



10
247

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

CORRELACION DEL TITULO DE ANTICUERPOS DE
TIPO IgA SECRETORA EN SALIVA CONTRA
ANTIGENOS DE CEPAS CARIOTOMICAS Y EL INDICE
CPO EN ADOLESCENTES. POR EL METODO DE ELISA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLÓGICO
P R E S E N T A:
YOLANDA FLORES CABRERA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1991



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 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.

C O N T E N I D O

INTRODUCCION	1
I FLORA MICROBIANA ORAL	2
II CAVIDAD ORAL	6
III COLONIZACION BACTERIANA	7
IV CARIES	10
V RESPUESTA INMUNE ORAL	12
VI I _g A ESTRUCTURA Y FUNCION	14
VII FUNDAMENTOS DEL METODO DE ELISA	19
FUNDAMENTACION DEL TEMA	27
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
OBJETIVOS	30
HIPOTESIS	30
METODOLOGIA	31
MATERIAL Y METODOS	34
RESULTADOS	66
ANALISIS DE RESULTADOS	79
CONCLUSIONES	83
BIBLIOGRAFIA	85

I N T R O D U C C I O N .

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 hábito protector.

La colonización de los dientes da como resultado la formación de la placa dental, que es una capa de bacterias en las superficies rotas de los dientes. Los microorganismos que colonizan las superficies dentarias pueden causar caries dental, que es una enfermedad infecciosa y transmisible caracterizada por la destrucción progresiva localizada de los dientes, predominantemente sus coronas. Se inicia por la desmineralización de la superficie externa del esmalte, por ácidos orgánicos producidos localmente por bacterias que fermentan los hidratos de carbono de la dieta.

Desde el momento de su erupción la mayor parte de la corona dental esta expuesta a la saliva y recibe la acción protectora de las inmunoglobulinas, sintetizadas por las células plasmáticas asociadas a las glándulas salivales. La inmunoglobulina predominante en la saliva es la IgA secretora (IgAs) y su cuantificación e identificación puede hacerse por métodos inmunoenzimáticos.

Los métodos inmunoenzimáticos son procedimientos inmunológicos en los que la reacción antígeno-anticuerpo es seguida por cuantificación de la actividad enzimática.

I FLORA MICROBIANA ORAL.

La flora microbiana del cuerpo puede catalogarse en:

- 1) Flora residente, también llamada normal o nativa.
- 2) Flora transitoria.
- 3) Flora normal suplementaria.

La flora residente está constituida por microorganismos que se encuentran constantemente en ciertas áreas del cuerpo en cada edad y que si se altera se restablecen por si mismos, su localización en sitios definitivos depende de condiciones nutricionales y fisiológicas como temperatura, humedad, tensión de oxígeno y la presencia o ausencia de sustancias inhibitorias.

La flora transitoria son microorganismos que pululan en el huésped, particularmente en la piel y membranas mucosas durante corto tiempo, provienen del ambiente y no es necesariamente patogena, no se establece en forma permanente.

La flora normal suplementaria representa los microorganismos que pueden identificarse solo en algunos individuos que los albergan en escaso número, pero durante mucho tiempo.

Si la flora residente se altera la transitoria puede incrementarse y causar enfermedad (1). Las relaciones cualitativas y cuantitativas de los microorganismos bucales cambian al aparecer la dentición, la pérdida total o parcial de los dientes, dentaduras postizas, el tipo de dieta, los hábitos de higiene bucal y el estado de salud o enfermedad.

La población de la microflora bucal se encuentra limitada por la acción de arrastre de la saliva, los mecanismos de masticación,

la acción de la lengua, los labios y las membranas mucosas de los carrillos; observándose que las cuentas bacterianas son mayores al levantarse en la mañana. Como resultado del desayuno, el cepillado de dientes y el enjuague de la boca las cantidades de microorganismos disminuyen, encontrándose un incremento gradual, que decrece después de ingerir alimentos e higiene bucal (1,3,4).

FLORA RESIDENTE EN EL HOMBRE.

Streptococcus viridans	1
Streptococcus anhemoliticus	2
Streptococcus anaerobicos	2
<u>Staphylococcus epidermidis</u>	2
<u>Staphylococcus aureus</u>	2
Corynebacterium spp	1
Lactobacillus	2
Actinomyces	2
Bacteroides	2
Fusobacterium	2
Vibriones anaerobicos	2
Veillonella	1
Mycoplasma	2
Levaduras	2
Protozoarios	2

1 Generalmente presentes y constituyendo la parte principal de la flora microbiana nativa.

2 Generalmente presentes, constituyendo solo una fracción menor de la flora microbiana residente (2).

Características generales de microorganismos de la cavidad bucal.

Bacterias Grampositivas.

Familia Streptococcaceae.- Celulas esfericas u ovoides, en pares o cadenas, inmóviles, facultativamente anaerobias, metabolismo fermentativo, requerimientos nutricionales complejos.

Genero Streptococcus.- Homofermentos, catalasa negativa.

Familia Lactobacillaceae.- Bastones unicos o en cadena, requerimientos nutricionales complejos.

Genero Lactobacillus.- Catalasa negativa, citocromo negativo, anaerobio o facultativo, fermentacion homoláctica.

Familia Actinomytaceae.- Inmóviles, no acido resistentes, de forma difteroide, tienden a producir filamentos ramificados.

Genero Actinomyces.- Anaerobios o facultativamente anaerobios, catalasa (+), los principales productos de fermentación son: acido acetico, fórmico, láctico y succinico, no producen gas.

Genero Arachnia.- Facultativamente anaerobios, catalasa negativa, los principales productos de fermentacion son: acido propionico, acido acetico y dióxido de carbono.

Genero Rothia.- Cocoides, difteroides o filamentos, aerobios, catalasa positiva.

Bacterias Gramnegativas.

Familia Bacteroidaceae.- Bastones anaerobios obligados, no esporulados.

Genero Bacteroides.- Los productos de fermentación incluyen: ácido succinico, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico y ácido propiónico.

I I C A V I D A D O R A L .

Anatómicamente.- Es una cavidad en la parte inferior de la cara, donde se efectúan la masticación y la insalivación de los alimentos. Tiene forma de óvalo y está dividida por los dientes y las encías en dos regiones, una anterior y lateral, el vestíbulo bucal, y otra posterior, la cavidad bucal propiamente dicha (6).

El epitelio escamoso estratificado de la mucosa de la cavidad bucal forma una superficie que protege a los tejidos subyacentes y funciona como una barrera mecánica, que puede descamarse (7).

La cavidad oral habitualmente es estéril en el momento del nacimiento; la boca del niño puede estar contaminada por distintos tipos de microorganismos, provenientes de la flora de la vagina de la madre y después del medio ambiente local del mundo externo (8). La cavidad oral tiene una temperatura entre 35 y 35 °C y abundante humedad, además es rica en nutrientes y variadas tensiones de oxígeno, proporcionando un ambiente ideal para el crecimiento de bacterias aerobias, facultativas y anaerobias.

La saliva es la fuente principal de oxígeno en la cavidad bucal, facilita la utilización de hidratos de carbono y da lugar a una acción amortiguadora; está compuesta de secreciones de glándulas salivales, microorganismos sus enzimas y productos metabólicos, células epiteliales leucocitos, inmunoglobulinas y enzimas tisulares, secreciones de la mucosa, líquidos gingivales y quizá restos de alimentos los cuales pueden ser descompuestos por enzimas elaboradas por las bacterias que colonizan la boca (1,7).

I I I C O L O N I Z A C I O N B A C T E R I A N A .

Dentro de la cavidad oral, la biomasa bacteriana se duplica solo dos a cuatro veces en el día, insuficiente para que se mantengan así mismas en las secreciones orales.

Para que los microorganismos puedan colonizar deben adherirse firmemente a la superficie o encontrar un ambiente protector.

La colonización bacteriana puede considerarse de dos tipos:

Primaria y secundaria.

En la colonización primaria, los colonizadores sobreviven ante las diversas condiciones presentes en el ambiente, proporcionando los sustratos y microambientes necesarios para la colonización de microorganismos secundarios (1,9).

Las bacterias primarias utilizan oxígeno pudiendo agotarlo de ese microambiente, favoreciendo la aparición de anaerobios.

La comunidad de microorganismos secundarios utilizan los sustratos generados dentro del mismo sistema ecológico, en tanto que los miembros de la comunidad primaria toman los sustratos proporcionados por el ambiente del huésped; dando lugar a una aparición secuencial de los microorganismos: los que primero se observan son los cocos, seguidos por fusobacterias, filamentos y finalmente, por anaerobios estrictos como espiroquetas.

En la cavidad bucal, las áreas con diferentes ambientes físicoquímicos 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 (1,9).

PORCENTAJES DE MICROORGANISMOS CULTIVABLES, SEPARADOS DE VARIAS
AREAS DE LA CAVIDAD ORAL (10,11).

Organismos o grupo	lengua	placa	saliva	hendidura gingival
Estreptococos (total)	40-50	20-30	40-50	20-30
<u>S. mitis</u>			(*)	(**)
<u>S. salivarius</u>	*		(*)	
<u>S. mutans</u>		(*)		
<u>S. sanguis</u>		(**)		
Enterococos				(**)
Diphtheroides	12-15	18-20	5	15-25
Bacteroides	5	6-8	5	15-18
Fusobacteria	1	4-5	2-3	3-5
Corynebacteria	4	-	10-12	15-18
Veillonella	14-16	12-14	14-16	10-12
Peptococcus	4-5	10-12	10-12	8-9
Neisseria	2-3	1-3	1-2	1
Espiroquetas	-	-	-	1-3
Actinomyces	1-2	30-35	1-2	6-10
vibrio	2	2	1	1-3

* unica especie presente

(**) especies presentes (no se determinó el porcentaje individual)

La colonización de los dientes da como resultado la formación de la placa dental.

La placa dental es una capa de bacterias en las superficies

rotas, de los dientes, tiene la misma estructura que un tejido; contiene células, una matriz extracelular y un líquido propio (12) Las bacterias son partículas coloidales con cargas superficiales predominantemente negativas. Cuando estas cargas se reducen en condiciones de un pH ácido y concentraciones elevadas de calcio y polímeros de carga negativa, las bacterias tienden a agregarse. Las diferencias de composición de la superficie bacteriana pueden causar variaciones de carga y de la capacidad de participar en el fenómeno de agregación y de adherencia.

Los polímeros bacterianos (polisacáridos extracelulares) y salivales (mucina) forman enlaces entre las bacterias, dando lugar a estructuras porosas, entre las cuales los líquidos fluyen libremente.

El calcio interfiere en la capacidad de las bacterias para adherirse a los dientes y combinarse con la película o interactuar con la placa.

Debido a la gran variedad de pH (de 4 hasta 9) que se dan en la boca, cierto pH favorecerá la agregación de una variedad de bacterias, otro pH determinará la agregación de otra variedad de bacterias.

Los microorganismos llegan a la boca fácilmente del agua, aire, alimentos y de las manos; los que tienen la capacidad de unirse a las superficies bucales permanecen; los que no pueden adherirse son tragados y desaparecen de la cavidad bucal, este proceso asegura que la flora residente se mantenga, a menos que intervengan otros factores que impidan la reimplantación (1,4,7).

I V C A R I E S .

La caries dental es una enfermedad infecciosa y trasmisible (14) causada por bacterias que colonizan la superficie dentaria, caracterizada por una serie de reacciones quimicas complejas, que originan la destrucción del esmalte y posteriormente si no se detiene la destruccion de toda la estructura dentaria.

La lesion se inicia cuando, mediante el metabolismo de carbohidratos, los microorganismos producen y liberan ácidos orgánicos que promueven la desmineralización del esmalte (15).

Clinicamente, la caries dental se inicia como una mancha lechosa a parduzca, que mas tarde se torna rugosa y se producen pequeñas erosiones hasta que se forma la cavidad de caries propiamente dicha.

Biologicamente, es una enfermedad bacteriana de los tejidos dentales duros, se presenta en las fosas o depresiones de los dientes y las fisuras; en estas zonas que no reciben una limpieza total de la saliva, lengua y musculatura bucal, se almacenan partículas de alimento, bacterias, proteínas salivales y otros depósitos bucales. Estos depositos de bacterias y proteínas que tienen propiedades adhesivas son llamadas placa dental(1,4,20).

Los microorganismos en el borde de la lesión de caries son esféricos y gram positivos, los que están en la porción restante de la region son heterogeneos. Los microorganismos esfericos son reemplazados por bacterias filamentosas gram positivas y gram negativas.

Streptococcus mutans es un agente etiologico importante en la

caries del esmalte por su actividad acidogena (16,21), *Lactobacillus* desempeña un importante papel secundario en el proceso cariogenico, por ser acidogeno y acidurico; ya que se ha demostrado que las cantidades de *S. mutans* aumentaban, junto con los lactobacilos; antes de la iniciación de las lesiones cariosas, y que no se producian caries en sitios donde *S. mutans* estaba ausente (13).

La caries es la mas frecuente de las enfermedades cronicas de la raza humana, afecta a ambos sexos, de todas las razas y extractos socioeconómicos.

En el proceso de producción de la caries se ven involucrados varios factores indispensables: un diente susceptible a la desmineralización ácida, se relaciona con un bajo contenido en fluor e irregularidades en la superficie dental, que atrapan alimentos y placas, microorganismos y el sustrato proporcionado principalmente por restos de comida (1,17).

Los causantes pueden ser algunos integrantes de la familia *Lactobacteriaceae*, especialmente lactobacilos y estreptococos, por su tendencia a producir dextranas a partir de azucares lo que origina la elaboracion de ácidos (1,10,18) y ciertos hongos de la familia de los actinomicetos (18,19).

V RESPUESTA INMUNE ORAL.

El individuo tiene la capacidad de defenderse de los agentes nocivos que encuentra en su medio ambiente, mediante mecanismos de defensa específicos e inespecíficos.

Los mecanismos de defensa inespecíficos no requieren exposición previa y son efectivos contra muchos microorganismos diferentes.

Dentro de estos mecanismos se encuentran:

- Integridad de la mucosa oral (funciona como barrera mecánica)
- Epitelio escamoso estratificado: tiene la capacidad para descamarse y eliminar células epiteliales.
- Fluido gingival
- Fagocitosis
- Constitución del diente
- Saliva (Flujo salival que permite el arrastre de bacterias.

(Composición de la saliva (complemento, lisozima, lactoferrina, leucocitos, etc.) que permite un efecto bactericida y actividad inhibitoria sobre muchos microorganismos patógenos y no patógenos (1,7).

Además la saliva neutraliza y diluye los ácidos que forman las bacterias de la placa dental a partir de los carbohidratos de la dieta y ejerce una acción protectora por su capacidad para remineralizar el esmalte dental (el mineral del esmalte es capaz de un intercambio iónico activo, principalmente de calcio y fosfato) (13).

En la saliva se encuentran IgA, IgG y en menor cantidad IgM, la fuente principal de IgG e IgM es el líquido gingival (27,28).

Los mecanismos específicos requieren exposición a un microorganismo particular y la respuesta se limita a ese organismo (29).

Los antígenos ingeridos o inhalados o sus fragmentos, penetran a través de células que recubren la mucosa oral, respiratoria y el tubo digestivo a nivel de los acumulos linfáticos. Estas células tienen gran capacidad fagocítica, no presentan vellocidades, tienen gran cantidad de vacuolas y se denominan células M.

Esta estimulación antigénica puede inducir la proliferación y diferenciación de células B y T y la migración de estos linfocitos sensibilizados hacia los tejidos secretorios como las glándulas salivales, en donde las células B se diferencian, proliferan y maduran espontáneamente en células plasmáticas, que son linfocitos grandes productores de anticuerpos. En ausencia del estímulo antigénico las células plasmáticas están presentes en forma transitoria. Si hay una estimulación antigénica local continua, ocurre proliferación de las células y la respuesta de anticuerpos secretores es mayor y más persistente (24,26,30,31).

El sistema inmune es el responsable de mantener la integridad de las estructuras orgánicas ante la gran diversidad de agresores (agentes extraños) que existen en el medio ambiente.

Dentro de la cavidad oral existen dos sistemas complejos interrelacionados entre sí. Un sistema que destruye antígenos que penetran en los líquidos y tejidos corporales y otro, el sistema IgA secretor, cuya función es evitar el ingreso de antígeno a través de las mucosas (24).

V I IgA ESTRUCTURA Y FUNCION.

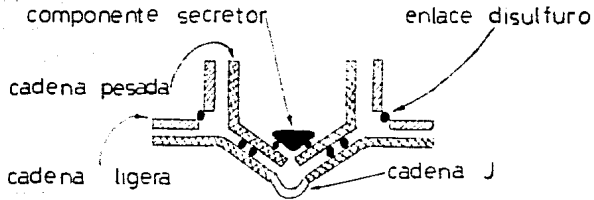
Las superficies mucosas están en continuidad directa con el ambiente y son el principal sitio de exposición a los antígenos. El sistema inmune secretor de las mucosas está encargado de evitar el ingreso de antígeno a través de las mucosas. un antígeno puede desencadenar la producción de anticuerpos de diferentes tipos (IgG, IgA, IgM, IgE e IgD), los cuales tendrán actividades biológicas distintas (32,33).

Los anticuerpos son proteínas especializadas llamadas inmunoglobulinas, que pueden reaccionar específicamente con el antígeno.

La estructura básica de una inmunoglobulina, consiste en la unión de dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas por medio de enlaces disulfuro. Existe un tipo químicamente diferente de cadena pesada para cada una de las cinco clases de inmunoglobulinas (γ , μ , α , δ e ϵ). Cada cadena de inmunoglobulina consta de una porción terminal carboxilo constante que tiene la misma secuencia de aminoácidos y una porción terminal amino variable, donde la secuencia de aminoácidos es diferente para cada anticuerpo y constituye el lugar de reacción con el antígeno (34).

La IgA es producida en concentraciones elevadas por los tejidos linfoides que revisten las vias digestivas, respiratoria y genitourinaria; es probable que los linfocitos se originen en el tejido linfoide asociado al intestino y que estas celulas emigren a los organos secretorios y por ultimo den origen a las celulas plasmaticas de la lamina propia que secretan IgA. En estas secreciones (lagrimas, bilis, orina, caudostro, saliva, etc.) alcanza grandes concentraciones y se conoce como IgA secretoria (IgAs) (33,36,41) (Fig 1).

La IgAs es una molecula compleja formada por un dimer de IgA, una molecula de la cadena J (glucopéptido que esta ligado por enlaces disulfuro a la IgA y a la IgM polimericas, esta cadena funciona in vivo induciendo la polimerizacion, confiere a la IgA e IgM la capacidad para que se una al componente secretorio) y una molecula de componente secretorio (sc) sintetizado por las celulas epiteliales, que le confiere resistencia a la proteolisis por las enzimas del tubo digestivo, apenas es necesario para el transporte activo de la IgA (22,24,33,37,38,43), puede encontrarse en forma libre en las secreciones (42) (Fig 2).



IgA SECRETORIA
Fig. 1

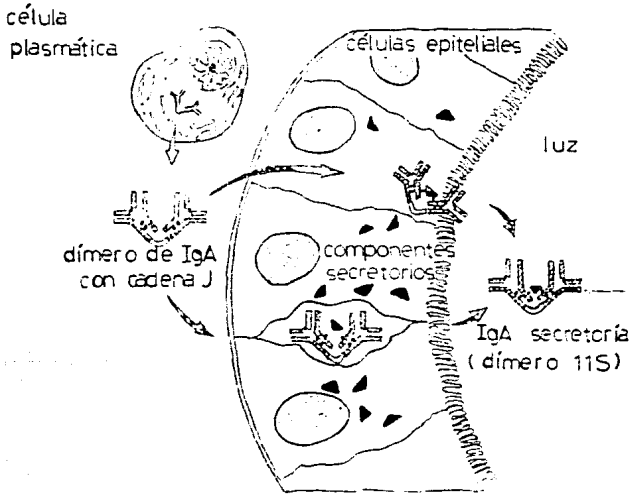


Fig. 2

La molecula entera tiene un coeficiente de sedimentación de 11S y un peso molecular de 385 000. En las secreciones externas la IgA aparece principalmente como un dimeró, pero también están presentes cantidades pequeñas de IgA 7S y polimeros más altos(39)

Algunas propiedades físicas y biológicas de la IgA humana (34,40)

%de las Ig totales	5-10
Concentración (mg/ml de suero)	2.8
Peso molecular	150 000 a 170 000
S (coef. de sedim.)	7-11S
Glúcidos (%)	5-10
Resistencia al SH	Mediana
Número de subclases	2
Formulas moleculares	
Denominación de la cadena pesada	
Supervivencia media T/2 (Días)	6
Aparición despues de inmunización	Intermedia
Transferecia placentaria	-
Actividad reaginica	-
Receptores en	linfocitos, monocitos
Función biológica	Anticuerpo secretorio via properdina
Peso molecular (calostro)	385 000
S (Coef. de sedim.)	11.5S
Coeficiente de difusión	2.66

Funciones de la IgA secretora.

- Actividad antiviral. El papel protector se debe a su actividad neutralizante.
- Actividad antitoxina. En patogenos que producen exotoxinas secretantes.
- Actividad antibacteriana. El mecanismo basico de protección es por inhibición de la adherencia de las bacterias a las superficies mucosas por la IgAs, quien se fija a glucoproteinas que permiten a la bacteria unirse a las células epiteliales, de modo que inhibe la adherencia y la colonización bacteriana.
- Inhibición de la absorción de antígenos no viables, por la mucosa gastrointestinal. Los adultos de muchas especies de mamíferos absorben cantidades pequeñas, pero significativas, de antígenos macromoleculares a través de las células epiteliales de las mucosas. Se ha postulado que, la disminución de la absorción esta mediada por anticuerpos secretores, protegiendo al organismo, mediante la formación de complejos no absorbibles que serian degradados por enzimas proteolíticas sobre la superficie del intestino; evitando reacciones de hipersensibilidad. Aun no se sabe si operan mecanismos similares en la absorción de antígenos inhalados a través de la mucosa respiratoria, pero hay datos iniciales de que este puede ser el caso (22,24,33).

VII FUNDAMENTOS DEL METODO DE ELISA.

Los inmuncensayos son técnicas para la detección y cuantificación de antígenos y anticuerpos; además de la elevada sensibilidad que caracteriza a las pruebas inmunológicas, es la elevada especificidad de la reacción entre el antígeno y el anticuerpo lo que constituye la base de su excelente aplicabilidad.

Los Ensayoinmunoenzimaticos emplean enzimas como sustancias marcadoras y pueden ser definidos como procedimientos inmunologicamente cuantitativos, en el cual la reacción antígeno anticuerpo es monitoreada por cuantificación de la actividad de la enzima (44). A la reacción inmunológica debe seguir una reacción indicadora, para que la actividad enzimática que está fijada al complejo antígeno-anticuerpo, pueda ser determinada fotométricamente.

Los Ensayoinmunoenzimaticos pueden ser de dos tipos: Homógeno (EMIT=enzyme-linked immuncassay technique) y el ensayo Heterógeno (ELISA=enzyme-linked immunosorbent assay); en los primeros una enzima es acoplada a un antígeno que al reaccionar con el anticuerpo hace que se altere la actividad enzimática. se basa probablemente en una inhibición en el espacio de la entrada del sustrato al conjugado antígeno-enzima durante la formación del complejo antígeno-anticuerpo (la reacción de comprobación se mide en comparación con el conjugado libre antígeno-enzima).

Ventaja: no requiere de una fase sólida para la separación de reactivos que no reaccionaron, pero la desventaja es que funciona únicamente para sustancias de bajo peso molecular como drogas.

Principio del metodo de ELISA.

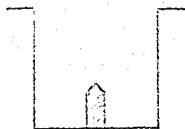
En los ensayos inmunoenzimaticos heterogeneos (ELISA), siempre se realiza una separacion del inmunocomplejo del material no fijado, despues de la inmunoreaccion. Con este procedimiento se consigue eliminar todos los componentes que podrian interferir.

Existen diferentes metodos para determinar ya sea el antigeno o el anticuerpo (45,46,47).

Metodo indirecto.- Es un sistema utilizado para la determinacion y cuantificacion de anticuerpo, ya que el conjugado utilizado (antifinmuglobulina marcada con la enzima, puede reconocer gran numero de anticuerpos, los cuales pueden estar dirigidos contra una gran cantidad de antigeno (Fig 3).

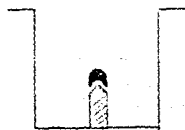
Fig.3 EL METODO INDIRECTO PARA ENSAYOS DE ANTICUERPO.

1. Antígeno absorbido a la placa



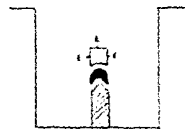
lavado

2. Adicionar suero: cualquier anticuerpo específico ataca al antígeno



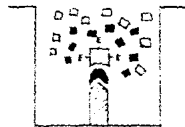
lavado

3. Adicionar la enzima ligada a la anticuerpina la cual ataca a el anticuerpo



lavado

4. Adición de sustrato



la cantidad hidrolizada \approx la cantidad presente de anticuerpo

Metodo de inhibición .- Este sistema se utiliza para la detección de antígeno así como su cuantificación y puede ser utilizado para sustancias de bajo peso molecular, en el cual la interacción antígeno-anticuerpo del antígeno de la fase sólida y el anticuerpo marcado con la enzima es inhibida por el antígeno libre de la muestra.

La actividad enzimática que se detecta, en la fase sólida es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra (Fig 4).

Principio sandwich.- Para la medición de antígenos que disponen de de varios sitios de fijación para anticuerpos y, que por lo tanto, son casi siempre moléculas relativamente grandes (p.e. proteínas).

Este sistema emplea dos anticuerpos uno unido a la fase sólida y otro que va marcado por la enzima (Fig 5).

Fig.4 MODIFICACION DE EL ENSAYO INDIRECTO A EL ANTIGENO.

1. placa conteniendo antígeno

lavado de placa



2. prueba la muestra contiene
un antígeno probado

lavado de placa



3. adicionar el conjugado enzima-
antiglobina

lavado de placa



4. adicionar el sustrato de la enzima.



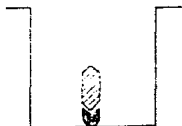
Fig.5 METODO DE SANDWICH

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 \equiv la cantidad presente
de antígeno.

La fase solida puede ser: tubos, microplacas, esferas, discos; los cuales pueden ser de celulosa, nylon, polivinilo, poliacrilamida, poliestireno y particulas de agarosa.

La calidad de un ensayo inmunoenzimatico depende de la pureza de el antigeno o hapteno utilizado para la inmunizacion y por tanto de la especificidad del anticuerpo y de la enzima elegida.

La enzima debe tener elevada actividad especifica, estable en condiciones de almacenamiento y de prueba, ser economica y poder obtenerse en un alto grado de pureza, no debe perder actividad debido a la conjugacion y conservaria en condiciones de prueba, ya que de esto depende la sensibilidad del ensayo. Ademas de peso molecular bajo y resistencia a cambios de pH y temperatura.

Las enzimas mas utilizadas son: Peroxidasa de rabano, fosfatasa alcalina y la beta-galactosidasa, otras enzimas utilizadas para ELISA son: Malatodeshidrogenasa, glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa, glucosa oxidasa, glucosa amilasa y lisozima (46,48).

La enzima puede acoplarse a anticueros o antigenos por varios procedimientos (glutaraldehido de un paso, glutaraldehido de dos pasos, o con peryodato). La reaccion debera ser altamente eficiente y el conjugado debe ser estable.

El glutaraldehido es uno de los agentes mas utilizados para la conjugacion por el metodo de de uno o dos pasos. El glutaraldehido reacciona con los grupos epsilon-amino de la proteina. los conjugados hechos por el metodo de un paso se polimerizan en exceso y solo una pequena porcion de la enzima se conjuga al anticuerpo o al antigeno y aunque la actividad del

conjugado se retiene, la afinidad disminuye.

No con la de dos pasos , en la que se deja reaccionar la enzima con el glutaraldehido y una vez activa la enzima, esta reacciona con el grupo amino del antígeno o del anticuerpo (45,48).

FUNDAMENTACION DEL TEMA.

Un estudio realizado en Mexico (50) por el Instituto Mexicano del Seguro Social, informa que la poblacion estudiada fue de 0.13 del total de la poblacion derechohabiente y en relacion a la morbilidad de caries dental, reporta lo siguiente: "La prevalencia e incidencia de la enfermedad caries dental, asi como la perdida de dientes por dicha causa es elevada en casi todos los estudios efectuados. La poblacion derechohabiente del IMSS en un 97.62% la padece; por lo que es considerada dentro de las tres enfermedades de mayor morbilidad".

Durante su existencia, el ser humano presenta un patron tipico de respuesta inmune (33).

Cuando un antígeno entra al cuerpo por primera vez encontrara una proporcion muy pequena de linfocitos (o clona) que tenga en su superficie receptores especificos para el mismo. Al contacto con el antígeno, el linfocito estimulado empieza a dividirse (expansion clonal), y diferenciarse en celulas activas. Las celulas B que poseen inmunoglobulinas unidas a su membrana como receptor comienzan a secretar IgM y maduran a celulas plasmaticas productoras de IgG. Cuando el antígeno ha sido eliminado, los mecanismos efectores de la respuesta se detienen, pero dejan detras la clona expandida de celulas diferenciadas lista a responder de manera vigorosa e inmediata a cualquier evento subsiguiente con el mismo antígeno. Esto constituye la memoria inmunologica (51). Por lo tanto, el presente trabajo pretende no

solamente detectar los niveles de anticuerpos de tipo IgA salivales contra los antígenos de las cepas a utilizarse, sino también, establecer un trabajo integral entre el profesionalista odontólogo y el Q.F.B. con el fin de lograr que la práctica odontológica no se limite únicamente a la revisión y tratamiento del paciente, sino que se apoye en el laboratorio clínico para lograr un diagnóstico certero así como un tratamiento más eficaz.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

De las infecciones orales, la caries es el principal padecimiento por el cual los pacientes acuden a tratamiento y ocasiona alteraciones a nivel del sistema gnático por pérdida de la función masticatoria, ya sea por problemas de infecciones recurrentes de tipo absceso o por pérdida de órganos dentarios, de aquí la importancia de establecer la relación entre la actividad cariogénica en la flora normal y la producción de anticuerpos para ampliar las expectativas en cuanto a la creación de medidas preventivas que disminuyan la incidencia y prevalencia de este padecimiento.

La mayoría de los estudios que se han realizado con respecto a microorganismos presentes en la cavidad oral, se han efectuado en países altamente desarrollados y no pueden ser extrapolados a nuestro país, ya que el tipo de flora bacteriana va a estar determinada por la dieta y por lo tanto, como los hábitos alimenticios y el ambiente son distintos, el tipo y calidad de la respuesta inmune hacia la flora oral, necesariamente serán distintos.

Dolby (52) menciona que las diferencias en la sensibilidad inmune de un individuo hacia las bacterias cariogénicas puede explicar las variaciones de susceptibilidad a la caries que existen entre sujetos que viven alimentándose con dietas similares.

O B J E T I V O S.

- Establecer la relación entre los anticuerpos de tipo IgA secretor en saliva contra los antígenos de las cepas a utilizarse.
- Correlacionar las pruebas in vitro con los hallazgos clínicos.
- Relacionar la práctica odontológica con el laboratorio clínico, mediante un trabajo integral para un restablecimiento más rápido del paciente.
- Interpretar los datos obtenidos para su posible aplicación en el campo de la prevención.

H I P O T E S I S.

- La población adolescente presenta títulos altos de anticuerpos de tipo IgA secretor en relación a los antígenos de las cepas utilizadas.
- Los individuos con menor número de procesos cariosos, presentan títulos elevados de IgA secretor contra las cepas probadas.

METODOLOGIA.

- 1.- Obtencion y caracterizacion de las cepas puras de los microorganismos a probar (53,54,55,56,57).
- 2.- Se trataron las cepas de Streptococos por el método de Rantz y Randall para obtener el antígeno específico de especie (carbohidrato C de Lancefield) (58), y se cuantifico (59).
- 3.- Las demás cepas fueron tratadas con formaldehído para obtener sus antígenos (60).
Los antígenos obtenidos se ajustaron a el tubo número 3 del nefelometro de Mc. Farland. Se sonicaron y cauntificaron por el método de Lowry (61).
- 4.- Se obtuvo IgA secretora a partir de leche y calostro humano, por corrimiento de la misma en DEAE celulosa.
Se realizo un tratamiento a la leche y calostro humano previo a la elusión. Se regenero la DAE y se empaco la columna., se determinaron las lecturas (Absorbancias) espectrofotométricamente (280 nm UV) del corrimiento de la muestra. se graficaron las fracciones (gráfica 1) y se hizo una prueba de precipitación en gel por el método de Cuchterlony, empleando un standar de IgA.
Se reunieron todas las fracciones correspondientes a la IgA y se cuantifico proteínas por el método de Lowry (61).
- 5.- La IgA obtenida se fracciono en cadenas pesadas, ligeras y componente secretor (39,63), utilizando yodoacetamida y mercaptoetanol.

- 6.- Se separó cadenas pesadas de IgA empleando una columna de Sephadex G-100 (52,63).. se determinaron las lecturas (Absorbancia) espectrofotométricamente (280 nm UV) del corrimiento de la muestra, se graficaron las fracciones (gráfica 2) y se reunieron las fracciones correspondientes a las cadenas pesadas de IgA., se cuantificó proteínas por el método de Lowry (61).
- 7.- Se inmunizó un conejo con cadenas pesadas de IgA mediante un esquema de inmunización (60,64).
- 8.- Se tomó una muestra de sangre de la vena marginal de la oreja del conejo se separó el suero y se realizó una prueba de precipitación en capilar (60) para conocer el título de anticuerpos, posteriormente se sangró a blanco. Se obtuvieron anticuerpos de tipo IgG contra cadenas pesadas de IgA por precipitación con sulfato de amonio y se cuantificó por el método de Lowry (61). Se obtuvo un conjugado de peroxidasa por acoplado con glutaraldehído de dos pasos y purificación del conjugado con sulfato de amonio (65).
- 9.- Se tomaron muestras de saliva estimulada de adolescentes.
- 10.- Levantamiento al obtener las muestras de saliva del índice CPO.
- 11.- Descomplementación de las salivas para evitar fijación de complemento.
- 12.- Titulación de IgA contra los antígenos de las cepas tratadas, por el método de ELISA (65) y registro de los

resultados.

- 13.- Tratamiento estadístico por análisis por regresión lineal simple y análisis de varianza para la regresión de los resultados obtenidos.

MATERIAL Y METODOS.

MATERIAL.

A) MATERIAL BIOLÓGICO.

Cepas bacterianas (del departamento de ENEP ZARAGOZA)

Lactobacillus acidophilus

Bacteroides fragilis

Streptococcus mutans

Streptococcus sanguis

Streptococcus salivarius

Streptococcus faecalis

Actinomyces israelii

Actinomyces naeslundii

Actinomyces viscosus

Rothia dentocariosa

Arachnia propionica

Globulos rojos de conejo

Un conejo

Suero de conejo

Saliva humana

Ovoalbumina. Sigma

Albumina serica bovina. Merck

Cojugado IgG-anti IgA. Cappel

B) MEDIOS DE CULTIVO Y PRUEBAS BIOQUÍMICAS.

Caldo tioglicolato. Bioxón

Base de agar sangre. Merck

Glucosa y rojo de fenol. Bioxón

Sacarosa y rojo de fenol. Bioxón

Maltosa y rojo de fenol. Bioxón

Manitol y rojo de fenol. Bioxón

SiM. Bioxón

Gelatina bacteriológica. Merck

C) REACTIVOS.

Colorantes para gram

Cloruro de sodio. Monterrey

Hidroxido de sodio. Monterrey

Acido clorhidrico. J.T. Baker

Acido acetico glacial. J.T. Baker

Acido citrico. Merck

Acido sulfurico. Merck

Formaldehido. J.T. Baker

Pirogalol. J.T. Baker

Mercaptonetanol. Merck

Yodacetamida. Sigma

Tri-hydroxymetil amino-metane. Merck

DEAE celulosa. Sigma

Sephadex G-100. Sigma

Fenol. Merck

Sulfato de cobre. J.T. Baker

Sulfato de amonio. J.T. Baker

Sulfato de sodio. J.T. Baker

Carbonato de sodio anhidro. J.T. Baker

Tartrato de sodio y potasio. J.T. Baker

Reactivo de folin-ciocalteu. Sigma

Lisina. Sigma

Glutaraldehido. Sigma

Azida de sodio.

Peroxidasa de rabano. Sigma

Ion agar. (oxid)

Agua bidestilada

Fosfato de potasio monobasico. J.T. Baker

Fosfato de sodio dibasico dodecahidratado. J.T. Baker

Cloruro de potasio. Merck

Fosfato de sodio monobasico anhidro. J.T. Baker

Peroxido de hidrogeno. Monterrey

Tween 20. Sigma

Ortofenilendiamina. Sigma

D) MATERIAL.

Espatula de acero inoxidable. Scientific Products

Cajas de Petri de 10 cm de diametro. Corning y Pyrex

Tubos de ensaye de 13 x 100, 12 x 75 y 18 x 150 mm. Pyrex

Tubos de rosca. Pyrex

Pipetas pasteur

Pipetas graduadas de 1, 2, 5 y 10 ml. Pyrex

Matraces Erlen-Meyer de 125, 250, 500 y 1000 ml. Pyrex

Matraces aforados de 100, 250, 500 y 1000 ml. Pyrex

Probetas de 10, 25, 50, 100 y 500 ml. Pyrex

Tubos de Khan

Botellas de plastico esteriles

Placas de microtitulacion de 12.7 x 9.5 cm. Cooke

Vidrios de reloj. Pyrex

Pisetas 500 ml
Columnas para cromatografía
Jeringas desechables de 3, 5 y 20 ml. Plastipak
Vasos de precipitado de 100, 250 y 500 ml. Pyrex
Embudo buchner
Matraces kitasato de 1000 ml. Pyrex
Búlbos de plástico para pipetas pasteur
Portaobjetos de 75 x 25 mm. Profesional
Celdas para espectrofotometro. B & L
Tijeras
Soporte universal
Trípé metalico
Gradillas de 20 y 36 tubos
Teja de asbesto
Papel parafilm
Papel aluminio
Papel filtro whatman # 1
Algodón
Mechero bunsens
Mechero fischer. Scientific Products
Asas bacteriologicas

E) EQUIPO

Termometro

Bomba de vacío. Feil Welch Mod 1410

Equipo de destilación. Pyrex

Ultracentrifuga. DAMON/IEI Division, IEC B-20A CENTRIFUGE
Balanza granataria. CHAUS
Balanza analítica. Mettler, H80
Incubadora. Riossa, EC
Olla de presión de 10 litros. Presto
Microscopio óptico. Carl-Zeiss
Baño de agua con temperatura controlada. Precision
Potenciómetro. Sargent-Weich PBL-400
Agitador vortex. Genie
Agitador magnético
Parrilla de agitación
Refrigerador. Philips 127-VCA
Espectrofotómetro. Bausch & Lomb, Spectronic 20
Espectrofotómetro. Perkin-Elmer Lambda 3A UV/VIS
Espectrofotómetro (ELISA). Dynatech MR 250
Estufa. Mpsa
Equipo para inmuno electroforesis. E-C APPARATUS CORP, EC 454
Sonicador.
Micropipetas 50 microlitros. Cooke
Pipeta de embolo 20-100 microlitros. Brand-W Germany

PREPARACION DE SOLUCIONES.

1.- SOLUCION SALINA ISOTONICA: S.S.I.

Pesar 8.5 g. de cloruro de sodio.

Disolver el cloruro de sodio en un litro de agua destilada.

2.- SOLUCION SALINA FORMALINIZADA AL 0.6%.

1.5 ml. de formaldehído (39.7% de pureza) en 100 ml de S.S.I.

3.- SOLUCION SALINA FORMALINIZADA AL 0.3%.

0.75 ml. de formaldehído (39.7% de pureza) en 100 ml. de S.S.I.

4.- REACTIVO DE LOWRY.

Reactivo A*

Carbonato de sodio al 2% y tartrato de sodio y potasio al 0.02% en hidróxido de sodio 0.1N

Reactivo B*

Sulfato de cobre al 0.5%

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

*Se conservan en refrigeración.

5.- SOLUCION DE ACIDO CLORHIDRICO 0.1N.

8.2 ml. de ácido clorhídrico aforados a un litro de agua destilada.

6.- SOLUCION DE HIDROXIDO DE SODIO 0.1N.

Pesar 4 g. de hidróxido de sodio, disolverlos en 100 ml. de agua destilada y aforar a un litro con agua destilada.

7.- SOLUCION DE HIDROXIDO DE SODIO 2N.

Pesar 8 g. de hidróxido de sodio disolver en 50 ml. de agua

destilada y aforar a 100 ml. con agua destilada.

8.- SOLUCION DE ACIDO CLORHIDRICO 1N.

Medir 32.5 ml. de acido clorhidrico y aforar a un litro con agua destilada.

9.- SOLUCION DE ACIDO ACETICO 0.1N.

Medir 57.2 ml. de acido acetico glacial y aforar a un litro con agua destilada.

10.- SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS.

Preparar las soluciones concentradas A y B.

Solucion concentrada A: pesar 27.6 g. de fosfato de sodio monobasico monohidratado en un litro de agua destilada (0.2 M).

Solucion concentrada B: pesar 28.33 g. de fosfato de sodio dibasico anhidro o 53.62 g. de fosfato de sodio heptahidratado en un litro de agua destilada.

Se mezclan los volúmenes de las soluciones concentradas como sigue y se afora a 200 ml para obtener los valores correspondientes de pH.

Solucion A	Solucion B	pH	Molaridad
73.5	26.5	6.4	0.1
13.0	87.0	7.6	0.01

11.- AMORTIGUADOR DE RECUBRIMIENTO.

Amortiguador de carbonato-bicarbonato pH 9.6.

Pesar:

1.59 g. de carbonato de sodio.

2.93 g. de bicarbonato de sodio.

Llevarlo a un litro con agua bidestilada.

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

12.- SOLUCION AMORTIGUADORA DE SALINA FOSFATOS (PBS) pH 7.2.

Pesar:

8 g. de cloruro de sodio

0.2 g. de cloruro de potasio

1.15 g. de fosfato de sodio dibasico

0.2 g. de fosfato de potasio monobasico.

Disolverlos en agua bidestilada y aforar a un litro

13.- SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS TWEEN (PBS-TWEEN) pH 7.4.

Pesar:

8 g. de cloruro de sodio

0.2 g. de fosfato de potasio monobasico

2.9 g. de fosfato de sodio dibasico dodecahidratado

0.2 g. de cloruro de potasio

0.5 ml de tween 20.

Disolverlos en agua bidestilada y aforar a un litro.

Almacenar a 4°C.

14.- SUSTRATO DE LA PEROXIDASA.

Amortiguador del sustrato pH 5.

ácido cítrico 0.1 M (24.3 ml)

fosfato de sodio dibásico 0.2 M (25.7 ml).

Pesar:

40 mg. de ortotrenilendiamina y disolverla en 100 ml de amortiguador de sustrato y 40 ul de peróxido de hidrógeno al 30%.

el sustrato se prepara inmediatamente antes de usarlo pues se daña con la luz.

MEDIOS DE CULTIVO (55).

1.- BASE DE AGAR SANGRE.

Suspender 40 g. en 1 litro de agua destilada, dejar reposar por 15 minutos y calentar a ebullición hasta disolver completamente, esterilizar en autoclave (15 minutos a 121 °C) Después enfriar alrededor de 45 a 50°C y agregar la sangre defibrinada estéril, en una concentración al 5%. El medio es distribuido en cajas de petri estériles.

2.- MEDIO DE TIOGLICOLATO.

- a) Suspender 28.5 g. en un litro de agua destilada.
- b) Calentar con agitación frecuente.
- c) Hervir durante un minuto.
- d) Distribuir en cantidades de 8 ml. en tubos con tapon de rosca.

e) Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

- Dejar enfriar
- Hacer prueba de esterilidad, incubando el medio a 37 °C durante 24 horas.
- Almacenar hasta su uso en refrigeración o a temperatura ambiente.

Nota: Recuérdese que debe hervir en BM y enfriar antes de sembrar cada uno de los tubos.

M E T O D O S.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE MICROORGANISMOS.

Sembrar las cepas a utilizar en caldo tioglicolato (por agitación), agregar tres gotas de suero estéril de conejo; incubar a 37°C de 48 horas a cinco días. Observar morfología colonial en el tubo.

Posteriormente sembrar en agar sangre por estria cruzada (para su aislamiento), e incubar en anaerobiosis en caja a 37°C durante 48 horas. Observar morfología colonial, escoger colonias aisladas, hacerles frotis, fijarlo y teñirlo por gram; observar morfología microscópica.

Se repite el procedimiento alternando el cultivo en el caldo tioglicolato y agar sangre en anaerobiosis, hasta obtener cepas puras.

Preparación de anaerobiosis en caja (53).

Se emplean dos cajas de petri:

Caja A con medio de agar sangre (solo se empleara la base)

Caja B con un cojín de gasa en la tapa (solo se usara la tapa)

- Sembrar las cepas a utilizar en medio de agar sangre (caja A) por estria cruzada.
- Colocar un cojín de gasa en el centro de la tapa de la caja B, adherirlo por los cuatro lados a la tapa de la caja con masking tape, cerrar la caja, envolverla y esterilizarla en autoclave (15 minutos a 121°C). Se abre la caja B en condiciones de esterilidad, agregar sobre el cojín de gasa cuatro gotas de

hidróxido de sodio al 30% y cuatro gotas de pirogalol al 50% colocar inmediatamente la base de la caja A (agar sangre con el microorganismo sembrado) y sellarla perfectamente con masking tape, incubar a 37°C durante 48 horas.

Identificación de los microorganismos (54,56,57)

Realizar pruebas bioquímicas a las cepas aisladas para su identificación .

- Sembrar por agitación los microorganismos en glucosa y rojo de fenol, sacarosa y rojo de fenol, maltosa y rojo de fenol, manitol y rojo de fenol.
- Sembrar por picadura con asa recta en el medio SIM y gelatina Bacteriológica.

Incubar a 37°C durante 24 horas, leer las pruebas bioquímicas y confirmar la lectura a las 48 horas de incubación.

METODO DE EXTRACCION DEL GRUPO CARBOHIDRATO DEL ANTIGENO POR AUTOCLAVE (58)

Casi todos los estreptococos betahemolíticos poseen antígenos específicos CHO (hidratos de carbono) llamados antígenos de los grupos estreptocócicos.

Extracción en autoclave.

- 1.- Cultivar células en 30 ml. de caldo de Todd-Hewitt u otro apropiado a 35-37°C.
- 2.- Empacar las células por centrifugación.

- 3.- Decantar el líquido sobrenadante, añadir 0.5 ml. de solución de cloruro de sodio al 0.65% a las células y agitar para suspenderlas.
- 4.- Poner el tubo en autoclave 15 minutos a 121°C.
- 5.- Pasar a un tubo de Khan.
- 6.- Centrifugar el tubo.
- 7.- Decantar el líquido sobrenadante en un recipiente estéril.
- 8.- Guardar en congelación hasta su uso.

CUANTIFICACION DE CARBOHIDRATO (59).

Realizar una curva patrón empleando una serie de 10 tubos, colocar 0.1, 0.2, 0.3, 0.4,....1 ml. de un estándar de glucosa de 0.1 mg./ml. de concentración, llevarlos a 2.0 ml. con agua destilada. El blanco se hace con 2 ml. de agua destilada.

En otro tubo se colocan 2 ml. de la muestra problema. A todos los tubos se les agrega 0.1 ml. de fenol al 80% y 5 ml. de ácido sulfúrico concentrado. Mezclar bien todos los tubos y dejar reposar de 20 a 30 minutos. Leer a 490 nm.

PREPARACION DE ANTIGENOS CON FORMALDEHIDO (60).

- 1.- Se siembra el microorganismo en tubo de caldo nutritivo. Se incuba a 37°C por 18 a 24 horas.
- 2.- Una vez terminado el periodo de incubación se agrega al cultivo un volumen igual de solución salina formalinizada al 0.6% y se deja a temperatura ambiente por 24 a 48 horas.

- 3.- Se prueba la esterilidad del producto, sembrando una pequeña cantidad en un tubo con caldo tioglicolato.
- 4.- Se cosecha por centrifugación el medio de cultivo a 3000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante se desecha.
- 5.- Se resuspende el sedimento bacteriano con unos 5 ml. de solución salina con formaldehído al 0.3% y se diluye con esta misma solución hasta igualar su turbidez con la del tubo número 3 del nefelómetro de Mc Farland.
- 6.- La suspensión así obtenida se envasa en un frasco ampula, se tapa asepticamente y se engargola con retapa de aluminio.
- 7.- Se guarda la suspensión en el refrigerador hasta su uso.

NEFELÓMETRO DE MC. FARLAND (5).

Se basa en turbidez VS concentración de bacterias.

- 1.- Preparar soluciones de cloruro de bario al 1% y de ácido sulfúrico al 1%.
- 2.- Agregar las cantidades indicadas en el cuadro a tubos del mismo diámetro.

Mc. Farland tubo	cloruro de bario ml.	ácido sulfúrico ml.	# de bacterias representada (millones/ml.)
1	0.1	9.9	300
2	0.2	9.8	600
3	0.3	9.7	900
4	0.4	9.6	1200

Continuación nefelometro de Mc Farland.

Mc Farland	cloruro de bario	acido sulfurico	# de bacterias representadas
tubo	ml.	ml.	(millones/ml.)
5	0.5	9.5	1500
6	0.6	9.4	1800
7	0.7	9.3	2100
8	0.8	9.2	2400
9	0.9	9.1	2700
10	1.0	9.0	3000

SONICACION DE ANTIGENOS PROTEICOS.

Poner la suspension de antigenos proteicos en un vaso de precipitado limpio, colocarlo en baño de hielo y someterlo a sonicación durante 12 minutos efectivos, en lapsos de 2 minutos; durante los cuales se hace cambio del baño de hielo (si es necesario).

DETERMINACION DE PROTEINAS: METODO 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 concentración 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,.....500 microgramos por mililitro. (a partir de una solución de 500 microgramos por mililitro en SSI.). El blanco se hace con 1 ml. de SSI. En otro tubo se coloca un ml. de la muestra problema. A todos los tubos se les agregan 3 ml. del reactivo de Lowry, (preparado al momento) y se dejan durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se adiciona 0.1 ml. del reactivo de Folin-Ciocalteu y se deja a temperatura ambiente durante 30 minutos, agitando ocasionalmente. Se lee en un espectrofotómetro a 600 nm

MUESTRA DE LECHE Y CALOSTRO HUMANO.

La muestra de calostro humano fue reunida por donación de varias personas el primer día después del parto y leche de los primeros cuatro meses de lactancia.

La muestra fue tratada previamente a la elusión en la columna de la siguiente forma:

Desgrasar el calostro y la leche por centrifugación a 10 000 rpm durante 90 minutos. Posteriormente se adiciona ácido acético glacial para precipitar la caseína, centrifugarla a 3 000 rpm. y desechar el precipitado durante 15 minutos; agregar hidróxido de sodio (sólido) en pequeñas cantidades hasta llegar a pH=10.

Dializar la muestra en solución buffer de fosfatos 0.01M pH=7.6, durante tres días con cambios de buffer cada 24 horas.

REGENERACION DE LA DEAE-CELULOSA PARA SU EMPLEO.

- 1.- Al terminar de emplear la DEAE-celulosa (o despues de hidratarla) , lavarla varias veces con agua destilada, empleando succion para eliminar el agua.
- 2.- Lavar con 200-300 ml. de solucion de hidróxido de sodio 0.1N, despues con agua destilada para eliminar la sosa.
- 3.- Continuar con lavados alternados de acido clorhidrico 0.1N y sosa, lavando en cada uno con agua destilada, es decir, solución de de ácido clorhidrico 0.1N, agua destilada, solución de de hidróxido de sodio 0.1N, agua destilada. Repetir este ciclo de 4 a 5 veces.
- 4.- Despues del último lavado con agua destilada conservar la DEAE-celulosa suspendida en agua destilada o bien si se va a volver a usar de inmediato, suspenderla en solución salina amortiguada.

CORRIMIENTO DE LA MUESTRA DE CALOSTRO Y LECHE POR COLUMNA (DEAE-CELULOSA), PARA OBTENER IgA SECRETORA (60).

Se empaca la columna con DEAE-celulosa en amortiguador de fosfatos 0.01M pH=7.6.

Se preparan dos soluciones amortiguador de fosfatos una 0.01M pH=7.6 y otra 0.1M pH=6.4

Se coloca la muestra de leche o de calostro en la columna sobre la DEAE por las paredes de la columna sin formar burbujas, se deja que se absorba la muestra; se agrega amortiguador de

fosfatos 0.01M pH=7.6 y se deja eluir hasta que la muestra se encuentre distribuida por la columna. Se forma un gradiente de elusión empleando dos matraces Erlen-Meyer de 1000 ml. conectados en serie a la columna. El matraz numero 2 contiene 800 ml. de solución amortiguador de fosfatos 0.1 pH=6.4 y esta conectado a el primer matraz y este a su vez a la columna. El primer matraz contiene 500 ml. de solución amortiguador de fosfatos 0.01M pH=7.6 mas la cantidad de amortiguador 0.1M que se esta adicionando (con agitación continua), la cantidad de buffer que pasa de el segundo matraz a el primero y del primero a la columna, debe ser igual a la cantidad que sale de la columna; lo que se logra sellando perfectamente la entrada de el primer matraz y la de la columna, evitando que entre aire y se forme el gradiente de elusión.

Colectar de 60 a 100 fracciones de 2.5 a 3 ml. por tubo

METODO DE DUCHTERLONY (60).

- 1.- En un vaso de precipitados de 250 ml. se colocan 150 ml. de agua destilada.
- 2.- se agregan 150 mg. de ion agar (oxid) y se hace hervir hasta la disolución total del agar (aproximadamente 1 hora). El volumen de agua evaporada, se repone con agua destilada.
- 3.- En la solución de agar, aun caliente se sumergen portaobjetos perfectamente limpios y desengrasados, los cuales posteriormente son sacados y colocados en un horno

precalentado a 100°C hasta que se secan.

- 4.- En forma semejante a la indicada en los pasos 1 y 2, se preparan 100 ml. de una solución de ion agar al 1% en solución salina pH=7.2. Deberá añadirse merthiolate a una concentración final de 1:10,000.
- 5.- Los porta-objetos secos se acomodan sobre una superficie perfectamente horizontal y con una pipeta de punta ancha se les colocan a cada uno, 4 ml. de ion agar al 1% caliente. El agar deberá dejarse gelificar a temperatura ambiente.
- 6.- Con ayuda de un capilar, se practican perforaciones al gel y el agar residual se remueve con un aplicador.
- 7.- Los pozos así formados se llenan con el antisuero humano total en el centro y la muestra de IgA y el estándar de IgA alrededor.
- 8.- Se improvisa una cámara húmeda, usando una caja de petri cuya tapa se recubre con un disco de papel filtro húmedo.
- 9.- Se colocan los porta-objetos en el interior de la cámara sobre aplicadores de madera.
- 10.- Se incuba a temperatura ambiente durante 24 a 46 horas y se buscan bandas de precipitación de identidad.

ROMPIAMIENTO DE LA IgA SECRETORA EN CADENAS PESADAS, LIGERAS Y COMPONENTE SECRETOR (39,63).

Se mide la muestra de IgA secretora y se le adiciona la cantidad necesaria de mercaptoethanol para alcanzar una concentración de

0.75M de mercaptoethanol, se deja a temperatura ambiente durante una hora. Posteriormente se enfria en baño de hielo.

Por separado se prepara un volumen igual de yodacetamida (0.75M) y se le adiciona a la IgA fria, agitando en un solo sentido. Se mide el pH con un potenciómetro y se mantiene a pH=8 agregando gota a gota (sin dejar de agitar) hidróxido de sodio 5N, durante una hora.

Dializar la muestra en solución salina 0.85% toda la noche.

SEPARACION DE CADENAS PESADAS DE IgA EN SEPHADEX G-100 (62,63).

Montar una columna con sephadex G-100 en ácido acético 0.1N se coloca la muestra de IgA fraccionada en la columna, sobre el sephadex por las paredes de la misma, evitando que se formen burbujas, dejar que se absorba la muestra y empezar a adicionar ácido acético 0.1N hasta llenar la columna; Tapar la columna (empleando un tapón al que previamente se le adapto una manguera, por la cual se seguirá suministrando ácido acético).

Colectar de 50 a 100 fracciones de 2.5 a 3 ml.

INMUNIZACION DE CONEJOS (60,64).

Inmunización es el proceso mediante el cual se induce una respuesta inmune en un individuo competente, por el contacto con un antígeno específico en forma natural.

Se pueden emplear vías como: intramuscular, intravenosa,

Intracardiaca, subcutanea, intradérmica e intraperitoneal. La elección de la vía dependerá entre otras cosas del animal usado, de las características del antígeno y del propósito de la inmunización.

El uso de adyuvantes permite mejorar en forma consistente la respuesta del animal inmunizado.

Inmunización de conejos con cadenas pesadas de IgA, mediante el siguiente esquema de inmunización.

Inyección	Día	Dosis
1	0	5.0 mg del antígeno disuelto en un ml. de adyuvante completo de Freund. Vía i.v. o s.c. en sitios múltiples.
2	15	Igual que antes pero usando adyuvante incompleto de Freund. Vía s.c.
3	30	0.250 mg del antígeno en solución salina. vía s.c.
4	31	0.500 mg del antígeno en solución salina. vía s.c.
5	32	1.0 mg del antígeno en solución salina vía s.c.

Sangrado día 39.

SANGRIA DE CONEJOS.

Obtener una muestra (3ml.) de sangre de la vena marginal de oreja

del conejo en condiciones asepticas, recibiendo en un tubo de ensaye, dejar que se forme y retraiga el coagulo, separarlo y obtener el suero por centrifugacion a 3000 rpm.

Realizar una prueba de precipitacion en capilar empleando el suero obtenido, para conocer el titulo de anticuerpos.

Sangria de conejos a blanco.

Los conejos son sangrados a blanco tomando la sangre por puncion cardiaca, con el uso de jeringas esteriles, la sangre se toma en condiciones asepticas, se recibe en un vaso de precipitados de 500 ml. limpio se incuba a 37°C durante una hora y se deja toda la noche en refrigeracion se separa el coagulo y se obtiene el suero por centrifugacion a 3000 rpm. El suero se guarda congelado.

PRECIPITACION EN CAPILAR (60).

La reaccion de precipitacion se presenta cuando un antigeno multivalente, soluble se une con su anticuerpo especifico y asi da lugar a un complejo insoluble. Se utiliza para demostrar y cuantificar antigenos y anticuerpos.

- 1.- Dividir con marcador los capilares en cuatro partes iguales.
- 2.- En 8 tubos de ensaye de 13 x 100 debidamente rotulados, se hacen diluciones al doble de la solucion de antigeno.
 - a) Colocar 0.5 ml. de solucion salina en cada tubo de ensaye
 - b) Al tubo 1 se agregan 0.5 ml. de la solucion de antigeno; se mezclan bien con la misma pipeta.

- c) Con una pipeta se toman 0.5 ml. del tubo 1 y se pasan al tubo 2. Se mezclan bien con la misma pipeta.
- d) El procedimiento se repite para los tubos siguientes.
- 3.- Se toma un tubo capilar y se absorbe por capilaridad un volumen de antisuero que llegue hasta la primera de las marcas del tubo. La parte externa del tubo se limpia con papel absorbente.
 - 4.- El tubo capilar se gira 180° y se hace descender el volumen de antisuero hasta el borde correspondiente.
 - 5.- Se absorbe en forma similar a la descrita en el inciso 3 un volumen tal de antígeno sin diluir, que llegue hasta la segunda marca del tubo. Se limpia la parte externa con papel absorbente.
 - 6.- Se mezcla por inversión repetida.
 - 7.- Con el dedo índice se tapa uno de los extremos del capilar y se deja que el contenido quede entre las marcas internas.
 - 8.- El capilar se introduce en una gradilla de plastilina.
 - 9.- Se hace lo mismo (incisos 3 al 6) para cada una de las diluciones del antígeno.
 - 10.- Un capilar se llena hasta la segunda marca con antígeno sin diluir y otro con suero. (testigos de antígeno y anticuerpo).
 - 11.- Se deja unos minutos a temperatura ambiente y se guarda en refrigeración 24 a 48 horas.
 - 12.- Se mide la cantidad de precipitado en milímetros.

PURIFICACION DE GLOBULINA GAMMA POR PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO (60).

Tiselius y Kabat demostraron que la actividad de anticuerpo esta presente en la fraccion globulina gamma del suero. Existen diferentes metodos para la obtencion de esta fraccion y de los anticuerpos correspondientes.

Los anticuerpos pueden purificarse por metodos especificos e inespecificos.

- 1.- Con hidróxido de sodio 2N, se ajusta a 7.8 el pH de la solución saturada de sulfato de amonio, inmediatamente antes de la precipitación.
- 2.- A un volumen de suero contenido en un tubo conico, se adiciona lentamente y con agitación constante medio volumen de sulfato de amonio saturado (la concentración final de este queda a 1/3 de saturación). Se ajusta el pH a 7.8 con hidróxido de sodio 2N.
- 3.- Se continua agitando durante 10 a 15 min. después de terminada la adición del sulfato de amonio.
- 4.- Se centrifuga la suspensión a temperatura ambiente a 3,500 rpm durante 15 minutos.
- 5.- El precipitado se disuelve con solución salina a pH=7.8 hasta alcanzar un volumen igual al original del suero.
- 6.- Se repiten los pasos 1, 2, 3 y 4.
- 7.- Se repite el paso 5.
- 8.- Se repiten los pasos 1, 2, 3 y 4.

- 9.- El sedimento de la última centrifugación se disuelve en solución salina amortiguador de boratos, pH=7.8 hasta alcanzar la mitad o un tercio del volumen original de suero.
 - 10.- Se dializa contra solución salina amortiguador de boratos a pH=7.8 en frío (4°C) y se mantiene en agitación, durante 3 a 5 días, haciendo dos cambios diarios del amortiguador para eliminar completamente el sulfato de amonio.
 - 11.- Cuando se haya completado la diálisis se saca la muestra, se centrifuga a 2500 rpm. en frío durante 10 min. para eliminar cualquier precipitado que pueda haberse formado.
 - 12.- Se agrega a la solución ácida de sodio (concentración final de 0.1%) o merthiolate (concentración final 1:10,000) y se conserva en refrigeración.
 - 13.- Se determina la concentración de proteínas en la solución por colorimetría, espectrofotometría o por el método de Kjeldhal.
 - 14.- La pureza del producto puede ser comprobada por inmunoelectroforesis.
- La solución final deberá ser ligeramente opalescente.

OBTENCION DEL CONJUGADO.

ACOPLADO CON GLUTARALDEHIDO DE DOS PASOS (65).

- 1.- Disuélvase 10 mg. de peroxidasa en 0.2 ml. de amortiguador de fosfatos 0.1 pH=6.8 conteniendo 1.25% de glutaraldehido, dejarlo 18 hrs a temperatura ambiente.

- 2.- Eliminar el glutaraldehído por diálisis en salina normal o en columna de sephadex G-25 estabilizada con salina normal.
- 3.- Concentrar si es necesario a 1 ml. y adicione 1 ml. de salina normal que contiene 5 mg de anticuerpo y 0.1 ml de amortiguador de bicarbonato-carbonato de sodio 1M pH=9.5.
- 4.- Dejarla 24 horas a 4°C adicione 0.1 ml. de lisina 0.2M.
- 5.- Dejarla 2 horas a temperatura ambiente y dializar extensivamente contra PBS a 4°C. El conjugado puede ser separado de la enzima libre por precipitación con sulfato de amonio, como se describe más adelante.

PURIFICACION DEL CONJUGADO (65).

El fraccionamiento se puede hacer usando sephacryl 200 o precipitando el conjugado con sulfato de amonio.

- 1.- Adicione un volumen igual de sulfato de amonio frío saturado y neutro gota a gota con agitación .
- 2.- Centrifuge y lave el precipitado dos veces con sulfato de amonio a la mitad de saturación frío y neutro (volumen igual de sulfato de amonio saturado y PBS).
- 3.- Finalmente redissuelva el precipitado en PBS y dialize contra PBS para remover el sulfato de amonio.

MUESTRAS DE SALIVA.

Se recolectaron de 2 a 3 ml. de saliva estimulada (empleando parafilm) en tubos esteriles de 37 adolescentes de 12 a 15 años. Las salivas así reunidas fueron filtradas en algodón para eliminar componentes celulares gruesos y mucina; posteriormente se descomplementaron a 56°C durante 30 minutos. para evitar fijación de complementos.

LEVANTAMIENTO DEL CPO.

CPO= índice de piezas cariadas, perdidas y obturadas.

Para la dentición permanente, la prevalencia se registra como el promedio de número de dientes cariados, perdidos y obturados (CPO), determinado por el examen clínico con un explorador, un espejo y con luz adecuada.

TITULACION DE PEROXIDASA UNIDA A UN ANTICUERPO.

- 1.- Ajustar los antígenos de las cepas a probar a una concentración de 2 microgramos/ml., por dilución con PBS.
- 2.- Colocar en una gradilla 7 tubos los cuales serán etiquetados de la A a la G. En el tubo A se colocan 3 ml. de la dilución de antígeno (2 microgramos/ml.) y en los tubos de la B a la G se hacen diluciones al doble, con volúmenes de 1.5 ml. de amortiguador de carbonatos, teniendo cuidado de mezclar bien en cada tubo. Al final todos los tubos quedan

- con un volumen de 1.5, ml., excepto el G que queda con 3.0 ml.
- 3.- Colocar en los pozos de la fila A de la placa de microtitulacion 100 microlitros del tubo A, hacer lo mismo con el resto de los tubos. La fila H se llena con 100 microlitros del diluyente (testigo negativo del antígeno).
 - 4.- Dejar en camara humeda 18 hrs a 4°C.
 - 5.- Tirar el sobrenadante y bloquear con PBS-Albumina serica bovina al 1.0% durante 30 min.
 - 6.- Tirar el sobrenadante y lavar tres veces con PBS-Tween, dejando actuar 1 min. la solución del lavado antes de tirar los sobrenadantes.
 - 7.- Diluir las salivas (filtradas y descomplementadas) 1:5 con PBS.
 - 8.- Colocar en los pozos de la fila 1 a la 11, 100 microlitros de una solución de saliva diluida, la fila 12 se llena con diluyente. (testigo negativo de anticuerpo).
 - 9.- Dejar en camara humeda 2 hrs a temperatura ambiente.
 - 10.- Tirar el sobrenadante y lavar cuatro veces con PBS-Tween, dejando actuar 1 min. la solución del lavado antes de tirar los sobrenadantes.
 - 11.- Tomar 11 tubos, etiquetarlos del 1 al 11 y hacer diluciones al doble del conjugado peroxidasa-antiIgA humana, usando volúmenes de 1 ml.
 - 12.- Poner 100 microlitros del tubo 1 en los pozos de la hilera 1 hacer lo mismo con el resto de los tubos. La hilera 12 solo lleva PBS-Tween.

- 13.- Dejar 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda.
- 14.- Lavar cuatro veces con PBS-Tween igual que en el paso 6 y 10.
- 15.- Se adicionan 100 microlitros del sustrato y se coloca a 37°C durante 15 minutos.
- 16.- Parar la reacción con ácido sulfúrico 4N.
- 17.- Leer la densidad óptica a 492 nm.

PROTOCOLO GENERAL PARA ANTIGENOS SOLUBLES.

En placas de ELISA siempre deben incluirse controles positivos y negativos.

Controles negativos.

- 1) Omitir el antígeno
- 2) Colocar un suero negativo
- 3) Omitir el antígeno y la solución de prueba.

Nota: no usar azida de sodio en el sistema con peroxidasa.

METODO ESTADISTICO.

REGRESION Y CORRELACION LINEAL SIMPLE.

La regresión lineal simple nos permite conocer la relación que existe entre dos variables.

La regresión lineal mide el grado de asociación entre dos variables; es muy útil para averiguar la forma probable de la relación entre las variables, su objetivo es predecir o estimar

el valor de una variable que corresponde a un valor determinado de otra variable.

SC= Suma de cuadrados.

SCt= Es una medida de la variación total en los valores observados de Y.

SCexplicada= Mide la variabilidad total en los valores observados de Y.

SCinexplicada= Es una medida de dispersión de Y observados en torno a la recta de regresión.

r^2 = Coeficiente de determinación.

Es la razón de la suma de cuadrados explicada respecto de la suma de cuadrados total.

r^2 Mide la proximidad del ajuste de la ecuación de regresión de la muestra a los valores observados de Y.

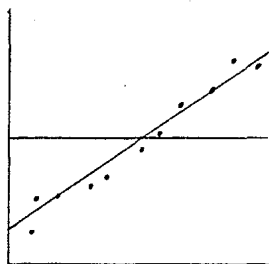
Un valor grande de r^2 indica que todas las observaciones están próximas a la recta de regresión (Fig 6).

Si el valor de r^2 es pequeño p.e. 0.403 indica que menos del 50% de la variación total de los Y_i es explicada por la regresión (Fig 7).

Si el valor de r^2 es uno, indica que todos los valores observados entran en la recta de regresión (Fig 6).

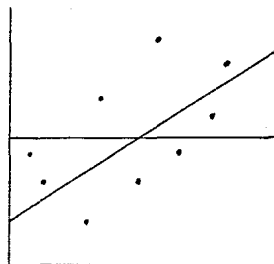
Para r^2 pequeñas que indica una falla de la regresión para explicar una gran proporción de la variación total en los valores observados de Y y la ecuación se somete a un juicio final hasta que haya sido sometida a una prueba estadística objetiva.

Fig. 6



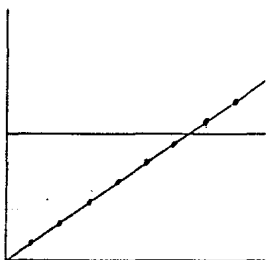
ajuste correcto r^2
grande.

Fig. 7

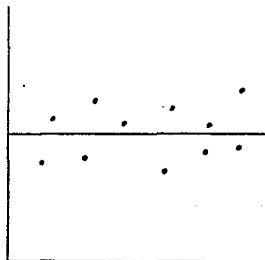


ajuste inadecuado r^2
pequeña.

Fig 8



$r^2 \rightarrow 1$



$r^2 \rightarrow 0$

El análisis de variancia es una técnica mediante la cual la variación total presente en un conjunto de datos se distribuye en varios componentes. Asociada con cada uno de estos componentes hay una fuente específica de variación, de modo que en el análisis es posible averiguar la magnitud de las contribuciones de cada una de estas fuentes a la variación total.

RESULTADOS.

- 1.0.- Se obtubieron los antígenos de las cepas puras, se cuantificaron y se diluyeron hasta tenerlas a una concentración de 1 microgramos/ml.; para emplearse en el metodo de ELISA.
- 2.0.- Se realizaron varios corrientes de muestras de leche y calostro humano en DEAE-celulosa, para obtener IgA, ya que el rendimiento no es muy grande.
- 2.1.- Se reunieron las fracciones de los tubos 1 a 27 correspondientes a la IgA (grafica 1) y se cuantificó por el metodo de Lowry.
- 2.2.- Posteriormente se fraccionó para obtener las cadenas pesadas de IgA, se reunieron las fracciones de los tubos 20 a 35 correspondientes a las cadenas pesadas de IgA (gráfica 2) se cuantificó proteínas por el metodo de Lowry .
- 3.0.- Se inmunizó un conejo con cadenas pesadas de IgA mediante un esquema de inmunización. Se obtubo una muestra de sangre previo a la fecha de sangrado y se realizo una precipitación en capilar, encontrandose que el titulo era muy bajo, por lo que se reinmunizó empleando la última dosis descrita en el esquema de inmunización.
- 3.2.- Se comprobó nuevamente el titulo y se procedió a sangrarlo a blanco.
- 4.0.- Se obtubo anticuerpos de tipo IgG contra cadenas pesadas de IgA por precipitación con sulfato de amonio y se cuantificó.

- 5.0.- La IgG obtenida se acoplo a peroxidasa de rabano para obtener el conjugado, por el metodo de Glutaraldehido de 2 pasos y se purifico por precipitación con sulfato de amonio.
- 6.0.- Se obtubo muestras de saliva (estimulada) y se levanto el indice CPD en adolescentes de 12 a 15 años de edad.
- 7.0.- Se determino el titulo de anticuerpos IgA en saliva contra las cepas de los microorganismos a probar por el metodo de ELISA (tablas 3 y 4).
- 8.0.- Se realizo un tratamiento estadistico empleando Regresión lineal simple y análisis de varianza para la regresión (tablas 5 y 6).

LECTURAS DE LA SEPARACION DE 1^a SECRETORA
DE CALDSTRÓ ROMANO

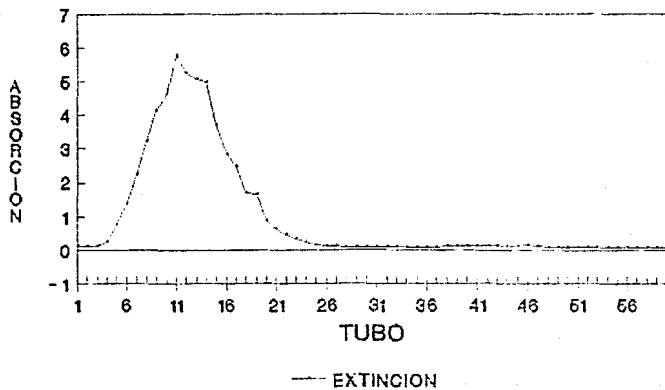
TABLA NO. 1

TUBO	ABSORCION
1	0.133
2	0.117
3	0.109
4	0.255
5	0.739
6	1.372
7	2.238
8	3.222
9	4.116
10	4.650
11	5.772
12	5.774
13	5.106
14	5.022
15	3.720
16	2.844
17	2.478
18	1.710
19	1.638
20	0.879
21	0.610
22	0.443
23	0.319
24	0.235
25	0.166
26	0.101
27	0.086
28	0.073
29	0.067
30	0.060
31	0.063
32	0.066
33	0.069
34	0.077
35	0.077

TABLA NO. 1 (CONTINUACION)

TUBO	ABSORCION
36	0.078
37	0.083
38	0.105
39	0.126
40	0.133
41	0.131
42	0.126
43	0.124
44	0.119
45	0.109
46	0.100
47	0.090
48	0.085
49	0.079
50	0.073
51	0.073
52	0.066
53	0.066
54	0.075
55	0.064
56	0.066
57	0.064
58	0.063
59	0.064
60	0.063

SEPARACION DE Ig A SECRETORA
CURVA DE ELUCION DE CALOSTRO HUMANO



GRAFICA I

LECTURAS DEL FRACCIONAMIENTO DE LIT LIGN.

TABLA NO 2

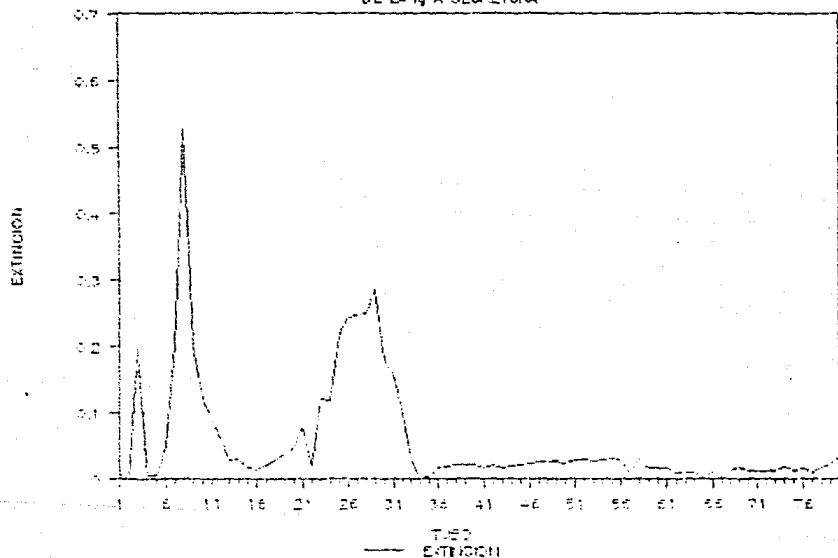
TUBO	ABSORCION
1	0.007
2	0.001
3	0.198
4	0.906
5	0.906
6	0.648
7	0.201
8	0.526
9	0.199
10	0.121
11	0.087
12	0.058
13	0.029
14	0.00
15	0.018
16	0.015
17	0.022
18	0.029
19	0.037
20	0.046
21	0.076
22	0.019
23	0.119
24	0.116
25	0.216
26	0.243
27	0.245
28	0.248
29	0.285
30	0.18
31	0.156
32	0.098
33	0.031
34	0.001
35	0.003
36	0.016
37	0.019
38	0.021
39	0.021
40	0.021
41	0.018

LECTURAS DE FRACCIONAMIENTO DE LA 19A

TABLA No 2 CONTINUACION

TUBO	ABSORCION
42	0.022
43	0.017
44	0.02
45	0.022
46	0.023
47	0.026
48	0.026
49	0.025
50	0.025
51	0.028
52	0.029
53	0.026
54	0.028
55	0.03
56	0.028
57	0.011
58	0.029
59	0.016
60	0.016
61	0.016
62	0.011
63	0.011
64	0.011
65	0.004
66	0.009
67	0.004
68	0.012
69	0.016
70	0.013
71	0.012
72	0.013
73	0.012
74	0.018
75	0.012
76	0.014
77	0.011
78	0.016
79	0.021
80	0.034

CURVA DE ELUCION DE LOS COMPONENTES DE LA 19 A SECRETORA



TÍTULOS DE ANTICUERPOS DE INMUNOGLOBULINAS * * * SECRETORAS tabla 3

Paciente	S. mutans	S. faecalis	S. sanguis	S.salivarius	CPD
1	0.306	0.175	0.121	0.042	14
2	0.365	0.072	0.152	0.026	7
3	0.192	0.031	0.101	0.031	15
4	0.267	0.101	0.280	0.025	17
5	0.343	0.014	0.117	0.017	13
6	0.201	0.075	0.124	0.057	10
7	0.173	0.075	0.097	0.107	15
8	0.105	0.176	0.056	0.022	16
9	0.200	0.154	0.059	0.079	12
10	0.190	0.055	0.157	0.082	4
11	0.140	0.155	0.054	0.090	7
12	0.149	0.120	0.106	0.037	10
13	0.324	0.229	0.163	0.214	15
14	0.063	0.237	0.037	0.158	10
15	0.137	0.100	0.042	0.085	17
16	0.417	0.098	0.017	0.051	14
17	0.275	0.166	0.076	0.022	11
18	0.627	0.284	0.284	0.379	15
19	0.063	0.103	0.041	0.075	15
20	0.075	0.267	0.027	0.039	14
21	0.070	0.040	0.027	0.080	17
22	0.126	0.025	0.027	0.021	14
23	0.027	0.154	0.199	0.045	11
24	0.477	0.156	0.572	0.014	13
25	0.260	0.116	0.031	0.057	17
26	0.029	0.036	0.010	0.029	19
27	0.232	0.310	0.114	0.127	9
28	0.151	0.092	0.221	0.061	13
29	0.214	0.111	0.153	0.213	19
30	0.108	0.030	0.019	0.032	7
31	0.452	0.226	0.205	0.141	16
32	0.232	0.146	0.119	0.106	12
33	0.113	0.077	0.053	0.244	16
34	0.084	0.143	0.078	0.025	18
35	0.089	0.152	0.284	0.041	16
36	0.124	0.095	0.194	0.028	14
37	0.145	0.098	0.451	0.140	16

LECTURA DE ASSOCIACIONES

TRUQUE DE ANTICUERPOS DE INMUNOGLOBULINAS "A" SECRETADA tabla 4

Paciente	L. macrophilus	S. monoclonalis	C. viscus	A. israelii	A. propionica	R. dentocaryosa	SFU
1	0.015	0.134	0.156	0.553	0.108	0.758	14.000
2	0.041	0.169	0.178	0.078	0.151	0.291	7.000
3	0.134	0.159	0.239	0.233	0.149	0.472	13.000
4	0.129	0.255	0.480	0.229	0.378	0.241	17.000
5	0.193	0.410	0.327	0.124	0.198	0.076	13.000
6	0.015	0.087	0.177	0.238	0.444	0.161	10.000
7	0.011	0.129	0.505	0.270	0.232	0.291	15.000
8	0.016	0.212	0.366	0.270	0.321	0.145	16.000
9	0.059	0.092	0.767	0.315	0.713	0.109	17.000
10	0.260	0.743	0.656	0.187	0.232	0.246	4.000
11	0.034	0.022	0.246	0.411	0.151	0.291	7.000
12	0.526	0.110	0.110	0.661	0.350	0.310	10.000
13	0.134	0.211	0.332	0.318	0.295	0.212	15.000
14	0.050	0.063	0.251	0.142	0.083	0.147	10.000
15	0.129	0.039	0.785	0.267	0.202	0.586	17.000
16	0.064	0.345	0.390	0.109	0.695	0.210	14.000
17	0.104	0.252	0.474	0.125	0.341	0.153	11.000
18	0.268	0.425	0.265	0.525	0.756	0.252	15.000
19	0.054	0.101	0.228	0.172	0.745	0.203	15.000
20	0.290	0.107	0.546	0.358	0.515	0.663	14.000
21	0.129	0.125	0.665	0.420	0.074	0.177	17.000
22	0.192	0.392	0.337	0.104	0.039	0.049	14.000
23	0.119	0.785	0.476	0.299	0.174	0.213	11.000
24	0.299	0.245	0.441	1.266	0.916	0.684	13.000
25	0.286	0.214	0.308	0.685	0.364	0.615	17.000
26	0.031	0.156	0.040	0.469	0.268	0.584	19.000
27	0.319	0.414	0.254	0.531	0.234	0.087	9.000
28	0.294	0.425	0.300	0.287	0.540	0.645	15.000
29	0.160	0.580	0.025	0.141	0.156	0.147	19.000
30	0.141	0.107	0.255	0.114	0.360	0.252	7.000
31	0.394	0.221	0.601	0.259	0.910	0.379	16.000
32	0.318	0.195	1.349	0.321	0.609	0.609	17.000
33	0.293	0.036	0.266	0.067	1.455	0.622	19.000
34	1.299	0.298	0.525	0.281	0.159	0.195	19.000
35	0.060	0.246	0.127	0.198	0.108	0.673	16.000
36	0.260	0.069	0.124	0.282	0.113	0.543	14.000
37	0.695	0.255	0.216	0.351	0.345	0.538	16.000

LECTURA DE ABSORCIENCIAS

REGRESION LINEAL Y ANALISIS DE VARIANZA PARA LA REGRESION.

Variables consideradas:

X= Indice CPU

Y= El titulo de anticuerpos IgA en saliva (ELISA), para cada uno de los microorganismos probados.

ejemplo.

X= CPU

Y= Titulo para Rothia dentocariosa

Regresion lineal.

$$A=b = (\sum Y - n \sum X) / n = 0.4009$$

$$B=b = (n \sum XY - \sum X \sum Y) / (n \sum X^2 - (\sum X)^2) = 0.0026$$

$$r^2 = (n \sum X_i - \sum X)^2 / (n \sum X^2 - (\sum X)^2) \cdot (n \sum Y^2 - (\sum Y)^2) = 0.0014$$

No hay asociacion por regresion.

ANAVA para la regresion.

FV	gl	SC	MC	Fcal
Reg.	1	$SCr = n \sum (XY) + b \sum Y - ((\sum Y)^2 / n)$	$SCr / 1 = MCr$	MCr / MCe
Error	n-2	$SCE = Y^2 - n \sum (XY) - b \sum Y$	$SCE / n - 2 = MCe$	

SCr= 3.095
 SCE= 1.8886
 MCr= 0.05596
 Fcal= 57.35

Criterios considerados

Foritica=(1,n-2,0.05) o al 95% de Confianza

Fcal ≥ Forit Hay asociacion entre variables.

Fcal < Forit No hay asociacion entre variables.

Todos los demas titulos de los microorganismos se hicieron igual.

ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS DE
 LOS TITULOS DE ANTICUERPOS
 DE 1ga SECRETORA ESPECIFICA
 TABLA NO. 5

MICROORGANISMOS	R	F CALCULADA
<u>S. mutans</u>	0.00250	0.0877
<u>S. faecalis</u>	0.0207	0.7431
<u>S. sanguis</u>	0.00246	0.0863
<u>S. salivarius</u>	0.0274	0.9694

Fcrit (1.35, $\alpha=0.05$) (al 95% de confianza)

Fcrit = 4.08

Fcal < Fcrit Hay asociaci3n entre variables

Fcal > Fcrit No hay asociacion entre variables

ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS DE
 LOS TITULOS DE ANTICUERPOS
 DE 1^a SECRETORA ESPECIFICA
 TABLA NO. 6

MICROORGANISMO	R^2	F CALCULADA
<u>L. acidophilus</u>	0.0107	0.3769
<u>A. naeslundii</u>	0.022	0.8
<u>A. viscosus</u>	0.000724	0.025
<u>A. israelii</u>	0.001931	0.6568
<u>A. propionica</u>	0.000002	0.0001
<u>R. dentocariosa</u>	0.001432	57.35
<u>B. fragilis</u>	0.000869	294.77

Fcrit (1,35, $\alpha=0.05$) (al 95% de confianza)

Fcrit = 4.08

$F_{cal} \geq F_{crit}$ Hay asociación entre variables

$F_{cal} < F_{crit}$ No hay asociación entre variables

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

ANÁLISIS DE RESULTADOS.

1.0.- OBTENCIÓN DE ANTIGENO.

1.1.- En cuanto a la obtención de antígeno, de estreptococos por el método de Rantz, Randall, lo más indicado es obtenerlo un poco antes de la utilización del mismo, ya que se contamina muy fácilmente con hongos; o en su defecto congelarlo a -20°C o -70°C , evitando así el desarrollo de microorganismos.

1.2.- Para la cuantificación del carbonhidrato así como para la mayoría de las técnicas es indispensable que el material empleado se encuentre libre de impurezas principalmente orgánicas y residuos de jabón ya que esto interfiere notablemente.

1.3.- Para los antígenos proteicos obtenidos con formaldehído se encontraron algunos problemas al tratar de pegarlos en la placa de microtitulación, ya que el pegado era irregular; por lo que se optó por sonicarlos, resultando satisfactorio.

2.0.- OBTENCIÓN DE IGA SECRETORA APARTIR DE CALOSTRO Y LECHE HUMANA.

2.1.- El volumen empleado para cada corriente fue de 17 a 25 ml. de muestra y se observó que el rendimiento era mayor cuando dicha muestra contenía mayor cantidad de calostro, por lo que se sugiere, que de ser posible la muestra sea únicamente calostro (gráfica 1) y que resulta indispensable

tratar la muestra antes de eluir, a para evitar bloquear la columna.

3.0.- FRACCIONAMIENTO DE LA IgA.

3.1.- Durante el fraccionamiento resulta importante mantener la muestra en baño de hielo al agregar la yodacetamida (fría) y observar que el pH se encuentre en 8 durante toda la hora señalada para ese paso.

4.0.- SEPARACION DE CADENAS PESADAS DE IgA EN SEPHADEX G-100.

4.1.- Es importante observar que el goteo de salida de la columna empacada con sephadex G-100, se encuentre constante, para asegurar que la columna se encuentre empacada y la separación sea mas eficiente (gráfica 2).

5.0.- INMUNIZACION DEL CONEJO CON CADENAS PESADAS DE IgA.

5.1.- Es muy importante realizar la prueba de precipitación en capilar con una pequeña muestra de sangre, 48 horas antes de la fecha de sangrado, ya que si se sangra a blanco con un título muy bajo, el rendimiento de la IgG anti cadenas alfa resulta insuficiente.

5.2.- En este caso el título era bajo, por lo que se reimmunizó, se checo que el título se había incrementado y se sangro a blanco.

6.0.- OBTENCION DE LA FRACCION GAMMA ANTI CADENAS ALFA.

6.1.- Durante la precipitación de la fracción gamma así como para purificar el conjugado, resulta indispensable emplear sulfato de amonio saturado; ya que si no se encuentra saturado, la precipitación no es eficiente, pudiendo precipitar otra proteína y no la fracción deseada.

7.0.- TOMA DE MUESTRA Y LEVANTAMIENTO DEL INDICE CPD.

7.1.- Con respecto al índice CPD, se encontró que sin excepción toda la población estudiada presenta caries dental y que son muy pocos los que han recibido atención odontológica.

8.0.- TITULO DE ANTICUERPOS IgA EN SALIVA (ELISA).

8.1.- Con respecto al método de ELISA se encontró que cualquier cantidad de azida de sodio por pequeña que sea inactiva totalmente a la enzima (peroxidasa de rabano).

8.2.- Durante la preparación de la solución amortiguadora de recubrimiento la literatura indica adicionar 0.2 g. de azida de sodio por litro de solución; inicialmente se preparó el amortiguador de recubrimiento con esas indicaciones, encontrando que las lecturas resultaban incongruentes, ya que en la mayoría de los pozos de la placa de microtitulación presentaban una lectura menor o igual a los testigos.

8.3.- Al emplear un conjugado comercial IgG anti IgA (Cappel), se encontró la misma situación. Se repitió la determinación

- empleando un amortiguador de recubrimiento sin azida de sodio; observandose que la enzima presentaba gran actividad.
- 8.4.- El conjugado obtenido es aceptable comparable con un conjugado comercial Cappel.
- 8.5.- Se trabajo con estas condiciones para las muestras de saliva de todos los adolescentes obteniendose los resultados mostrados en las tablas 3 y 4.
- 9.0.- ESTADISTICA.
- 9.1.- Para la mayoría de las bacterias, estadísticamente no se encontro asociacion alguna entre el indice CPD y el titulo de IgA secretora contra los antigenos probados y que el indice CPD esta determinado casi exclusivamente por el numero de caries que presentan.
- 9.2.- Por analisis de varianza para la regresion se encontro que existe una asociacion fuerte ($F_{cal} = 57.35$ contra una $F_{critica} = 4.08$) entre *Rothia dentocariosa* y el indice CPD y para *Bacteroides fragilis* ($F_{cal} = 221.63$ contra una $F_{critica} = 4.08$).
- 9.3.- Para las demas cepas probadas no se encontro asociacion alguna.
- 9.4.- En el caso de *B. fragilis* y *R. dentocariosa* estadísticamente presenta asociacion con el indice CPD, lo que no podemos considerar en relación a caries pues estos microorganismos estan asociados a procesos parodontales mas

que a caries de superficie.

C O N C L U S I O N E S .

- 1.0.- Se encontro que estadisticamente existe asociacion entre el indice CPD y el titulo de anticuerpos para B. fragilis y B. dentocariosa, pero esto no implica que exista proteccion a la caries para estos microorganismos pues estan mas asociados con procesos de alteraciones parodontales que con caries de superficie.
- 1.1.- Para las demas cepas probadas estadisticamente no existe asociacion, es decir los titulos de anticuerpos que estos individuos presentan no reflejan presencia de caries.
- 1.2.- La totalidad de la poblacion estudiada presenta al menos 4 piezas cariadas y son muy pocos los que han recibido atencion odontologica.
- 2.1.- Clinicamente no existe correlacion, entre el titulo de anticuerpos de tipo IgA y el indice CPD, ya que la IgA corresponde a una respuesta de tipo terciario, por lo que el titulo alto de IgA nos indica una frecuente exposicion al microorganismo.

3.0.- Este estudio no puede ser realizado en un consultorio dental, ya que por sus propias características requiere de técnicas y aparatos especializados, además de no reflejar el índice de caries presente en un individuo.

4.0.- En vista de la presencia de anticuerpos de tipo IgA secretor en los individuos estudiados, se recomienda disminuir la cantidad de bacterias por medio de la implementación de medidas preventivas tales como técnicas de cepillado adecuado y atención odontológica.

B I B L I O G R A F I A.

1. Nolte A W. Microbiología odontológica. 4a. ed. Mexico: Interamericana; 1985
2. Bojallí J L F, Santibañy G G, Rodríguez M, Sosa M J. Microbiología Médica. Mexico: Francisco Méndez Oteo, 1981:1
3. Terrell W R and Eames B W. Plaque accumulation on composite surfaces after various finishing procedures. Oral Health 1975; 65 (12): 29
4. Gibbons R J. Adherence of bacteria to host tissue. Microbiology. Washington: David Sneathinger, 1977
5. Lennette, Balows, Hausler, Truant. Manual de microbiología clínica 3a. ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 1982
6. Crespo J, Curell N, Curell J. Anatomía. Colombia: Osiris Editores, 1990: 70
7. Meneses H P. Mecanismos en que actúan las barreras físicas y químicas a nivel de la cavidad oral, principalmente en la estructura dental y saliva. ENEF ZARAGOZA UNAM. 1985
8. Jawetz E, Melnick L J, Adelberg A E. Microbiología médica. 12a. ed. Mexico: El manual moderno, 1987
9. Berkeley R C W, Lynch J M, Melling J, Rutter P R, Vincent B. Microbial adhesion to surfaces. London Ellis Horwood Ltd; 1980
10. Boyd F R, Hoerl G B. Basic medical microbiology. 2a. ed. Boston: Little Brown and Company, 1981: 681-695
11. Davis B, Dulbecco R, Eisen H N, Ginsberg H S, Wood W B, Mc Carty M. Microbiology. 3a. ed. Philadelphia: Harper International, 1980

12. Stolic P, Beloitca D, Cekic D, Voiovic M. The effects of plaque various microelements and immunoglobulin A from the saliva on dental caries. *Acta. Stomatol. Croat* 1984; 18(1): 23-29
13. Burnett W G, Schuster S G. *Microbiologia oral y enfermedad infecciosa*. edicion para estudiantes. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana, 1982: 207-248
14. Russell W N, Challacombe J S, Lehner T. Specificity of antibodies induced by *Streptococcus mutans* during immunization against dental caries. *Immunology* 1980; 40(1): 97-106
15. Miller W D. *The micro-organisms of the human mouth*. The S. S. White Co Philadelphia 1980
16. Gregory R L, Michalek S M, Filler S J, Mestecky J, Mc Ghee J R. Prevention of *Streptococcus mutans* colonization by salivary IgA antibodies. *J. Clin. Immunol* 1965; 5(1): 55-62
17. Johansson I, Ericson T, Steen L. Studies of the effect of diet on saliva composition of female subject. *J. Nutr.* 1984; 114 (11): 2019-20
18. Dubos R J, Irsch J G. *Bacterial and micotic infections*. 4a. ed. Filadelfia: J B Lippincott Co, 1965
19. Cruickshank R, Duguid J P, Marmion B P, Swain R H. *Actinomyces medical microbiology*. 20a. ed. Churchill Livingstone, 1975; 2: 396-398
20. Petersdorf G R, Adams R D, Braunwald E, Isselbacher K J, Martin J B, Wilson J D. *Harrison principios de medicina interna*. 6a. ed. Mexico: Mc Graw-Hill, 1986: 1: 252-255

21. Acosta G A E. Inmunización contra la caries dental. *Practica odontologica P. O. Simposio cariologia 1986*; 9(11): 31-39
22. Roitt M I, Lehner T. *Immunology of oral diseases*. Great Britain: Blackwell Scientific Publications, 1980: 297-340 y 363-386
23. Barrett T J. *Inmunologia e inmunoquímica*. 4a. ed. Mexico: Nueva Editorial Interamericana, 1965: 28-47 y 101-125
24. Gómez C J F. Sistema IgA secretor. *Practica odontologica P.O.* 1987; 8 (5): 23-26
25. Lehner T, Murray J J, Wintem G B, Caldwell. Antibodies to *Streptococcus mutans* and immunoglobulin levels in children with dental caries. *Archs. Oral Biol* 1978; 23: 691-696
26. Lehner T, Haron J, Bergmeyer L A, Mehler A, Beard R, Dodd M, Mielnik B. Local oral immunization with synthetic peptides induces a mucosa dual IgG and salivary IgA antibody responses and prevents colonization of *Streptococcus mutans*. *Immunology* 1989; 67(3): 419-429
27. Smith R, Lehner T. A radioimmunoassay for serum and gingival crevicular fluid antibodies to a purified protein of *Streptococcus mutans*. *Chin. exp. Immunol* 1981; 43: 417-424
28. Bruno B, Pezzini A, Menegazzi M. Salivary levels of immunoglobulin and dental caries in children. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 1985; 61 (3): 351-366
29. Gregory R L, Filler S J, Michalek S M, Mc Ghee J R. Salivary immunoglobulin and serum antibodies to *Streptococcus mutans* ribosomal preparations in dental caries-free and caries-

- susceptible human subjects. *Infect Immun* 1986 51 (1): 348-351
30. Russell M W, Mestecky J. Potential for immunological intervention against dental caries. *J. Biol. Buccale* 1986; 14 (3) 159-175
31. Lehner T, Menlert A, Caldwell J. Local active gingival immunization by a 3,600-molecular-weight streptococcal antigen in protection against dental caries. *Infect Immun.* 1986; 52 (3): 682-687
32. Rojas M W. *Inmunologia. 2a. ed. Colina. Medellin: 1974: 59-70*
33. Stiles D P, Fudenberg H H, Stobo J D, Vella J V. *Inmunologia basica y clinica. 5a. ed. Mexico: El Manual Moderno. 1986*
34. Bellanti A J. *Inmunologia. 3a. ed. Mexico: Nueva Editoriaal Interamericana, 1986*
35. Tomasi B T, Tan M, Salomon A, Prendergast A R. Characteristics of an immune system common to certain external secretions. Division of Experimental Medicine. Division Burlington, and the Rockefeller Institute 1984; 101-124
36. Hermans IgA in The Ant gens. ed by Sela M. The antigens. United States of America: Academic Press, 1974; 2: 365-501
37. Verman J P, Hermans J F, Bazin H., Secreers A. J. *Immunol* 1975; 114: 265-269
38. Cebra J J, and Small A P. Polypeptide chain structure of rabbit immunoglobulins. III Secretory A-immunoglobulin from colostrum. *Biochemistry* 1957; 6 (2): 503-512
39. Kobayashi K. Studies on human secretory IgA comparative studies of the IgA-bound secretory piece and the free

- secretory piece protein. Immunochemistry. Pergamon Press 1971; 8: 785-800
40. Bach F J. Inmunologia. Mexico: Limusa, 1964: 161-164
 41. Pekovic D D Adamkiewicz V W, Gornistky M. Immunoglobulins in human dental caries. Arch. Oral. Biol 1966; 33 (2): 135-141
 42. Seyfarth M, Lange K P, Frohlich S. Determination of S-IgA y free secretory component in saliva. Allerg. Immunol. Leipz 1986; 32 (1): 41-46
 43. Wood G M, Trejdosiewicz L K, Losowsky M S. ELISA for measurement of secretory IgA distinct from monomeric IgA. Journal of Immunological Methods 1987; 97: 269-274
 44. Herzenberg. Blackwell, Herzenberg. Handbook of experimental Immunology. Immunochemistry. 4a. ed. Great Britain: Blackwell Scientific Publications, 1986: 1: 27.1- 27.20
 45. Voller A, Bidwell D E, Bartlett A. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications. reagent's Perk London NN1 1979: 7-41
 46. Departamento Científico Diagnostica. Enzimoimmunoensayo según el principio de ELISA. Principios y aplicación. Boehringer Mannheim GmbH Rep. Federal de Alemania
 47. O'Beirne J A, Cooper R H. Heterogeneous enzyme immunosay. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 1979; 27 (8): 1148-1162
 48. Wisdow E. Enzyme-immunoassay. Review. Clinical Chemistry 1976; 22 (6): 1243-1255
 49. The enzyme-linked immunosorbent assay. Bull. World Health

Organ 1976; 54: 129-139

50. Diagnostico de salud bucal, Instituto Mexicano del Seguro Social, Subdireccion General Medica, Jefatura de servicios de medicina familiar
51. Holbrook W P, Roos P W. Microbiologia bucal y clinica. Mexico: PLM Cientifica, 1965
52. Dolby A E. Introduction to oral immunology. London: Edward Arnold Publishers, 1961
53. National Canners Association Research Laboratories. Laboratory Manual for food canners & processors. The avi publishing Company, INC 1966: 1
54. Garcia E R, Hernandez T M. Manual para aislamiento e identificacion de bacterias anaerobias. Mexico: Escuela Nacional de Ciencias Biologicas I.F.N., 1959
55. Manual Bioxon. Medios de cultivo y reactivos de diagnostico. Bioxon de Mexico, Mexico
56. Georg H L, Robertstad W G, Brinkman A S. Identification of species of actinomyces. Journal of Bacteriology 1964, 66 (2): 477-490
57. Bowdwn H G, Hardie M J, Fillerg U E. Antigens from Actinomyces species and their value in identification. J. Dent. Res Special Issue A 1976; 55: 193-204
58. Rantz L A, Randall E. Use of autoclave exhrets of hemolytic Streptococci for serological serotyping S. ton Nord med Bull 1955, 13: 180-191
59. Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, Rebers P A, Smith F.

- Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 1956; 28:360
60. Manual de Practicas de Inmunologia. Y D Bustamante. Departamento de Inmunologia, Escuela Nacional de Ciencias Biologicas I.P.N., Mexico: 1975
 61. Lowry H. Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951; 193: 256
 62. Weir D M. Immunochemistry ed by Handboob: of Experimental Immunology third edition. Blackwell Scientific Publicetions, London: 1979
 63. Fleishman J B, Pain R H & Porter R R.Reduction of globulins. Arch. Biochem. Biophys. Suppl 1962; 1: 174
 64. Kabbat & Meyer. Immunochemistry. N. Y.: Saunders, 1978
 65. Volier A, Didwell D, Bartlett A. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In Manual of chinical immunology Roset F 1980; 359-371
 66. Bratthall D, Gannberg L, Krasse E. Method for detecting IgA antibodies to Streptococcus mutans serotypes in parotid saliva. Archs. Oral. Biol. 1978; 23: 843-849
 67. Bergmeyer A L, Lehner T. Lack of antibodies to human heart tissue in sera of rhesus monkeys immunized with Streptococcus mutans antigens and comparative study with rabbit antisera. Infection and Immunity 1983; 1075-1082
 68. Lehtonen D P, Grahn E M, Stahlberg T H, Laitinen L A. Amount and avidity of salivary and serum antibodies against Streptococcus mutans in two groups of human subjets with

- different dental caries susceptibility. *Infect. Immun.* 1984; 43(1): 308-313
69. Wilton J M. Future control of dental disease by immunizations: vaccines and oral health. *Int. Dent. J.* 1984; 34 (3): 177-184
70. Lamb R J, Kontiainen J, Lehner T. Generation of specific T-cell suppressor function induced by *Streptococcus mutans* in monkeys and mice *Infection and Immunity* 1979; 28(3): 903-909
71. Zanders E D, Lamb J R, Kontiainen J, Lehner. Partial characterization of murine and monkey helper, factor to a *Streptococcus* antigen. Blackwell Scientific Publications 1980; 41: 587-596
72. Russell W M, Bergmeier A L, Zanders E D, Lehner T. Protein antigens of *Streptococcus mutans*: Purification and Properties of a double antigen and it's protease-resistant component. *Infection and Immunity* 1980; 28: 486-493
73. Kasper L D, Goroff K D, Kaker J C. Immunochemical characterization of native polysaccharides from Group B *Streptococcus*: The relationship of the type III and group B determinants. *The Journal of Immunology* 1978; 121 (3): 1096-1105
74. Lehner T, Russell M W, Caldwell J, Smith R. Immunization with purified protein antigens from *Streptococcus mutans* against dental caries in rhesus monkeys. *Infection and Immunity* 1981; 34 (2): 407-415