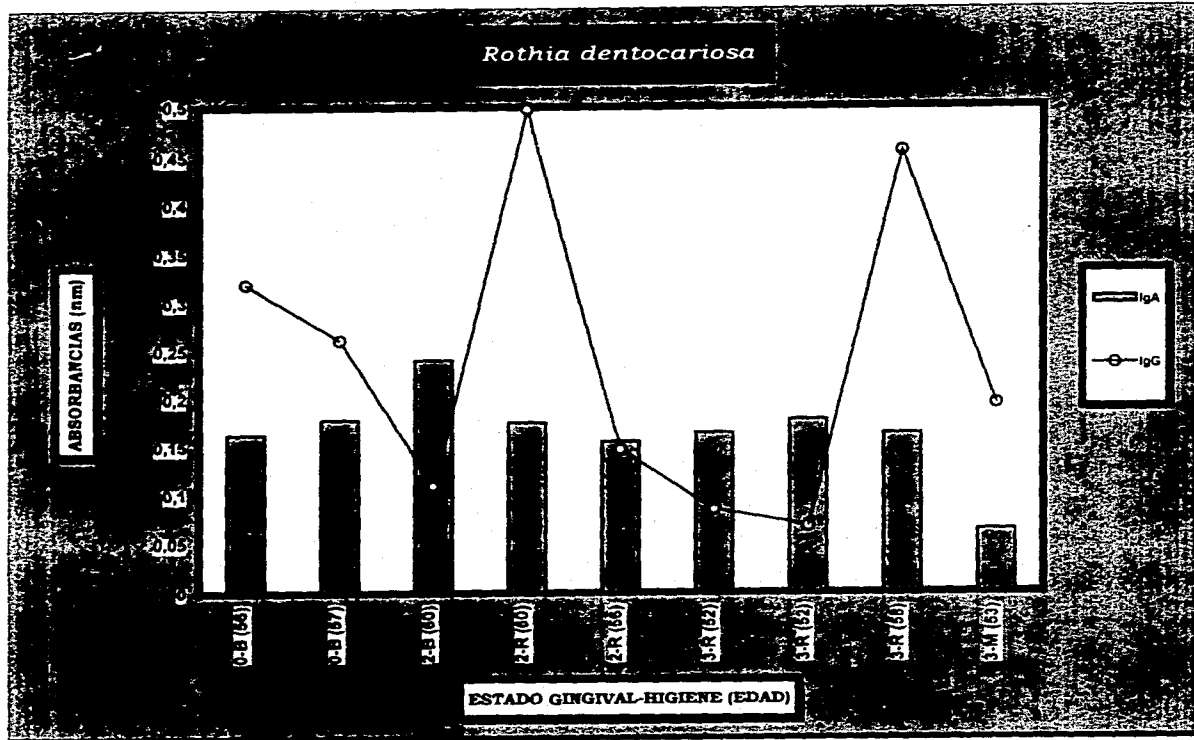
RELACION DE ABSORBIENCIAS ENTRE IgAs E IgG



EDAD DE 41 A 50 AÑOS

GRAFICA 7

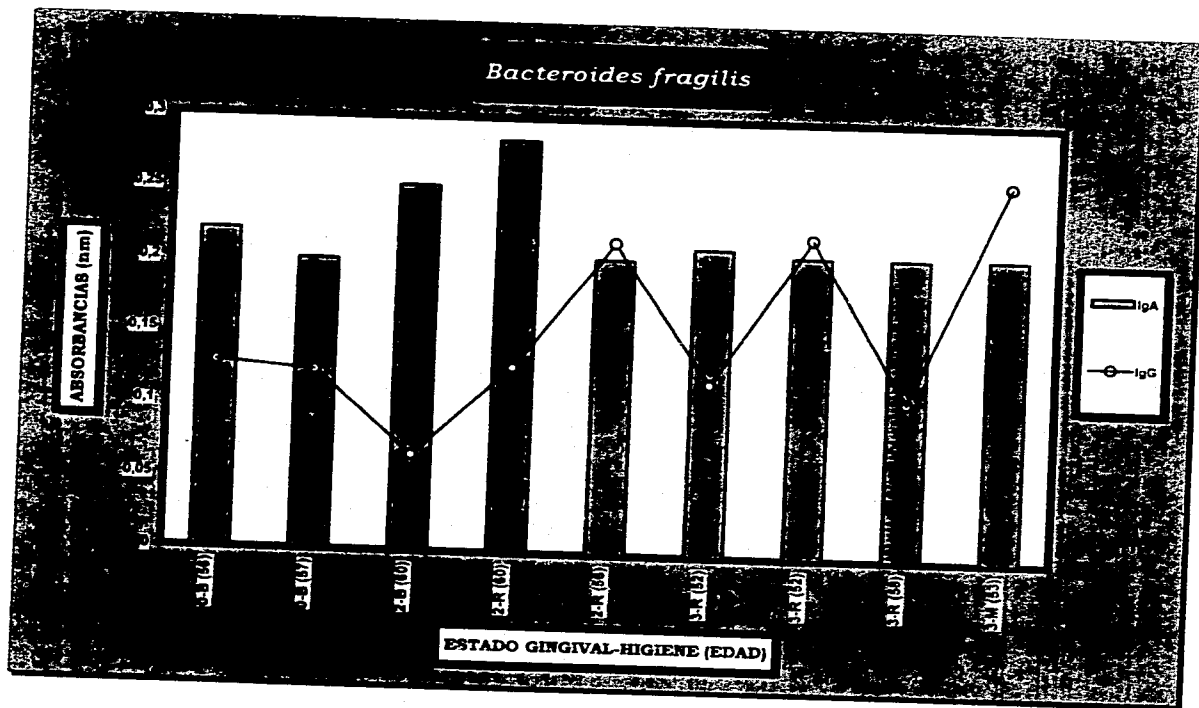
RELACION DE ABSORBANCIAS ENTRE IgAs E IgG



EDAD DE 51 A 60 AÑOS

GRAFICA 8

RELACION DE ABSORBANCIAS ENTRE IgAs E IgG



EDAD DE 51 A 60 AÑOS

RESULTADOS.

- 1.- Se obtuvieron cepas puras de *R. dentocariosa* y *B. fragilis*.
- 2.- Los antígenos proteicos se extrajeron de las cepas puras con formaldehído y se cuantificaron por el método de Lowry encontrándose una concentración de 400 mcg/ml para *B. fragilis* y de 19737.79 mcg/ml para *R. dentocariosa*.
- 3.- Se colectaron muestras de saliva basal en adultos con o sin enfermedad periodontal y se levanto el Índice Periodontal Gingival (cuadros 1, 2, 3 y 4). Las muestras se filtraron y se incubaron a 56°C para inactivar el complemento.
- 4.- Se realizaron diluciones para estandarizar la técnica de ELISA con los antígenos *R. dentocariosa* y *B. fragilis* encontrándose una concentración óptima de 16 mcg/ml para cada una de las cepas.
- 5.- En la estandarización de la técnica de ELISA se encontró una dilución óptima para los conjugados de 1:1000 para anti-IgG y de 1:500 para anti-IgA.
- 6.- Se determinó el título de anticuerpos IgG e IgA en saliva contra las cepas *R. dentocariosa* y *B. fragilis* por el método de ELISA. Se procesaron 89 muestras de las cuales se leyeron absorbancias a 490 nm, los resultados se observan en los cuadros 1, 2, 3 y 4.

7.- Se realizó el análisis estadístico de regresión y correlación encontrando que no hay asociación del título de anticuerpos con el IPG para la población estudiada por lo que no se puede establecer un posible diagnóstico de enfermedad parodontal.

8.- El cuadro 5 muestra el porcentaje del estado gingival entre hombres y mujeres encontrando una mayor inflamación en mujeres, sobre todo para el índice 2.

9.- El cuadro 6 muestra el porcentaje de la higiene bucal entre hombres y mujeres encontrando que el 53.93% de la población presenta una higiene bucal regular, un 34.83% presenta higiene bucal buena y un 11.23% corresponde a una higiene bucal mala.

10. El cuadro 7 muestra el porcentaje por grupos de edad entre hombres y mujeres. Se observa que casi la mitad (41.57 %) de la población estudiada cae entre 20 a 30 años y un 10.11 corresponde a personas de edad más avanzada (51 a 60 años).

11.- El cuadro 8 muestra los porcentajes por grupos de edad con el estado gingival, encontrando que los grupos II (31-40 años) y III (41-50 años) presentan mayor porcentaje para el índice 2, es decir, inflamación alrededor de todo el diente.

12.- El cuadro 9 presenta la relación por grupos de edad con la higiene, se observa una higiene bucal regular para los cuatro grupos.

El grupo I presenta el mayor porcentaje (43.24 %) de higiene bucal buena , el grupo II el mayor porcentaje (69.56 %) de higiene bucal regular y el grupo III el mayor porcentaje (15.00 %) de higiene bucal mala.

13.- Las gráficas 1, 3, 5 y 7 muestra el nivel de anticuerpos IgAs e IgG para R. dentocariosa; se observan títulos más altos para IgG.

14.- Las gráficas 2, 4, 6 y 8 muestran el nivel de anticuerpos IgAs e IgG para B. fragilis encontrando que en la mayoría de los casos el nivel de IgA es mayor.

ANALISIS DE RESULTADOS.

La correlación entre las variables I.P.G. y ELISA no existe, esto se explica porque dentro de la estructura de la encía se encuentran capilares de irrigación que trasudan IgG del suero hacia la cavidad oral y realmente no se encontraron pacientes con una inflamación considerable para hallar una cantidad mayor del nivel de IgG; el coeficiente de regresión es bastante bajo.

*En cuanto a la obtención de cepas fue difícil cultivar y purificar los microorganismos utilizados, sobre todo *R. dentocariosa* debido a su naturaleza microaerofílica y es fácil confundir con *Streptococcus* o *Corinabacterium*, porque pueden aparecer en forma cocoide. Para obtener el antígeno fue difícil ya que se engrosa la capa externa de la célula al dejar en la solución formalinizada al 0.06%, debido a esto se prolongo el tiempo de sonicación para romper las células pues su resistencia fue mayor.*

En cuanto a la toma de muestras y levantamiento del IPG, no todas las personas tuvieron disponibilidad a donar saliva por pena a babear en el tubo. En cuanto a los donadores no para todos fue fácil juntar saliva debido a que cada persona presenta salivación diferente; mientras que algunos rápidamente recolectaron más de 2 ml, otras tardaron más tiempo y algunas no lo lograron.

La integración del Q.F.B. en el terreno del Cirujano dentista beneficiaría al paciente en la detección temprana de alteraciones en parodonto por medio de pruebas de laboratorio. Comprometiendo al odontólogo a obtener una buena muestra clínica pues deberá cuidar el microambiente de la misma y responsabilizando al Q. F. B. a hacer una buena evaluación del agente patógeno.

Cuando existen varios agentes etiológicos causantes de enfermedad parodontal los niveles de IgAs estarán elevados dependiendo de otros padecimientos en boca.

Debido a que no hay asociación entre el I.P.G y el nivel de anticuerpos, se sugiere realizar el seguimiento específico para cada microorganismo relacionado con enfermedad parodontal y así poder colaborar con el cirujano dentista.

CONCLUSIONES.

1.- Se obtuvieron antígenos proteicos de *Rothia dentocariosa* y *Bacteroides fragilis* a partir de cultivos puros.

2.- La medición del I. P. G. considerando los códigos y criterios de O'Leary explica los niveles bajos de anticuerpos IgAs e IgG debido a la ausencia de inflamación considerable y una higiene bucal regular con poca variabilidad de un grupo a otro.

3.- Se estandarizó la técnica de ELISA para los microorganismos en estudio y se determinó el nivel de anticuerpos IgAs e IgG en saliva de personas de 20 a 60 años con o sin enfermedad paradontal por el método indirecto de ELISA y se comparó con el I.P.G. encontrándose que no existe una correlación lineal entre los títulos de anticuerpos y el I.P.G. para la población estudiada.

4.- Debido a la variabilidad de factores afectando una misma problemática se sugiere manejar un mayor número de pacientes por grupo pues no fue posible realizar el análisis estadístico de regresión y correlación para todos los grupos ya que el Análisis de varianza para la regresión con una correlación tan pequeña es malo.

5.- A fin de iniciar un tratamiento temprano y evitar daños irreversibles en tejidos parodontales se debe continuar el estudio con inmunoensayos, pues la enfermedad parodontal es una alteración que generalmente no produce sintomatología.

ANEXOS

PREPARACION DE SOLUCIONES

a.- HIDROXIDO DE SODIO AL 30% . (NaOH)

Pesar 0.3g de hidróxido de sodio y disolver en un mililitro de agua.

b.- PIROGALOL AL 50 %.

Pesar 0.5g de pirogalol y disolver en un mililitro de agua.

c.- SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA AL 85 % . (SSI)

Pesar 8.5g de cloruro de sodio (NaCl) y disolver en un litro de agua destilada.

d.- SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA FORMALINIZADA AL 0.06 %.

Colocar 1.5 ml de formaldehído (39.7 % de pureza) y adicionar 98.5 ml de SSI.

e.- SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA FORMALINIZADA AL 0.03 %.

Colocar 0.75 ml de formaldehído (39.7 % de pureza) y adicionar 99.25 ml de SSI.

f.- SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA FORMALINIZADA AL 0.01 %.

Colocar 0.25 ml de formaldehído (39.7 % de pureza) y adicionar 99.75 ml de SSI.

g.- CLORURO DE BARIO AL 1 %.

Pesar 0.1g de cloruro de bario ($BaCl_2$).

h.- ACIDO SULFÚRICO AL 1 %.

Colocar 1 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4 ; Densidad=1.80 g/ml) en 100 ml de agua.

I.- OVOALBUMINA 500 mcg/ml en SSI.

Colocar 0.025 gramos de albúmina en 50 ml de solución salina isotónica.

J.- REACTIVO DE LOWRY.

REACTIVO A.- Colocar carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 2% y tartrato de sodio y potasio al 0.02% en hidróxido de sodio ($NaOH$) 0.1 N.

REACTIVO B.- Sulfato de cobre al 0.5%.

Mezclar 50 ml del reactivo A con 1 ml del reactivo B.

NOTA: Se conservan en refrigeración.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

k.- AMORTIGUADOR DE RECUBRIMIENTO CARBONATO-BICARBONATO.

pH=9.6

Pesar 1.59 g de Carbonato de sodio y 2.93g de bicarbonato de sodio.

Aforar a 1 litro con agua bidestilada. NOTA: Se puede almacenar a 4°C por no más de dos semanas.

l.- PBS (SOLUCIÓN AMORTIGUADORA SALINA DE FOSFATOS) pH=7.6

Pesar 8 g de cloruro de sodio (NaCl), 0.2 g de cloruro de potasio (KCl), 1.15 g de fosfato de sodio dibásico y 0.2g de fosfato de potasio.

Aforar a 1 litro con agua bidestilada.

m.- PBS-TWEEN (SOLUCIÓN AMORTIGUADORA SALINA DE FOSFATOS TWEEN) pH=7.4

Pesar 8 g de cloruro de sodio (NaCl), 0.2 g de cloruro de potasio (KCl), 2.9 g de fosfato de sodio dibásico dodecahidratado y 0.2 g de fosfato de potasio monobásico.

Aforar a 1 litro con agua bidestilada. Poco antes de aforar adicionar 0.5 ml de tween 20.

NOTA: Almacenar a 4°C.

n.- OVOALBÚMINA AL 1 % EN LECHE AL 5 %.

Pesar 0.5 g de ovoalbúmina y 2.5 g de leche y disolver en 47 ml de PBS.

o.- AMORTIGUADOR DE SUSTRATO DE PEROXIDASA CON ORTO-FENILENDIAMINA. pH=5

Mezclar 24.3 ml de ácido cítrico 0.1 Molar y 25.7 ml de fosfato de sodio 0.2 Molar

NOTA: Se prepara antes de su uso ya que se descompone con la luz.

(Disolver 40 mg de Orto-fenilendiamina en 100 ml de amortiguador de sustrato y 40 mcl de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30 %).

PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

a) AGAR SANGRE.

Suspender 40 g de agar base sangre en 1 litro de agua destilada, dejar reposar 15 minutos y después hervir hasta disolver completamente. Esterilizar en matraz por 15 minutos a 121°C/15 libras.

Enfriar aproximadamente de 40 a 50°C y en condiciones de esterilidad mezclar homogéneamente sangre desfibrinada en una proporción del 5 al 8 %.

b) CALDO TIOGLICOLATO.

Suspender 28.5g de polvo en 1 litro de agua destilada. Disolver calentando, hervir durante dos minutos o hasta disolución.

Distribuir en tubos y esterilizar a 121°C por 18 minutos y 15 libras.

c) AGAR DE INFUSION CEREBRO Y CORAZON.

Suspender 52 g del medio en polvo en un litro de agua desionizada y calentar hasta ebullición para disolver por completo.

Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C y 15 libras.

d) AGAR SANGRE HEMINA-MENADIONA.

Solución madre de hemina: disolver 50 g de hemina en 1 ml de hidróxido de sodio (NaOH) 1 N, añadir 100 ml de agua destilada. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Solución madre de menadiona o vitamina K₁ : mezclar 100 mg de menadiona y 20 ml de alcohol etílico de 95°. Esterilizar por filtración.

SOLUCION DE TRABAJO: Añadir 1 ml de solución estéril de menadiona a 100 ml de solución estéril de hemina.

NOTA: Guardar en frasco obscuro durante seis meses como máximo.

Se emplea 1 ml por cada 100 ml de medio.

REFERENCIAS.

- ¹. Schluger S, Youdells R A y Page R C. *Enfermedad periodontal: Fenómenos básicos, manejo clínico e interrelaciones oclusales y restauradoras*. México: Editorial Continental, 1981: 22-41, 74-86.
- ². Barrios M G. *Odontología: su fundamento biológico*. Bogotá: Ediciones Studio Books, 1991. Tomo I, II, III y IV.
- ³. Klaus H, Rateitschark E M y Wolf H F. *Atlas de periodoncia*. 2ª ed. Barcelona: Salvat editores, 1991; 11-32.
- ⁴. Shafer G W, Hine Maynard K y Levy Barnett M. *Tratado de patología bucal*. 3a ed. México: Nueva Editorial Interamericana, 1977: 706-730.
- ⁵. Major M A y Ward M L. *Oral pathology*. 6th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992.
- ⁶. Genco J R, Goldman H M y Cohen W D. *Periodoncia*. México: Interamericana/Mc Graw Hill, 1993: 4, 5, 9, 17, 33.
- ⁷. Ross P W, Holbrook W P. *Microbiología bucal y clínica*. México: Editorial Científica, 1985: 6
- ⁸. Volk W A, Benjamin D C, Kadner R J y col. *Microbiología médica*. 3a ed. México: Editorial Interamericana/ McGraw Hill, 1988: 124-155.
- ⁹. Nolte W A. *Microbiología odontológica*. 4a ed. México: Interamericana, 1986: 3-44.
- ¹⁰. Koneman E W y col. *Diagnóstico microbiológico*. 6a ed. Buenos Aires: Editorial Médico Panamericana, 1983: 313.

11. Bailey-Scott. Diagnóstico microbiológico. 6a ed. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana, 1983: 461-476.
12. Davis B D. Tratado de microbiología. 2a ed. Barcelona: Salvat Editores, 1978.
13. Jawetz E. Microbiología medica. 12a ed. México: El Manual Moderno, 1987: 283.
14. William A Gregory, M S Ann Arbor and Mich. Microbiology of the mouth. JADA, July 1992: 123.
15. Halm Tai and Mei Rosenberg. Estimation of dental plaque levels and gingival inflammation using a simple oral rinse technique. J Periodontol, Jun 1990; 61 (6): 339-342.
16. Katz S, McDonald J L y Stookey G K. Odontología preventiva en acción. 3a ed. México: Editorial Medico Panamericana, 1983: 9-21.
17. Carranza F A. Periodontología clínica de Glickman. 6a ed. México: Editorial Interamericana, 1986: 95-103.
18. Depaola L G, Overholser D and Meiller Timothy. Chemoterapeutic inhibition of supragingival dental plaque and gingivitis development. J Clin Periodont 1989: 311-315.
19. Anerud A, LÖe H, Boysen H & Smith H C. The natural history of periodontal disease in man changes in gingival health and oral hygiene before 40 years of age. J Periodont Res 1979: 14: 526-540.
20. John F Pichard. Enfermedad periodontal avanzada, tratamiento quirúrgico y protésico. Barcelona: Editorial Labor, 1970: 124-25.
21. L. M Silverstone, N W. Johnson, J M Hardie, R A D Williams. Caries dental: Etiología, patología y prevención. México: Manual Moderno, 1985: 63-92

- ²². Leshner R J, Gerencser M A and Gerencser V F. Morphological, biochemical and serological characterization of *Rothia dentocariosa*. *Int J System Bacteriol* 1974; 24: 154.
- ²³. Lenette E H, Balows, Hausler, Truant. *Microbiología clínica*. 3a ed. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana, 1982: 529.
- ²⁴. R J Leshner, V F Gerencser and D J Morrison. Presence of *Rothia dentocariosa* strain 447 serotype 2 in gingiva of patients with inflammatory periodontal disease. *J Dent Res* Feb 1977; 56 (2): 189.
- ²⁵. Georg L K and Brown J M. *Rothia*, gen, nov, an aerobic genus of the family Actinomycetaceae. *Int J System Bacteriol* 1967; 17: 79.
- ²⁶. J L Ebersole, M A Taubman, D J Smith et al. Human immune response to oral microorganisms: Patterns of systemic antibody levels to *Bacteroides* species infection and immunity. *Feb 1986*; 51 (2): 507-513.
- ²⁷. W E C Moore, L V Holdeman, R M Smibert et al. Bacteriology of severe periodontitis in young adult humans. *Infection and immunity*. Dec 1982; 38 (3): 1137-1148.
- ²⁸. Hiroshi Takeuchi, Michio Sumitani, Kumio Tsubakimoto et al. Oral microorganisms in the gingiva of individuals with periodontal disease. *J Dent Res* 1974; 53 (1): 132-136.
- ²⁹. Van Houte, H V Jordan, R Laraway et al. Association of the microbial flora of dental plaque and saliva with human root-surface caries. *J dent Res* August 1990; 69 (8): 1463-1468.
- ³⁰. Schuger Saúl. *El periodonto normal, enfermedad periodontal*. 3a ed. Mexico: Editorial Continental, 1984.

- ³¹. E E Golub, M Thaler, C Davis and D Malamud. Bacterial aggregation activity in human saliva: Simultaneous determination of free and bound cells. *Infection and Immunity*, Dec 1979; 26 (3): 1028-1034.
- ³². Kenneth T Miyasaki, Amy L Bodeau, Tomas Ganz, Michael E Seisted and Robert I Lehrer. In vitro sensitivity of oral, gram-negative, facultative bacteria to the bactericidal activity of human neutrophil defensins. *Infection and Immunity* Dec 1990; 55 (12). 3934-3940.
- ³³. Acosta Gro A E. Secretory immune response in the oral cavity. *Pract odontol* Sep 1990; 11(9): 29, 30, 32, 33.
- ³⁴. Ebersole J C. Sistemic humoral immune responses in periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 1990; 1(4): 283-331.
- ³⁵. Schenkein H A. The role of complement in periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med* 1991; 2(1): 65-81.
- ³⁶. Leone C W et al. Host responses in the etiology and pathogenesis of periodontal disease. *Curr Opin Dent* Feb 1991; 1(1): 29-36.
- ³⁷. Holmberg K and Killander J. Quantitative determination of immunoglobulins (IgG, IgA and IgM) and identification of IgA-type in the gingival fluid. *J Periodontol Res* 1971; 6: 1.
- ³⁸. WHO/DPS. Epidemiology, etiology and prevention of periodontal diseases. Technical report 1978: Serie No 621.
- ³⁹. Grani A D, Stern I B y Everett F G. *Periodoncia de Orban, teoria y practica*. 4a ed. México: Interamericana, 1975: 85-91.
- ⁴⁰. Boletín editado por la dirección general de epidemiología de la Secretaría de Salubridad y Asistencia. 15 de marzo de 1981.

- ⁴¹. Maksimouskii V M et al. The assessment of the immune status of patients with acute and exacerbated chronic periodontitis. *Stomatología (Mosk)* Mar-Apr 1991; (2): 26-29.
- ⁴². M I Krichevsky et al. Draft results of a workshop to develop guidelines for studies involving microbial incidence or populations in the oral cavity. *J Dent Res* March 1991; 70: (3): 226-232.
- ⁴³. Livingston S J, S D Kominos and R B Yee. New medium for selection and presumptive identification of the *Bacteroides fragilis* group. *J Clin Microbiol* 1978; 7: 448-453.
- ⁴⁴. Abraham M Lilienfeld y David E Lilienfeld. *Fundamentos de epidemiología*. U S A: Fondo Educativo Interamericano, 1983: 1-18.
- ⁴⁵. Prichard John F. *Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad periodontal en la práctica odontológica general*. Argentina: Medica Panamericana, 1982: 21-35.
- ⁴⁶. Lindhe J. *Periodontología clínica*. 2a ed. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana, 1989: 122-143.
- ⁴⁷. Daniels Irving B F and Sterno Everett G G. *Periodontics*. 5th ed. The C U Mosby Company, 1979.
- ⁴⁸. Edward V Z, Austin H K y George A H. *Diagnostico en patología oral*. 2a ed. Barcelona: Salvat Editores S A, 1982: 126-131.
- ⁴⁹. Adam Ertel, Robert Eng M D and Sharon M Smith. The differential effect of cigarette smoke on the growth of bacteria found in humans. *Chest* September 1991; 100 (3): 628-630.
- ⁵⁰. Ainamo J, Barmes D, Beagrie G, Cutress T et al. Development of the world health organization (WHO) community periodontal index of treatment needs (CPITN). *International Dent J* 1982; 32: 281-291.

- ⁵¹. OMS. Métodos y programas de prevención de las enfermedades bucodentales. Ginebra: Serie de Informes técnicos 713, 1984: 7-51.
- ⁵². Campbell D, Garvey J S, Cremer N E & Sussdorf D. Methods in Immunology. 2nd ed. Antibody-mediated effects on the periodontium. J Periodontol 1974; 45 (part II): 330-337.
- ⁵³. Baruj Benacerraf, Emil R U, Traducido por Balseiro G. Inmunología. 2a ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1989.
- ⁵⁴. B F Mackler, K B Frostad, P B Robertson and B M Levy. Immunoglobulin Bearing Lymphocytes and plasma cells in human periodontal disease. J Periodontal Res 1977; 12: 37-45.
- ⁵⁵. Thomas A Brown and Jiri Mestecky. Immunoglobulin A subclass distribution of naturally occurring salivary antibodies to microbial antigens. Inf Immun Aug 1985; 49 (2): 459-462.
- ⁵⁶. Kenneth T M y Asaki. The neutrophil: mechanisms of controlling periodontal bacteria. J Periodontol Dec 1991; 62 (12): 761-774.
- ⁵⁷. Tomohiko Ogawa, Andrej Tarkowski et al. Analysis of human IgG and IgA subclass antibody-secreting cell from localized chronic inflammatory tissue. J Immunol, Feb 1989; 142: 1150-1159.
- ⁵⁸. T R Bowry. Immunology Simplified. Oxford: Oxford University Press, 1977.
- ⁵⁹. Rose N R. El laboratorio en inmunología clínica. 2a ed. Buenos Aires: Editorial Panamericana, 1984: 414-426.
- ⁶⁰. Margini R A. Inmunología e Inmunoquímica: fundamentos. 4a ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana, 1989: 29-42.

- ⁵¹. OMS. Métodos y programas de prevención de las enfermedades bucodentales. Ginebra: Serie de informes técnicos 713, 1984: 7-51.
- ⁵². Campbell D, Garvey J S, Cremer N E & Sussdorf D. Methods in Immunology. 2nd ed. Antibody-mediated effects on the periodontium. J Periodontol 1974; 45 (part II): 330-337.
- ⁵³. Baruj Benacerraf, Emil R U, Tr por Balseiro G. Inmunología. 2a ed. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana, 1989.
- ⁵⁴. B F Mackler, K B Frostad, P B Robertson and B M Levy. Immunoglobulin Bearing Lymphocytes and plasma cells in human periodontal disease. J Periodontal Res 1977; 12: 37-45.
- ⁵⁵. Thomas A Brown and Jiri Mestecky. Immunoglobulin A subclass distribution of naturally occurring salivary antibodies to microbial antigens. Inf Immun Aug 1985; 49 (2): 459-462.
- ⁵⁶. Kenneth T M y Asaki. The neutrophil: mechanisms of controlling periodontal bacteria. J Periodontol Dec 1991; 62 (12): 761-774.
- ⁵⁷. Tomohiko Ogawa, Andrej Tarkowski et al. Analysis of human IgG and IgA subclass antibody-secreting cell from localized chronic inflammatory tissue. J Immunol, Feb 1989; 142: 1150-1158.
- ⁵⁸. T R Bowry. Immunology Simplified. Oxford: Oxford University Press, 1977.
- ⁵⁹. Rose N R. El laboratorio en inmunología clínica. 2a ed. Buenos Aires: Editorial Panamericana, 1984: 414-426.
- ⁶⁰. Margini R A. Inmunología e Inmunoquímica: fundamentos. 4a ed. Argentina: Editorial Medica Panamericana, 1989: 29-42.

- ⁶¹. Stites O P, Stobo J D, Wells J V. *Inmunología básica y clínica*. 6a ed. México: Editorial El Manual Moderno, 1986.
- ⁶². Clark W R. *The experimental foundations of modern immunology*. 4th ed. Singapore: Ed John Wiley & Sons Inc, 1991.
- ⁶³. Wear D M. *Handbook of experimental immunology*. 4th ed. 4 vols: Blackwell Scientific Publications, 1986.
- ⁶⁴. *Revista ADM*. Vol XLIX, may-jun 1992: Num 6: 332-336.
- ⁶⁵. *Revista ADM*. Vol XLIX, may-jun 1992: Num 3: 175-181.
- ⁶⁶. MacFaddin Jean F. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. México: Medica Panamericana, 1990: 27-60.
- ⁶⁷. Bustamante Y D. *Manual de prácticas de inmunología*. México: Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas I P N, 1975.
- ⁶⁸. Bowden G et al. The stability of outer-membrane protein and antigen profiles of a strain of *Bacteroides intermedius* grown in continuous culture at different pH and growth rates. *Can J Microbiol* May 1991; 37 (5): 368-76.
- ⁶⁹. Serpico R et al. Changes in the strenght of immune defense of the oral cavity in aging. *Arch Stomatol (Napoli)* Oct-Nov 1990; 31(4): 635-48.
- ⁷⁰. Burnett G W, *Microbiología oral y enfermedades infecciosas*. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana, 1982: 185-186.
- ⁷¹. H Nagata, Y Murakami, E Inoshita, S Shizukuishi and A Tsunemitsu. Inhibitory effect of human plasma and saliva on co-aggregation between *Bacteroides gingivalis* and *Streptococcus mitis*. *J Dent Res* August 1990; 69 (8): 1476-1479.

- ⁷². Kent D J Smith, K Joshipura, P Soparkar and M A Taubman. Humoral IgA antibodies to oral microbiota in a population at risk for root-surface caries. *J Dent Res*, July 1992; 71 (7): 1399-1407.
- ⁷³ 46. K Holmberg and H O Hallander. Numerical taxonomy and laboratory identification of *Bacterionema matruchotii*, *Rothia dentocariosa*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces viscosus* and some related bacteria. *J Gen Microbiol*, 1973; 76: 43-63.
- ⁷⁴ 39. R Jonsson, A Pitts, C Luo, S Gay and J Mestecky. Immunoglobulin isotype distribution of locally produced autoantibodies to collagen type I in adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 1991; 18: 703-707.
- ⁷⁵ . B Frank Polk and Dennis L Kasper. *Bacteroides fragilis* subspecies in clinical isolates. *Annals of Internal Medicine*, May 1977; 86 (5): 569-571.
- ⁷⁶ . Slots J, Reynolds H S and Genco R J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. *Infect Immun* Sep 1980; 29 (3): 1013-1020.
- ⁷⁷ . Magnusson D K, Wintraub A, Pohlman T H and Maier R V. Human endothelial cell adhesiveness for neutrophils, induced by *Escherichia coli* lipopolysaccharide in vitro, is inhibited by *Bacteroides fragilis* lipopolysaccharide. *J Immunol* Nov 1989; 143 (9): 3025-3030.