



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

DETERMINACION DE LA IgA
SECRETORA ESPECIFICA, ANTI
ESTREPTOLISINA "O" EN SALIVA, Y SU
RELACION CON UNIDADES TODD
DETERMINADAS EN SUERO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A N

ABARCA AVILA ELENA SOFIA
TREJO LOPEZ JORGE

FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D.F. 1995



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.

**ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO L-313 DE INMUNOLOGIA
CAMPO II DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SEPERIORES ZARAGOZA, UNAM.**

BAJO LA ASESORIA DEL DOCTOR RUBEN MARROQUIN SECURA.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, en particular a los integrantes del laboratorio de Inmunología L-313 donde se desarrollo el trabajo experimental.

Un especial agradecimiento al Dr. Ruben Marroquin Segura por todo el apoyo prestado a la realización del presente trabajo, su excelente guía y aporte inagotable de conocimientos.

MI MAS SINCERO AGRADECIMIENTO AL JURADO

PRESIDENTE	DR. RUBEN MARROQUIN SEGURA
VOCAL	BIOL. CARLOS BAUTISTA REYES
SECRETARIO	Q.F.B. JOSE LUIS A. NORA GUEVARA
SUPLENTE	Q.F.B. HUGO LEYNES CELISEO
SUPLENTE	Q.F.B. YOLANDA FLORES CABRERA

DEDICATORIA

Dedico este trabajo :

A mis Padres:

Esperanza y Jorge

Por brindarme la oportunidad de estudiar y superarme, apoyandome en todo momento en mis decisiones. Por ustedes he logrado una de las metas más valiosas de la vida.

A mis Hermanos:

José, Martha, Sofía, Arturo, Lourdes y Christian

Por la confianza que siempre han tenido en mí para la realización de mis estudios, pero sobre todo por la alegría de ser una familia.

A mi Madre, porque gracias a ella estoy logrando una de mis metas más importantes (ahora que lo puedes ver) y por supuesto a mi Padre, que aunque ya no está entre nosotros se que se hubiera sentido orgulloso de su hija.

A mis hermanos Guillermo, Julio, Aurora y Federico, porque no se imaginan el ejemplo enorme que he recibido de ellos, cada uno a su manera.

A Agustín por el apoyo incondicional, su amor y cuidados que ha tenido para conmigo. Te quiero.

A todos mis profesores que me hicieron el honor de compartir conmigo un poco de su sabiduría.

A mis amigos de la escuela Raquel, Felicitas, Enedina, Elena, Angel, Felipe por contagiarme sus ánimos de seguir adelante.

Y finalmente a esa personita que con su gran ejemplo me enseñó lo valiosa y hermosa que es la vida: Gracias Memitó.

INDICE

INTRODUCCION 1

GENERALIDADES 2

Componentes bioquímicos de estreptococos del grupo A, relevantes en reacción cruzada con antígenos del humano. 3

Acido hialurónico 3

Proteína M 3

Carbohidratos 3

Antígeno de membrana 3

Antígeno de histocompatibilidad 5

ASOCIACION A ENFERMEDADES 6

Fiebre reumática 6

Frecuencia 6

Cuadro clínico 6

Patología 7

Diagnóstico 7

Diagnóstico diferencial 8

Artritis crónica juvenil 8

Septicemia y endocarditis bacteriana aguda 8

Leucemia aguda y linfomas 8

Tratamiento 9

SISTEMA INMUNITARIO DE LAS MUCOSAS 11

Inmunoglobulinas 12

Inmunoglobulina A (IgA) 12

Polimerización de IgA 14

Componente secretor 14

Propiedades de la región Fc 14

Transporte de la IgA 14

Inmunoglobulina G (IgG) 14

ENZIMA INMUNOENSAYO: ELISA 18

Generalidades 18

Aplicaciones para ELISA 19

Ensayos para anticuerpos 19

Método indirecto 19

Método competitivo 20

Ensayos para antígenos 20

Método competitivo 20

Método de doble anticuerpo 21

ANTIESTREPTOLISINAS 23

Generalidades 23

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 24

FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA 25

HIPOTESIS 26

OBJETIVOS 27

MATERIAL 28

DISEÑO EXPERIMENTAL 32

Purificación de antiestreptolisina por medio de
Sephadex G-100 32

Actividad biológica 32

Determinación de proteínas 32

Método de ELISA 33

Colecta de la muestra 34

RESULTADOS 36

DISCUSION 71

CONCLUSIONES 74

RECOMENDACIONES 75

BIBLIOGRAFIA 76

INTRODUCCION

Se realizó un estudio clínico experimental en 45 muestras de saliva y suero de pacientes sanos (de ambos sexos) , para evaluar absorbancias de IgG e IgA secretora específica antiestreptolisina "O" y su comparación con las unidades Todd determinadas en suero. Se estandarizó el método indirecto de la técnica de ELISA, para establecer las concentraciones óptimas de reactivos, encontrándose que: en una concentración de estreptolisina de 0.25 mg/ml, con una dilución de suero de 1:100 y la saliva sin dilución se obtienen absorbancias de entre 0.5-0.6 a 409 nm para ambos tipos de muestra.

Se compararon los resultados del análisis por ELISA con los valores en unidades Todd de suero empleando el método de regresión lineal y análisis de varianza para la regresión, encontrándose que no existe correlación lineal entre las unidades Todd y los valores encontrados para la IgA sérica, IgA secretora e IgG salival, únicamente se relaciona linealmente con la IgG específica sérica

FALLA DE ORIGEN

EN SU TOTALIDAD

GENERALIDADES

Los estreptococos son células esféricas u ovaladas que se presentan en parejas, en cadenas largas o cortas, gram positivas.

Estos pueden clasificarse con base a su acción sobre el agar sangre, por sus propiedades metabólicas, actividad fisiológica, por reacciones serológicas de aglutinación y precipitación.

1. Por su acción sobre la sangre, en placas sembradas y cultivadas a 37°C durante 24-48 hrs. , se clasifican en:

a) Alfa-hemolíticos. Producen un halo verdoso alrededor de la colonia, y hemólisis parcial de los glóbulos rojos inmediatos a ella (Streptococcus salivarius).

b) Beta-hemolítico. Las colonias se rodean de una zona clara, bien definida de hemólisis (Streptococcus pyogenes).

c) Gamma-hemolítico. Carece de actividad hemolítica, no altera el medio (Streptococcus lactis).

2. Por su actividad fisiológica y propiedades metabólicas.

a) Piógeno, incluye Streptococcus pyogenes y otros agentes causantes de infecciones agudas y mortales.

b) Viridans, incluye agentes de las infecciones como endocarditis bacteriana subaguda.

c) Láctico, no patógeno de importancia industrial.

3. Con base en los métodos serológicos de precipitación (Clasificación de Lancefield), los estreptococos se dividen en grupos (A, B, C etc.) y éstos a su vez en tipos. Los antígenos del grupo son sustancias polisacáridas o ácido teicoico de la pared celular; lqs de tipo son proteínas o carbohidratos de la envoltura o cápsula.^{1,2}

El Streptococcus pyogenes (Beta-hemolítico, grupo A) se puede aislar de boca, nariz, garganta y ocasionalmente piel. Puede provocar faringitis, neumonía, abscesos, escarlatina, erisipela, endocarditis aguda, fiebre puerperal y septicemias.

Una característica de los estreptococos grupo A es su capacidad para producir secuelas no supurativas en individuos susceptibles. Las cuales son fiebre reumática y glomerulonefritis.³

El término de homología estructural entre tejidos de mamíferos y microorganismos ha sido descrita hace 50 años, éste, mimetismo molecular, se acuñó hace 20 años para describir estructuras antigénicas comunes al hospedero y parásitos.⁴ El término se ha

extendido para incluir a otros microorganismos y el conocimiento del fenómeno se ha incrementado con nuevas técnicas inmunoquímicas y de biología molecular. Con respecto a las similitudes antigénicas entre los estreptococos del grupo A y su hospedero natural, el humano, tenemos diferentes tejidos dando una reacción cruzada: articulaciones, miocardio, tejido valvular, sarcolemma neocardial e íntima vascular, piel, riñón, cerebro, y muy probablemente antígenos HLA.⁵

Componentes bioquímicos de estreptococos del grupo A, relevantes en reacción cruzada con antígenos del humano.

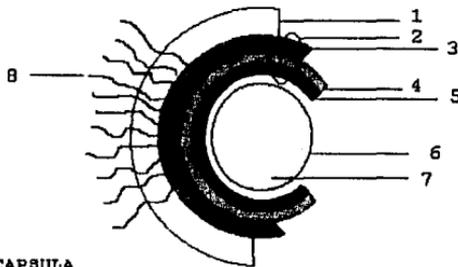
Acido hialurónico. Filleit , observó que los sueros de pacientes con nefritis posestreptococcica contenían anticuerpos que daban reacción cruzada con proteoglicanas glomerulares. Esos anticuerpos fueron parcialmente inhibidos por hialuronato, sugiriendo que algunos de los anticuerpos pudieran ser dirigidos contra el ácido hialurónico de la cápsula del estreptococo.⁶⁻⁸

Proteína M. Lancefield estableció que la proteína M es un importante factor de virulencia en las infecciones por estreptococos del grupo A, en el humano.⁹ Se ha reportado una homología importante entre péptidos de proteína M de estreptococos del grupo A y proteínas humanas, así tenemos por ejemplo que: Sargent demostró que los residuos de la región AA, péptidos 164-197 extractos de péptidos altamente purificados de proteína M5 (pepM5) daba una reacción cruzada con proteína de sarcolemma de aproximadamente Kd;¹⁰ en contraste residuos sintéticos M5 daban reacción cruzada con miocina.^{11,12}

Carbohidratos. La estructura de los carbohidratos del grupo A consiste de aproximadamente nueve unidades repetidas de ramnosa unidas a cadenas de N-acetilglucosamina, este polisacárido esta presente en muchos tejidos de mamíferos ¹³. Goldstein demostró que la reactividad cruzada entre carbohidratos de estreptococos del grupo A y las glicoproteínas de válvula fue recíproco. Por ejemplo tanto por inmunodifusión como por inmunofluorescencia la reactividad del suero a estreptococos del grupo A, fué absorbida al 100 % por carbohidrato del grupo A, mientras que la glicoproteína presentó una absorción del 50 %.^{14,15}

Antígeno de membrana. Zabriskie y Freimer Inmunizaron conejos con membranas de estreptococos libres de pared celular y los anticuerpos obtenidos daban una reacción cruzada con antígenos cardíacos humanos, músculo esquelético y músculo liso de vasos sanguíneos.¹⁶ Cunningham, inmunizando ratones con membranas de estreptococos y obteniendo monoclonales, encontró que algunos de éstos monoclonales reaccionaban con la cadena ligera de la meromicina y sorprendentemente se unían a queratina y DNA.^{17,18} Husbyl observó que la mayoría de sueros de pacientes con corea de Sydenham, específicamente tenían los citoplasmas de los núcleos subtalámicos y caudados. La asociación de los estreptococos y la corea se estableció firmemente, cuando esos anticuerpos podían ser completamente absorbidos por antígenos de membrana de estreptococos y se encontraron específicos para estructuras de estreptococos del grupo A.¹⁹ Fitzsimmons, inyectando ratones con membranas de estreptococos

ESTRUCTURA ANTIGENICA DE LA CELULA ESTREPTOCOCICA GRUPO A



1. CAPSULA
2. PARED CELULAR
3. ANTIGENOS PROTEINICOS (M, T Y R)
4. GRUPO DE CARBOHIDRATOS (RAMNOSA -N-ACETILGLUCOSAMINA)
5. MUCOPEPTIDOS
6. MEMBRANA CITOPLASMICA
7. CITOPLASMA
8. PILIS RECUBIERTOS CON AC. LIPOTEICOICO

Fig. 1 Representación esquemática de la estructura del *Streptococcus* de grupo A
Fuente: Referencia 5

aisló un anticuerpo monoclonal que se unía específicamente a antígenos de membrana basal renal.²⁰

Antígenos de histocompatibilidad. Ellis demostró que los ratones previamente inmunizados con membranas de estreptococos rechazaban en forma aguda los injertos de corazón embrionario heterólogo, mientras que los ratones que se volvían tolerantes a dosis altas de proteínas de membrana, el injerto del órgano sobrevivía por 45 días que duro el experimento.²¹ Ayoub y Anatsiou-Nana encontraron una asociación entre la presencia de fiebre reumática y el antígeno HLA-DR4 en pacientes blancos americanos y el HLA-DR2 en pacientes negros americanos.^{22,23} Jhingan, encontró una asociación entre el HLA-DR3 y la fiebre reumática en enfermos del norte de la India.²⁴ Forsber y Jhonson encontraron una relación entre hombres de edades de 16-25 años con glomerulonefritis progresiva a una falla renal crónica y el HLA-B40, esos pacientes tenían asociado un aumento en el título de antiestreptolisina O, esta asociación no se observó en hombres o mujeres de más de 25 años.²⁵

Como se puede observar hay tres condiciones en el mimetismo molecular microorganismo-huesped que nos conduce a la enfermedad:

1. La reacción cruzada entre el microorganismo y el huesped.
2. La respuesta inmune humoral/celular anti-antígeno propios que son compartidos por un microorganismo.
3. Una predisposición genética a la enfermedad en el huesped.²⁶

ASOCIACION A ENFERMEDADES

Fiebre reumática. Se ha demostrado ampliamente que los estreptococos del grupo A tienen antígenos de reacción cruzada, con tejidos de corazón, articulaciones, piel y núcleos caudados en cerebro. Los sueros de pacientes con fiebre reumática aguda, tienen esos anticuerpos de reacción cruzada los cuales están presentes durante la enfermedad estos desaparecen durante el período de apagamiento y reaparecen durante las recurrencias.

Glomerulonefritis posestreptococcica. Markowitz fué capaz de inducir glomerulonefritis en monos seguida de su inmunización con fracciones de membrana de estreptococos que se conocen dan reacción cruzada con el glomérulo humano, encontro que un número de pacientes con glomerulonefritis posestreptococcica reaccionaban a la proteoglicana de la membrana basal renal y el determinante inmunodominante fue la parte sulfato de la proteoglicana.^{27,7}

FIEBRE REUMATICA

Se trata de un proceso inflamatorio no supurativo, relacionado con la infección de las vías aéreas superiores por diferentes tipos del estreptococo de grupo A, que afectan fundamentalmente al tejido conectivo de articulaciones, tejido cardiaco, sistema nervioso y tegumentos. Puede ser inducida por cualquier tipo de estreptococo de los más de 50 conocidos, pero siempre del grupo A, aunque no se conoce si entre ellos existen diferencias en su virulencia; se cree que debido a una mayor riqueza en los antígenos somáticos, proteína M y ácido glicerooleicoico, que presentan mayor adhesividad a las células epiteliales, se encuentra en mayor manifestación general de fiebre reumática.²⁸

Morfológicamente, la fiebre reumática se caracteriza por lesiones inflamatorias focales localizadas principalmente en el tejido conectivo de los órganos afectados. En el corazón, las lesiones son particularmente distintivas y se conocen como cuerpos de Aschoff.²⁹

1. Frecuencia

La fiebre reumática es una enfermedad de distribución universal, si bien es más frecuente en países fríos y templados, que en regiones tropicales; teniendo mayor incidencia en los meses de invierno y primavera. Recientemente se ha observado una disminución de la incidencia debido al uso de la penicilina y a factores higiénicos, sin embargo en los países del tercer mundo sigue siendo el primer problema epidemiológico cardiaco.^{30,31}

2. Cuadro clínico

El comienzo puede ser brusco con fiebre elevada, hinchazón elevada de las articulaciones, especialmente rodillas, tobillos, muñecas y caderas, mientras que las pequeñas articulaciones están menos afectadas con la particularidad de que el dolor y la hinchazón son de carácter errático. El aspecto más temido de la fiebre reumática es el desarrollo de carditis, interesando preferentemente el endocardio, miocardio y menos frecuentemente el pericardio. La

endocarditis se traduce en apagamiento de los tonos y la localización de soplos que indican la infección de la válvula mitral y aórtica, rara vez la tricúspide. La afección miocárdica se manifiesta por cardiomegalia, insuficiencia cardíaca, alteraciones del ritmo y del electrocardiograma. La pericarditis por dolor preesternal, auscultación de roces y alteraciones electrocardiográficas.

Rara vez la fase aguda de la carditis y frecuentemente pasados unos meses se pueden manifestar alteraciones por parte del sistema nervioso central, que adopta el cuadro de Corea de Sydenharn, caracterizado por movimientos espasmódicos desordenados, no repetitivos, que afectan toda la musculatura voluntaria, incluida la cara y la lengua.³²

3. Patología

En la fiebre reumática el corazón se afecta casi en el 90% de los casos, de esta proporción más del 50% se afecta al endocardio, la lesión se inicia por una tumefacción de las fibras del tejido conectivo de la submucosa que posteriormente sufre una lisis y degeneración fibrinoide, que cuando alcanza la válvula mitral, sigmoidea aórtica y rara vez la tricúspide produce formaciones verrucosas en sus bordes libres y en sus pilares.

La lesión característica de la fiebre reumática es el nódulo de Aschoff, que comprende una zona localizada de inflamación, con depósito central de material fibrinoide amorfo rodeado de un infiltrado de células mesenquimatosas.²⁹ Se presenta en el tejido intersticial en cualquier parte del corazón, pero fundamentalmente cerca de los vasos. Comienza siendo una acumulación de células redondas (prenódulo) con degeneración fibrinoide de la sustancia fundamental. Ya formado el nódulo de Aschoff presenta células de bordes irregulares, generalmente con núcleo en forma de lechuga, varias células gigantes multinucleadas y otras pignóticas; todo este conjunto celular queda englobado por una capa de células polimorfonucleares, plasmáticas o linfocíticas. Se ha demostrado que el nódulo de Aschoff es una lesión debida a la destrucción y regeneración de las fibras miocárdicas y no auténtica lesión del tejido conectivo.²⁸

4. Diagnóstico

El diagnóstico suele depender de la aparición de dos o más fenómenos sugestivos denominados "criterios de Jones". Se admite en general, que puede establecerse el diagnóstico de fiebre reumática, cuando por lo menos el paciente presenta dos de los principales criterios mayores o uno mayor y dos menores. (Ver cuadro 1).

Los estudios que pueden ser útiles en el diagnóstico, incluyen cultivo de exudado faringeo y estudios en busca de anticuerpos contra estreptolisina O (título de antiestreptolisina O). La medición de anticuerpos contra otros productos del estreptococo como serían la hialuronidasa a veces son útiles si los títulos de antiestreptolisina O son normales. Los estudios hematológicos pueden mostrar decremento en la hemoglobina, leucocitosis y aumento de la cifra de velocidad de eritrosedimentación.

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL

Es importante diferenciar la fiebre reumática de otras causas, así como de dolor de huesos y articulaciones en niños.

Artritis crónica juvenil

Se debe distinguir la enfermedad de Still o artritis juvenil de comienzo generalizado, de la fiebre reumática. En la enfermedad de Still la fiebre es intermitente, a diferencia de la hipertermia sostenida de la fiebre reumática; además no aparece el eritema marginado y en la fiebre reumática tampoco hay signos como la linfadenopatía. La artropatía de la fiebre reumática suele ceder en término de cuatro semanas, de modo que la artritis que persista más de esa fecha, posiblemente tenga, otra causa.

Septicemia y endocarditis bacteriana aguda

La presencia de los dos padecimientos se excluirá por medio de cultivos de sangre en todo niño con fiebre y soplos cardiacos.

Leucemia aguda y linfomas

Los dos padecimientos pueden acompañarse de fiebre y dolor en huesos y articulaciones. El diagnóstico por lo regular se hace por estudio de un frotis de sangre periférica. ^{28,29,32}

Cuadro 1. Criterios de Jones.

Guía para el diagnóstico de fiebre reumática.

Manifestaciones mayores	Manifestaciones menores
	Clinicas
Carditis	Fiebre reumática previa o cardiopatía reumática
Poliartritis	Artralgia
Corea	Fiebre
Eritema marginado	Leucocitocis, proteína CR aumento de VSG.
Nódulos subcutáneos	Aumento de PR

Fuente: Referencia 29

5. Tratamiento

El reposo en cama es importante en el tratamiento de un ataque agudo, particularmente si hay carditis. Suelen bastar una o dos semanas de reposo en cama si hay una sola artropatía, pero a veces se necesitan varios meses de descanso en las formas más graves de carditis. Se emprende la administración de penicilina V durante 10 días, para eliminar los estreptococos hemolíticos reiduales.

La fiebre y la artropatía suelen ceder con dosis diarias de 80 a 100 mg de aspirina/kg de peso corporal, pero tal fármaco no tiene efecto alguno en la carditis. Se reservan los corticosteroides ingeribles para personas con formas graves de carditis que también muestran insuficiencia cardíaca, aunque es punto de controversia si tales fármacos en realidad disminuyen al daño al corazón. Se utilizan dosis de prednisolona de 1 a 2 mg/kg de peso corporal. A veces se necesitan diuréticos y digoxina.

Después del primer ataque de fiebre reumática se administran antibióticos durante largo tiempo, con fines profilácticos, contra nuevas infecciones estreptocócicas y se recurre a dosis de 125 a 200 mg de penicilina V dos veces al día, por la boca; 1.2 millones de unidades de penicilina benzatínica cada mes, por vía intramuscular, o 1 g de sulfadiazina al día por vía bucal. La sulfadiazina tiene la ventaja teórica de que en caso de surgir endocarditis bacteriana subaguda a pesar de la antibioticoterapia en sujetos con cardiopatía

reumática crónica, cuando menos los microorganismos no resultaran resistentes a la penicilina. Si ha habido carditis se continúa indefinidamente la profilaxia con antibióticos. En caso de ataque cardiaco se continúa la profilaxia antibacteriana hasta la edad de 16 años. Las personas que han mostrado carditis también necesitan protección con antibióticos para evitar la endocarditis bacteriana después de extracción de piezas dentarias u otras formas de cirugía.²⁹

SISTEMA INMUNITARIO DE LAS MUCOSAS

El sistema inmunitario de las mucosas está compuesto de tejidos linfoides que se relacionan con las superficies mucosas de los aparatos digestivo, respiratorio y urogenital. Ha evolucionado bajo la influencia del conjunto antigénico complejo y distintivo presente en el área de las mucosas, y se puede distinguir del sistema inmunitario sistémico, por las siguientes características:

- A) Una inmunoglobulina relacionada con las mucosas, la IgA.
- B) Células T con propiedades reguladoras o efectoras específicas para la mucosa.
- C) Sistema de tráfico celular orientado hacia las mucosas, para células que se indujeron, al principio, en los folículos de la mucosa migran hacia los tejidos linfoides difusos de la mucosa subyacente del epitelio.

La función primaria del sistema inmunitario de las mucosas es proporcionar defensa al individuo en las superficies mucosas. Esta función, se opera en conjunto con diversos factores protectores no inmunitarios como son :

1. Flora bacteriana residente que inhibe el crecimiento de patógenos potenciales.
2. Actividad mucosa motriz (peristalsis y función ciliar) que mantiene el flujo de constituyentes de la mucosa, y reduce la interacción de patógenos potenciales con células epiteliales.
3. Sustancias tales como ácido gástrico sales biliares intestinales que crean un ambiente, en las mucosas, desfavorables para crecimiento de los patógenos.
4. Secreciones mucosas (glucocáliz) que forma una barrera entre los patógenos potenciales y las superficies epiteliales.
5. Sustancias como lactoferrina, lactoperoxidasa y lisozimas que tienen efectos inhibitorios sobre uno u otro microorganismo específico.

Una segunda función del sistema inmunitario de las mucosas, es evitar la entrada de antígenos por esta vía y proteger así el sistema inmunitario sistémico de exposición antigénica inadecuada. Esto se presenta en la superficie de la mucosa al prevenir la entrada de materiales potencialmente antigénicos, y en la circulación eliminar antígenos de las mucosas a través del sistema hepático de eliminación.³³

Inmunoglobulinas

Los anticuerpos son un grupo heterogéneo de proteínas séricas denominadas inmunoglobulinas (Ig), la mayor parte de las cuales emigran, durante la electroforesis, como gammaglobulinas.

Las dos características principales de las inmunoglobulinas son la especificidad de cada una por una estructura antigénica particular, y su diversidad como grupo, que enfrenta el reto de una amplia gama de estructuras antigénicas en el ambiente. Aparte de unirse específicamente a los antígenos, las inmunoglobulinas presentan actividades biológicas secundarias que son importantes en la defensa contra la enfermedad, por ejemplo, fijación de complemento, paso a través de la placenta y facilitación de fagocitosis. Son heterogéneas con respecto a estas cualidades que son independientes de la función captadora de antígeno de las inmunoglobulinas.

Las inmunoglobulinas son glucoproteínas y tienen una estructura simétrica básica de cuatro cadenas, compuesta de dos cadenas idénticas pesadas (Heavy, H) y dos idénticas ligeras (Light, L), que están unidas de manera covalente por enlaces de disulfuro. Las cadenas se pliegan en dominios que consisten de cerca de 100 aminoácidos, cada uno de los cuales está estabilizado por un puente interno de disulfuro, para formar una estructura simétrica bilateral.³⁶ Ver figura no. 2

Se han identificado en el suero humano cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Estas clases se distinguen con base en sus propiedades electroforéticas y serológicas.

Las inmunoglobulinas están presentes no sólo en suero sino también en diversas secreciones corporales tales como saliva, secreciones nasales, sudor, calostro y leche materna. La IgA es la inmunoglobulina predominante en las secreciones externas de la mayor parte de las especies, ésta por lo general existe en el suero humano como unidad de cuatro cadenas (monomero); con peso molecular de cerca de 160,000 (7S)³⁴⁻³⁶ Ver figura no. 4

Inmunoglobulina A (IgA)

La IgA es la inmunoglobulina predominante en el sistema inmunitario de las mucosas. Cada molécula de de IgA secretora consiste de dos unidades básicas de cuatro cadenas, y una molécula de componente secretor y otra de cadena J. El peso molecular de la IgA secretora es de cerca de 400,000. La IgA secretora provee el mecanismo primario de defensa contra algunas infecciones locales debido a su abundancia en saliva, lágrimas, secreciones bronquiales, mucosa nasal, líquido prostático, secreciones vaginales y secreciones mucosas del intestino delgado.

La IgA normalmente existe en el suero en formas monomérica y polimérica, y constituye cerca del 15% del total de las inmunoglobulinas séricas

La IgA manifiesta tres características estructurales que se relacionan específicamente con su función de inmunoglobulina de las mucosas:

1. **Polimerización de IgA.** La cadena pesada de IgA junto a la cadena pesada de IgM, tiene un residuo extra de cisteína en el dominio C-terminal. Este dominio permite que la IgA interactúe con una molécula bivalente (o multivalente), también producida por células B, conocida como cadena J (joining, J) para formar dímeros y trímeros de IgA. La polimerización de IgA es importante para la función de esta inmunoglobulina, ya que la IgA polimerizada tiene un incremento en la capacidad para captar y aglutinar antígenos.

2. **Componente secretor.** Sólo la IgA dimerizada puede reaccionar con el componente secretor (SC), proteína (PM 95,000) producida por células epiteliales. El componente secretor actúa como un receptor de transporte para la IgA y forma parte de la molécula IgA secretada. Hace a la molécula de IgA menos susceptible a la digestión proteolítica y más mucófilica, incrementando la capacidad de la IgA para interactuar con patógenos potenciales, y prevenir su unión a la superficie epitelial.

3. **Propiedades de la región Fc.** El dominio Fc de la IgA se caracteriza por ciertas propiedades, éste no reacciona con componentes de la vía clásica o alterna del complemento, excepto quizá cuando la IgA está muy polimerizada o en forma de complejo inmunitario.

TRANSPORTE DE LA IgA

La secuencia de eventos que se presentan durante el transporte de IgA comprende, primero, la captación de la IgA polimérica al SC en la superficie basolateral de la célula epitelial, seguido de endocitosis de IgA en vesículas, desplazamiento de tales vesículas que contienen IgA hacia la superficie apical de la célula y, finalmente la liberación de complejos IgA-SC en el lumen de la mucosa. Este último paso requiere ruptura de la molécula receptora para IgA. La síntesis celular y translocación de SC es independiente de la presencia de IgA y, por lo general, excede la cantidad necesaria para el transporte, lo que lleva a la secreción de SC libre. (Ver figura no. 3).

El transporte de IgA mediado por SC se presenta en el epitelio del aparato digestivo, glándulas mamarias lactantes, mucosa bronquial y glándulas salivales.^{37,38}

Inmunoglobulina G (IgG)

Otras inmunoglobulinas distintas de IgA también desempeñan una tarea importante en el sistema inmunitario de las mucosas. La síntesis de la IgG en mucosas es bastante baja en la mayor parte de las áreas de las mucosas, y la IgG no se puede transportar a través del epitelio, sin embargo, tiene su función en las mucosas; se sintetiza en cantidades sustanciales en el aparato respiratorio distal, y es una clase importante de anticuerpo en las secreciones pulmonares, donde quizá entra por difusión pasiva.

COMPONENTE SECRETOR

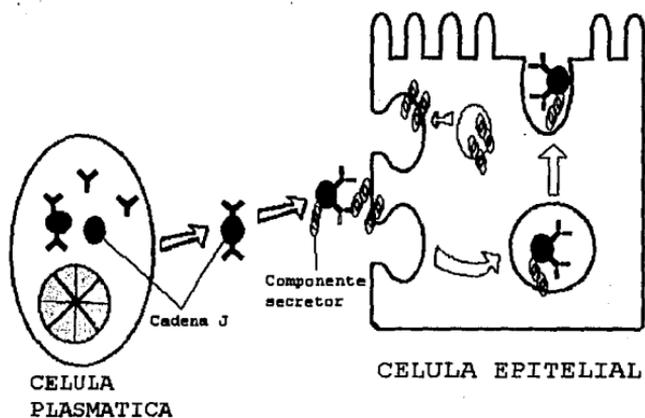


Fig. 3 Transporte de IgA a través de la célula epitelial, mediado por el componente secretor. La síntesis del componente secretor dibujado como espirales es -- independiente del proceso de transporte, y el componente secretor se libera a la superficie luminal sin importar si está o no unido a IgA. El transporte de IgA por este proceso no da como resultado su degradación.
Fuente: Referencia 38

La inmunoglobulina G (IgG) en adultos normales constituye cerca del 75% de las inmunoglobulinas séricas totales. dentro de la clase IgG, las concentraciones relativas de las cuatro subclases son las siguientes: IgG1, 60 a 70 %; IgG2, 14 a 20 %; IgG3, 4 a 8 % e IgG4 2 a 6 %. Ver figura no. 4

La IgG es la única clase de inmunoglobulina que puede atravesar la placenta en humanos, y es responsable de la protección del recién nacido durante los primeros meses de vida.³⁵

TIPOS DE INMUNOGLOBULINAS

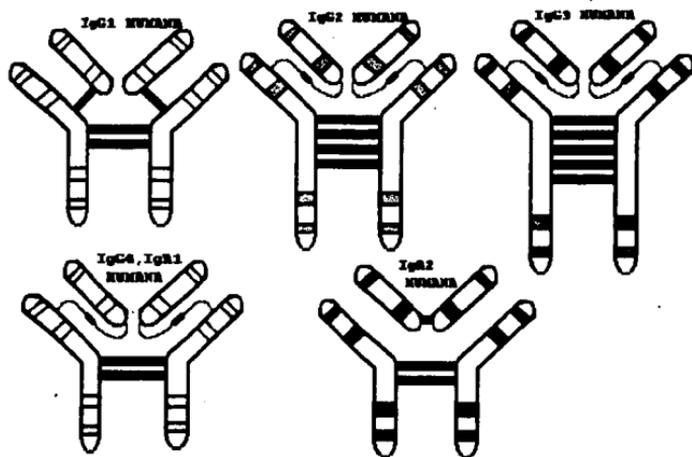


Fig. 4 La inmunoglobulina humana puede aparecer como monómero (IgG, IgA, IgA2, IgD), como dímeros (IgA) o como pentámeros (IgM). La estructura depende de la secuencia de aminoácidos y del patrón de los puentes disulfuro que tengan las moléculas.

Fuente: Referencia 36

ENZIMA INMUNOENSAYO (Enzime-Linked ImmunoSorbent Assay :ELISA)

Los ensayos con reactivos marcados han jugado un papel importante en el laboratorio de diagnóstico. La inmunofluorescencia es ampliamente usada en la detección de anticuerpos y antígenos en enfermedades infecciosas y procesos autoinmunes, y el radio inmunoensayo en el ensayo de drogas y hormonas.

El sistema de pruebas que involucra el uso de antígenos, haptenos, o anticuerpos marcados con una enzima ha sido recientemente aplicado a la cuantificación de sustancias en los fluidos biológicos. Estos sistemas de pruebas han recibido varios nombres: inmunoensayo (EIA), enzima unido a inmunoensayo, enzima marcado inmunoensayo, enzima acoplada inmunoensayo, ensayo inmunoenzimático, y enzima unida inmunoabsorbido ensayo (ELISA).

El enzima inmunoensayo tiene dos tipos principales: Homogéneo y Heterogéneo.³⁹ En las pruebas homogéneas la enzima esta conjugada con un hapteno, cuanto éste conjugado reacciona con el anticuerpo, la actividad enzimática se altera. La principal característica de este ensayo es que no se requiere de la separación del complejo libre, pero se restringe por el bajo peso molecular de las sustancias.

En los enzima inmunoensayos heterogéneos el paso esencial es la separación del reactivo enzima-marcado unido del reactivo enzima-marcado libre. Estas pruebas dependen de los factores existentes entre anticuerpos o antígenos unidos a la enzima con los complejos reactantes tanto inmunológicamente como en actividad biológica.⁴⁰

En estos ensayos el anticuerpo es usualmente atrapado en una fase sólida de soporte para permitir de esta manera la separación de los reactivos unidos y libres. Se ha encontrado que tanto los antígenos como los anticuerpos pueden ser covalentemente atrapados a material particulado: tal como celulosa y policrilamida, y esta adsorción pasiva puede ser obtenida en tubos, cuentas, discos o microplacas hechas de nylon, poliestireno, polivinilo o polipropileno. Como se mencionó anteriormente, una parte esencial del enzima inmunoensayo es el conjugado de anticuerpo (o hapteno) unido a la enzima.

Es necesario que la enzima tenga una alta actividad, ser barata y obtenible en forma pura, y tener una reacción con el sustrato que pueda ser fácilmente medida. Las enzimas que más datos satisfactorios aportan son peroxidasa de rábano, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, y fosfatasa alcalina. Estas son unidas a anticuerpos o antígenos por medio de glutaraldehído o peryodato.⁴¹ Los conjugados hechos de esta forma muestran ser más estables por meses inclusive por años.

La selección del sustrato es crítica, deben ser estables y solubles antes y después de la degradación. Los sustratos cromógenos deben ser incoloros inicialmente y mostrar coloración después de la degradación.

Aplicaciones para ELISA

En principio la ELISA puede ser usado para la prueba de muchos anticuerpos, si el antígeno específico es satisfactoriamente inmovilizado en la fase sólida.

A la fecha la ELISA a sido usada especialmente en el área de procesos infecciosos.

A principios de los setentas anticuerpos para bacterias tal como *Salmonellas* y *Vibriosis* fueron medidos por ELISA, y más tarde fué aplicado en serología de *Brucella*, *Neisseria*, *Klebsiella*, *Chlamydia* y *Treponema*, para infecciones de *Mycobacterias* y *Rickettsias* (Carlsson, H.E. y A.A. Lindberg.). La respuesta humoral para la vacuna de tetanos y diphteria a sido tambien ensayada por ELISA.⁴²

El método indirecto en microplaca ha dado excelentes resultados en la serología de rubeola y citomegalovirus, y específicamente anticuerpo IgM, pues es indicativo de infección reciente.⁴³

Algunas técnicas similares pueden ser usadas para anticuerpos de Toxoplasma y Herpes virus, parece ser que ELISA es un promisorio candidato para la TORCH, programa de rastreo usado para la detección simultánea de anticuerpos contra Toxoplasma, virus de la Rubeola, Citomegalovirus y Herpes virus en neonatos y mujeres embarazadas.

Los procesos parasitarios también han sido probados por la técnica de ELISA y éste es un método inminentemente usado en países en desarrollo, donde no es aplicable el radioinmunoensayo. ELISA ha sido descrito para malaria, *trypanosomiasis* y *schistosomiasis* por nombrar algunas enfermedades infecciosas tropicales.

La respuesta humoral en procesos autoinmunes es importante el diagnóstico y monitoreo del progreso de los pacientes. Para este fin, el sistema de ELISA se ha desarrollado para el ensayo de anticuerpos para DNA, histona, y triglobulina, y para detectar complejos inmunes y factor reumatoide.

Es especialmente en la endocrinología el área donde el enzima-inmunoensayo de antígenos ha sido más promovido, para las hormonas proteicas como la HGC, Hormona luteínica, Hormona foliculo estimulante, lactógena placentaria humana, e insulina, y pruebas para esteroides, estrógenos, progesterona, testosterona y cortisol. Muy pocas drogas han sido tambien medidas por técnicas similares. Otra área de mayor aplicación del inmunoensayo es para la detección de proteínas oncogénicas.⁴³

I. ENSAYOS PARA ANTICUERPOS

A. Método indirecto. El método indirecto es ampliamente utilizado para la cuantificación de anticuerpos, puesto que son pocos los conjugados necesarios para evaluar una variedad de anticuerpos de estados infecciosos. El proceso es el siguiente:

I. Placas de microhemaglutinación con pozos de poliestireno son sensibilizadas por adsorción pasiva con el antígeno revelador, las placas son lavadas.

II. Las muestras a probar son incubadas en los pozos sensibilizados y las placas son nuevamente lavadas. El anticuerpo presente reacciona con el antígeno inmovilizado en la superficie del pozo.

III. El conjugado enzima-antiinmunoglobulina humana es incubado en los pozos; estos reaccionan con el anticuerpo capturado en el paso II. El exceso de reactivo es lavado.

IV. El sustrato de la enzima es adicionado en las placas y es incubado; el rango de degradación es indicado por el cambio de color, el cual es proporcional a la concentración de anticuerpo presente en la muestra de prueba del paso II.

V. La reacción es detenida y el cambio de color es comparado visualmente o en un espectrofotómetro.

Debe usarse el suero apropiado antisuero-enzima-marcado, específico para inmunoglobulina G, M o A. (Ver dibujo no. 1)

B. Método competitivo

I. El antígeno es atrapado en la fase sólida. Realizandose por duplicado A y B.

II. Un conjugado de anticuerpo específico ligado a una enzima es mezclado con la muestra de prueba que se piensa contiene anticuerpo y se incuba con la fase sólida. Después de la incubación la fase sólida es lavada.

III. Igual al anterior pero con B.

IV. El sustrato de la enzima es adicionado. La diferencia en la degradación del sustrato entre el conjugado sólo y el conjugado con muestra a probar es proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en la muestra.

II. ENSAYO PARA ANTIGENOS

A. Método competitivo. El método competitivo es análogo al del radioinmunoensayo.

I. El anticuerpo específico es unido a la fase sólida.

II. Un conjugado de antígeno-enzima-marcado es mezclado con la muestra a prueba, que contiene el antígeno y la mezcla es incubada en la fase sólida. Después de la incubación la placa es lavada.

III. El sustrato de la enzima es adicionado. La diferencia en la degradación del sustrato entre el conjugado sólo y el conjugado mezclado con muestra, es proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra de prueba.

B. Método de doble anticuerpo (SANDWICH)

I. El anticuerpo específico es unido a la fase sólida.

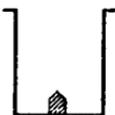
II. La muestra de prueba es incubada con la fase sólida y después es lavada.

III. Un conjugado de anticuerpo específico unido a una enzima es primero incubado y después lavado.

IV. El sustrato de la enzima es adicionado. La degradación es proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra de prueba.

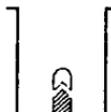
METODO INDIRECTO

1. ANTIGENO ADSORBIDO A LA PLACA

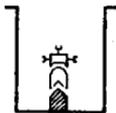


LAVAR

2. AÑADIR SUELO

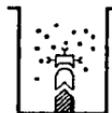


ANTICUERPO ESPECIFICO
SE UNE A ANTIGENO



LAVAR

3. AÑADIR ANTICUERPO MARCADO
CON ENZIMA QUE SE UNE AL ANTICUERPO



4. AÑADIR SUSTRATO

CANTIDAD HIDROLIZADA =
CANTIDAD DE Ab PRESENTE

Fig. 5 Método indirecto de ELISA en microplaca para detección y determinación de anticuerpos. Fuente Referencia 43

ANTIESTREPTOLISINAS

Casi todas las cepas de estreptococos grupo serológico A producen factores hemolíticos, estreptolisina O y S. Ambas son capaces de hemolizar glóbulos rojos. Cuando un individuo tiene una infección estreptocócica grupo A la estreptolisina O estimula el desarrollo de anticuerpo específico, antiestreptolisina O (lábil en oxígeno), y la estreptolisina S (estable en oxígeno) no estimula la formación de anticuerpo. Los títulos séricos de antiestreptolisinas O pueden tener valor diagnóstico en pacientes que tienen o han tenido recientemente una infección estreptocócica grupo A. Esto tiene importancia cuando se recuerda que las secuelas de estas infecciones incluyen fiebre reumática, glomerulonefritis y eritema nudoso.

El anticuerpo antiestreptolisina O está presente en casi todas las personas en títulos bajos, porque las infecciones estreptocócicas son comunes. Cuando un paciente tiene signos que sugiere fiebre reumática, es importante determinar si ha tenido o no infección reciente. Títulos elevados en aumento (con nivel máximo 4-6 semanas después de la infección) indican infección reciente. La prueba se considera un auxiliar útil en el diagnóstico diferencial de fiebre reumática temprana y artritis reumatoide cuando el cuadro clínico no es decisivo. Las determinaciones seriadas a intervalos bisemanales dan más información valiosa que una sola determinación.

Cuando la estreptolisina O en su forma reducida se agrega a glóbulos rojos hay hemólisis. Si el suero de un paciente que contiene antiestreptolisina se añade a la estreptolisina se produce una reacción antígeno-anticuerpo y el anticuerpo neutraliza la estreptolisina O parcial o totalmente según el nivel de anticuerpos presente. Una cantidad constante de estreptolisina (Antígeno) se agrega a cantidades cada vez menores de suero, y así el anticuerpo presente es suficiente para neutralizar el antígeno, no hay hemólisis cuando luego se agregan glóbulos rojos. Cuando el antígeno excede al anticuerpo el exceso de antiestreptolisina causa hemólisis. El título de anticuerpos antiestreptolisina es la recíproca de la mayor dilución de suero que impide la hemólisis de los glóbulos rojos. El título de antiestreptolisina O se mide en Unidades Todd (originalmente definidas como la cantidad de suero que apenas neutraliza dos y media dosis hemolíticas mínimas de estreptolisina estandarizada).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que la determinación de los anticuerpos antiestreptolisina O (unidades Todd) es usada como una prueba indirecta de infección por estreptococos y como se trata de una prueba en donde solamente se determinan los anticuerpos neutralizadores de la estreptolisina O. Consideramos que es necesario tener una prueba alternativa que nos determine no sólo aquellos anticuerpos neutralizantes de la estreptolisina O si no todos los anticuerpos que reaccionan con ella, usando un método de ELISA ya que la finalidad de la prueba no es determinar los anticuerpos neutralizantes sino indicar, si existe en el individuo una respuesta antiestreptolisina O como resultado de infecciones de estreptococos. Por otro lado si validamos la determinación del título de antiestreptolisinas en saliva, evitaríamos las punciones, sobre todo en pequeños.

FUNDAMENTACION EN LA ELECCION DEL TEMA

En patología humana las infecciones por estreptococos son de suma importancia debido a que figuran entre los agentes más frecuentes de infecciones bacterianas en el hombre, durante la edad escolar y en menor grado en la edad adulta^{30,31} lo que da lugar a complicaciones como la fiebre reumática, causa de hospitalización y muerte en muchos países.^{44,45}

En México se ha incrementado la incidencia de faringitis estreptocócica llegando a un total de 190 609 casos reportados hasta 1992, con una tasa de 219.66 por cada 100 000 habitantes, siendo más frecuente en grupos de edad de 5-14 años y de 25-44 años. Para la fiebre reumática se tiene un índice de 1085 casos reportados en 1992.

Son varios los requerimientos para el desarrollo de la fiebre reumática, primero deben haber estado presentes los estreptococos del grupo A, segundo la infección debe estar localizada en el tracto respiratorio, tercero las bacterias deben persistir para que aparezca la complicación y cuarto debe ser demostrada una respuesta de anticuerpos antiestreptolisina indicativa de infección activa.

De todos los productos del estreptococo, sólo a estreptolisina O ha demostrado tener importancia sobre el diagnóstico indirecto de infecciones estreptocócicas.

El diagnóstico de predisposición a la fiebre reumática se realiza por cuantificación de anticuerpos anti-estreptolisina O en suero de pacientes sospechosos, de su seguimiento y observación depende el desarrollo de la enfermedad.

La IgA es la inmunoglobulina predominante en las secreciones externas, por tal motivo es el principal anticuerpo que confiere inmunidad sobre la superficie mucosa, además de la IgM e IgG. Aunque el mecanismo por el cual la IgA específica de antígeno se encuentra en las secreciones externas no ha sido esclarecido, existen evidencias de que una inmunización oral¹ promueve la respuesta secretoria con anticuerpos IgA específicos.²⁰

El análisis de inmunosorbente unido a enzima (ELISA) es una variante enzimática del método de emparejado. Se intenta detectar un anticuerpo, de manera que están invertidas las funciones del captador y el ligando. El componente de fase sólida es un antígeno. El anticuerpo a detectar se une a este componente y, entonces, se adiciona un segundo, anticuerpo unido a enzima, dirigido con el anticuerpo a detectar. Se añade el sustrato de la enzima, y se obtiene un producto colorido de la reacción, que puede medirse con facilidad por espectrofotometría, este método es de bajo costo, seguro, existe estabilidad prolongada en los reactivos usar es exacto y sensible.⁴³

HIPOTESIS

Debe existir una buena correlación entre el título de antiestreptolisinas en unidades Todd, encontradas en suero y el título de antiestreptolisinas del tipo IgA e IgG encontradas en saliva, por el método de ELISA.

OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Determinar el nivel de antiestreptolisina IgA secretora específica en salivas de pacientes, utilizando el método indirecto de ELISA para su cuantificación.

B. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener y purificar mediante tamices moleculares la estreptolisina O, usando un ensayo biológico.
2. Determinar los títulos de antiestreptolisina O en unidades Todd, mediante un micrométodo.
3. Estandarizar la técnica de ELISA para la determinación de IgA antiestreptolisina en suero y saliva.
4. Determinar el valor de antiestreptolisina O de tipo IgA e IgG por el método de ELISA en muestras de pacientes.
5. Realizar el análisis estadístico de los datos así obtenidos.

MATERIAL

A. MATERIAL Y EQUIPO

1. Material Biológico	Especificación
Saliva humana.	
Suero humano.	
Ovoalbúmina.	Sigma
Albúmina sérica bovina.	Merck
Estreptolisina O.	Beli
Peroxidasa de rábano.	
Conjugados anti IgG y anti IgA.	Cappel
2. Reactivos	
Acido cítrico.	Merck
Acido sulfúrico.	Merck
Agua bidestilada.	
Azida de sodio.	
Carbonato de sodio anhidro.	J.T. Baker
Cloruro de potasio.	Merck
Cloruro de sodio.	Monterrey
Fosfato de potasio monobásico.	J.T baker
Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado.	J.T. Baker
Fosfato de sodio monobásico anhidro.	J.T. Baker
Hidrosulfito de sodio.	Monterrey
Hidróxido de sodio.	Merck
Ortofenilendiamina.	Sigma
Peróxido de hidrogeno.	Monterrey
Reactivo Folin-Ciocalteu.	Sigma

Reactivos

Sephadex G-100.

Sulfato de cobre.

Sulfato de sodio.

Tween 20.

3. Material de laboratorio

Agitador con gendarme.

Algodón.

Bulbos de plástico para pipetas Pasteur.

Bureta.

Espátula de acero inoxidable.

Gradillas metálicas de 20 y 36 tubos.

Jeringas desechables 3 y 5 ml.

Ligas de látex.

Marcador.

Matraz aforado 100, 250, 500 y 1000 ml.

Matraz Erlen-Meyer 125, 250, 500 y 1000 ml.

Mechero Bunsen.

Mechero Fischer.

Membranas de diálisis.

Papel aluminio.

Papel parafilm.

Pipetas Pasteur

Pipetas graduadas 1, 2, 5 y 10 ml.

Pinzas de tres dedos con nuez.

Piseta de 500 ml.

Placas de microtitulación.

Puntas para pipeta automática.

Especificación

Sigma

J.T. Baker

J.T. Baker

Sigma

Pyrex

Scientific Products

Plastipak

Pyrex

Pyrex

Scientific Products

Pyrex

Material de laboratorio	Especificación
Probetas.	Pyrex
Soporte universal.	
Tela de asbesto.	
Tripie metálico.	
Tubos de ensaye de 13X100, 12x75, 18x150 mm.	Pyrex
Tubos de Khan.	Pyrex
Vasos de precipitados de 100, 250 y 500 ml.	Pyrex
Vidrio de reloj.	Pyrex
4. Equipo	
Agitador magnético.	
Agitador vórtex.	Genie
Balanza analítica.	Mettler H80
Balanza granataria.	OHAUS
Baño de agua con temperatura controlada.	Precision
Bomba de vacío.	Feli Welch Modelo 1410
Celdas para espectrofotómetro.	B & L
Columna para cromatografía.	
Cronómetro.	
Equipo de destilación.	Pyrex
Espectrofotómetro.	B & L , Spectronic 20
Espectrofotómetro.	Perkin-Elmer Lambda 3A UV/VIS
Espectrofotómetro de ELISA.	Dynatech MR 250
Estufa de incubación.	Mapsa
Incubadora.	Riossa, EC
Micropipetas 50 microlitros.	Cooke
Parrilla de agitación.	
Potenciómetro.	Sargen-Welch PBL-400

Equipo

Pipeta de émbolo 20-100 microlitros.

Refrigerador.

Termómetro de -10 a 110°C.

Especificación

Brand W Germany

Philips 127-VCA

DISEÑO EXPERIMENTAL

1. Purificación de antiestreptolisina por medio de Sephadex G-100.

Empacar la columna por corrimiento en ella con gel ya hinchado y libre de aire con un mínimo de 2 l. de solución de PBS. Ajustar la velocidad de flujo aproximadamente 20 ml/min. y marcar el nivel del gel para saber cuando se ha sobre empacado la columna. Reconstituir cuatro viales de estreptolisina O con 3 ml. de agua destilada, colocar el volumen en una membrana semipermeable y dialisar contra PBS por 24 horas, al término de la diálisis colocar la estreptolisina en tubos y centrifugar a 2 000 rpm por 10 min. y colectar el sobrenadante (muestra). Colocar la muestra de estreptolisina ya centrifugada sobre la superficie del gel, teniendo cuidado de no enturbiarlo durante la aplicación, ya que esto puede distorcionar la banda de filtración. Se recomienda que la aplicación de la muestra sea con una pipeta Pasteur larga (con punta a 45°) y por las paredes de la columna. Dejar que la muestra sea absorbida totalmente y entonces con la misma pipeta adicionar suficiente solución de PBS y ajustar la velocidad de elución a 20 ml/hora. Colectar en tubos de ensaye a 3 ml. por tubo. Leer la absorbancia de las fracciones a 280 nm. Realizar la curva densidad optica contra número de fracción.

2. Actividad biológica

En una placa de microtitulación se marcan los pozos que se utilizarán para la prueba, del 1 al 50, y los orificios de abajo para las muestras control. Agregar 0.05 ml. de solución PBS con hiposulfito de sodio a cada pozo contando los pozos controles. Agregar 0.05 ml. del líquido contenido en los tubos provenientes de la filtración en gel. Mezclar e incubar por 15 min. , adicionar 0.05 ml. de solución de glóbulos rojos al 5% , agitar suavemente. A los pozos control positivo adicionar 0.05 ml. de estreptolisina O recién reconstituida. Al pozo control negativo sólo adicionar 0.05 ml. de glóbulos rojos al 5%. Incubar a 37°C por 45 min. agitando a intervalos de 15 min. Después del período de incubación observar la presencia de hemólisis o sedimentación de los glóbulos rojos tanto en los controles como en los eluatos de filtración. Realizar la curva de porcentaje de hemólisis contra número de fracción.

3. Determinación de proteínas.

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 las proteínas presentes.

Realizar una curva patrón colocando una serie de 10 tubos que contengan solución de ovoalbúmina en concentraciones 50, 100, 150, ..., 500 micro gramos por mililitro (a partir de una solución de 500 microgramos por mililitros). El blanco se prepara con 1 ml. de solución salina isotónica. En otro tubo se coloca 0.5 ml. de la muestra problema. Agregar a todos los tubos 3 ml. del reactivo de Lowry (preparado al momento), dejar reposar durante 10 min. a temperatura ambiente, agregar 0.1 ml. del reactivo de Folin-Ciocalteu y deja a temperatura ambiente durante 30 min. agitando

ocasionalmente. Leer la absorbancia a 600 nm. y realizar curva de densidad óptica contra concentración de proteínas, y extrapolar el valor del problema en la curva.

4. Método de ELISA.

Fundamento. El método de ELISA detecta y cuantifica la concentración de anticuerpos o antígenos inmovilizados en fase sólida a partir de un anticuerpo conjugado con una enzima, la cual, al adicionarle su sustrato determinará la concentración de enzima presente. La concentración del anticuerpo es proporcional a la actividad enzimática del conjugado unido al anticuerpo o antígeno inmovilizado.

Estandarización. Ajustar la concentración de proteínas de la estreptolisina O purificada a 4 microgramos por mililitro con solución de recubrimiento (solución A). Colocar en una gradilla siete tubos los cuales serán etiquetados de la A a la G, en los tubos B, C, D, G, E, F y G, se colocan 1.5 ml. de buffer de recubrimiento. En el tubo A se adicionan 3 ml. de solución A y en los tubos B al G se hacen diluciones al doble tomando 1.5 ml de solución precedente 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 ml. En una placa de microhemaglutinación colocar 100 microlitros del tubo A en todos los pozos de la fila A, hacer lo mismo con el resto de los tubos. La fila H se llena con 100 microlitros de solución de recubrimiento (testigo negativo de antígeno). Dejar reposar en cámara húmeda a 4°C durante 18 horas. Al término de este tiempo, eliminar el sobrenadante y bloquear los pozos con 400 microlitros de albúmina sérica bovina al 1.0%. Dejar reposar 30 minutos, tirar el sobrenadante y lavar 3 veces con solución PBS-Tween 20 dejando actuar la solución de lavado por espacio de 1 minuto antes de tirar los sobrenadantes. Almacenar a 4°C.

Tomar 11 tubos de ensayo y etiquetarlos del 1 al 11, realizar diluciones de 1:5, 1:10, 1:50, ..., 1:5 000 de la muestra de saliva o suero con solución PBS. En la placa de hemaglutinación ya sensibilizada, colocar 100 microlitros del tubo 1 en los pozos de la columna 1, hacer lo mismo con el resto de los tubos. La columna 12 sólo se llena con PBS-tween 20, Dejar reposar en cámara húmeda a temperatura ambiente, 2 horas, lavar 4 veces la placa con PBS-tween 20 como se mencionó anteriormente. Adicionar 100 microlitros de sustrato (preparado al momento) e incubar 37°C durante 15 minutos. Detener la reacción adicionando 50 microlitros de ácido sulfúrico 4N. Leer la absorbancia a 497 nm y realizar la gráfica de absorbancia contra concentración para cada valor de estreptolisina. Determinar la concentración de suero y saliva, así como de estreptolisina O, óptimos para el estudio.

5. Colecta de la muestra

Colectar muestras de saliva y suero , la muestra de saliva es tomada sin estimulación de la parótida, coleccionar entre 3 y 4 ml. en tubos estériles y filtrar sobre algodón con ayuda de jeringas estériles, descomplementar a 56°C por 30 min., y almacenar a -20°C. Las muestras de suero son tomadas de sangre venosa de los mismos pacientes, colocar de 3-5 ml. de sangre en tubos estériles sin anticoagulante, dejar reposar 10 min. y después remover el coágulo, centrifugar a 2000 rpm durante 10 min. y coleccionar el máximo de suero. Descomplementar a 56°C por 30 min. Almacenar a -20°C.

MICROMETODO DE ANTIESTREPTOLISINA "O"

SE REALIZAN DILUCIONES EN TUDO

1:10 0.1 ml + 0.9 ml A

1:100 0.1 ml (A) + 0.9 ml B

1:500 0.1 ml (B) + 0.4 ml C

	1:10 A		1:100 B					1:500 C				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Vol. dil. ml	0.08	0.02	0.1	0.08	0.06	0.04	0.03	0.1	0.08	0.06	0.04	0.02
Sol. sal. aort.	0.02	0.08	0	0.02	0.04	0.06	0.07	0	0.02	0.04	0.06	0.08
	AGITAR			LAS				PLACAS				
Vol. strep.	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
	AGITAR E INCUBAR A 37° C 20 MIN. EN ESTUFA											
Susp. CR 5%	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
	AGITAR E INCUBAR A 37° C 50 MIN						AGITANDO C/15 MIN					
J. Todd	12.5	50	100	125	166	250	333	500	625	833	1250	2500

RESULTADOS

En la tabla número 2 se presentan los resultados obtenidos en la purificación de la antiestreptolisina O lote 490 por sephadex G-100 así como los resultados de la actividad biológica de cada fracción de estas se ocuparon las fracciones 6, 7 8 y 9 para la realización de este estudio : la figura 1 muestra la representación gráfica de estos resultados.

En la tabla número 3 se presentan los resultados de la determinación de antiestreptolisinas por micrométodo de las muestras de suero obtenidas de la UMAI del Estado de México se incluye clave, edad y sexo.

En las tablas número 4 y 5 se presentan los resultados de la estandarización del método de prueba a diferentes concentraciones de estreptolisina O purificada como fase sólida y con dilución seriada del suero número 24. En la figura número 2 y 3 se muestran las gráficas de estos resultados.

Las tablas número 6, 8 10 y 12 presntan los resultados de las determinaciones de ELISA para cada muestra de suero y saliva a 409 nm tanto para IgG e IgA y su correspondiente valor de antiestreptolisinas obtenido por micrométodo.

Las tablas número 7, 9, 11 y 13 presentan los datos de la regresión lineal para cada conjunto de datos de la tabla anterior respectivamente, además presenta el análisis de varianza para la regresión con la finalidad de ver si existe relación entre variables.

Las tablas número 14, 16, 18 y 20 presentan una comparación entre los diferentes resultados de ELISA para cada muestra de suero y saliva. En las tablas número 15, 17, 19 y 21 se presentan los resultados de la regresión lineal de cada conjunto de datos, así como , el análisis de varianza para la regresión para verificar si existe alguna relación entre variables.

TABLA No. 2 PURIFICACION POR SEPHADEX

Purificación de estreptolisina O

• FRACCION	ABSORBANCIA	% HEMOLISIS
• 1	0.000	0.0
2	0.000	0.0
3	0.000	0.0
4	0.383	0.0
5	0.386	1.0
6	0.373	1.0
7	0.357	1.0
8	0.345	1.0
9	0.349	1.0
10	0.400	1.0
11	0.500	0.75
12	0.545	0.75
13	0.629	0.5
14	0.762	0.25
15	0.814	0.25
16	0.807	0.0
17	0.807	0.0
18	0.809	0.0
19	0.812	0.0
20	0.448	0.0
21	0.250	0.0
22	0.000	0.0
23	0.000	0.0
24	0.000	0.0
25	0.000	0.0

Actividad biológica por fracción

TABLA NO.3 DETERMINACION DE ANTIESTREPTOLISINAS

NO. DE MUESTRA	CLAVE	SEXO	EDAD*	TITULO**
1	M114	M	66	166
2	M115	M	63	833
3	M117	F	34	833
4	MMAGDA	F	32	833
5	M371	M	6	2500
6	MG47	F	49	833
7	M641	F	48	625
8	M667	F	36	1250
9	M637	F	69	1250
10	ROSA	F	38	1250
11	M342	M	71	833
12	M590	F	60	625
13	M552	M	46	833
14	M549	M	48	833
15	M284	F	41	625
16	UZ	M	29	625
17	M317	M	9	833
18	M349	M	62	1250
19	M353	F	42	1250
20	M355	F	32	1250
21	M380	F	42	1250
22	M397	F	17	833
23	M407	M	38	1250

Número de lote 494

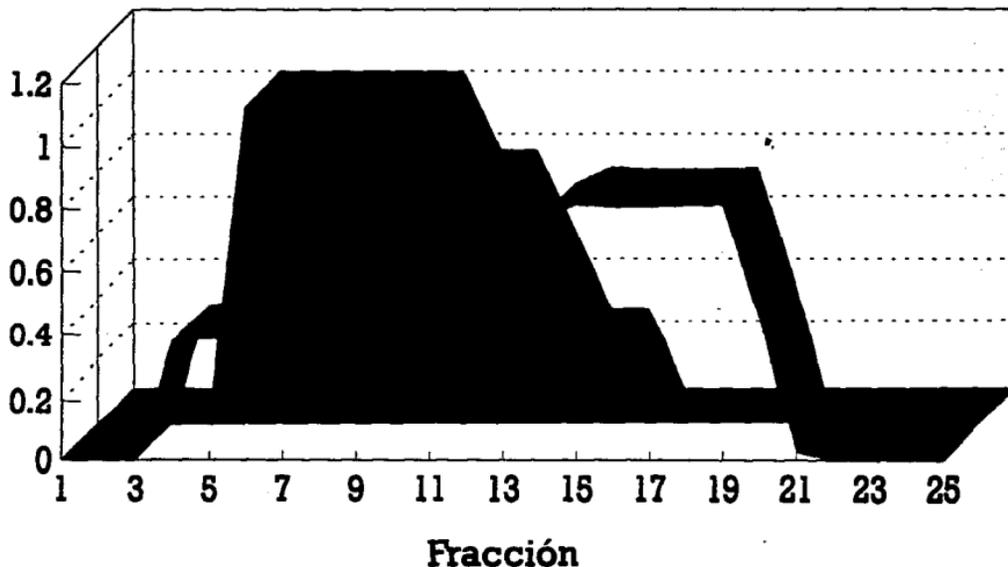
*Años

** Unidades Todd

Purificación de Estreptolisina O

Medida de Actividad Biológica

Abs. o % hemólisis

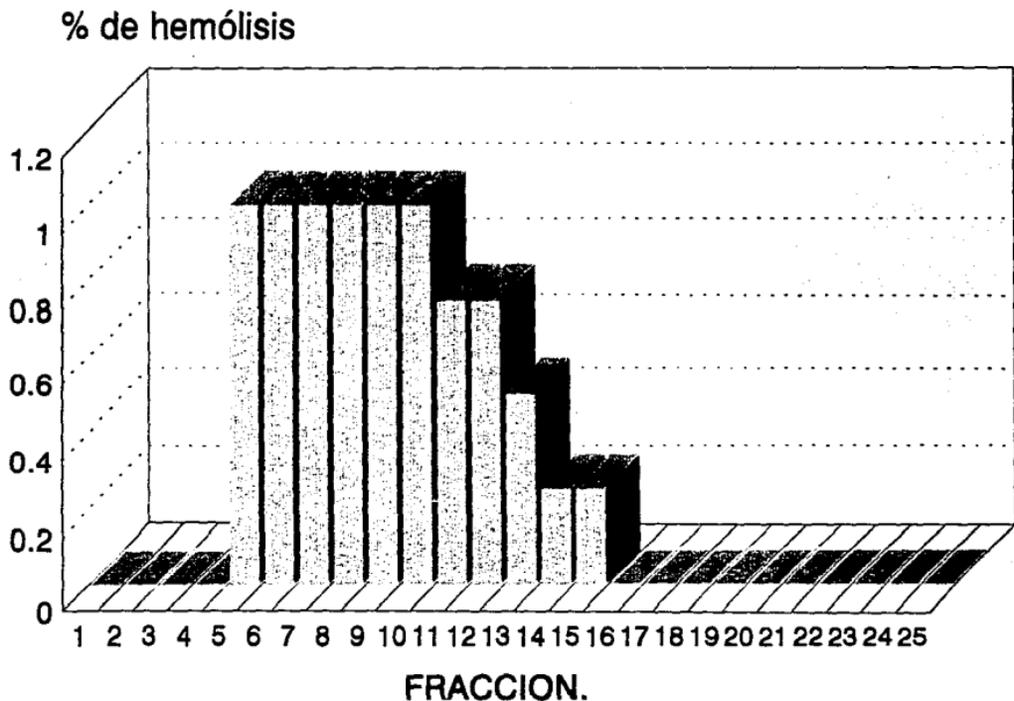


■ Purificación ■ Actividad biológica

Selección de fracciones activas

Purificación de estreptolisina O

Porcentaje de hemólisis



Purificación de Estreptolisina O

Fracciones purificadas

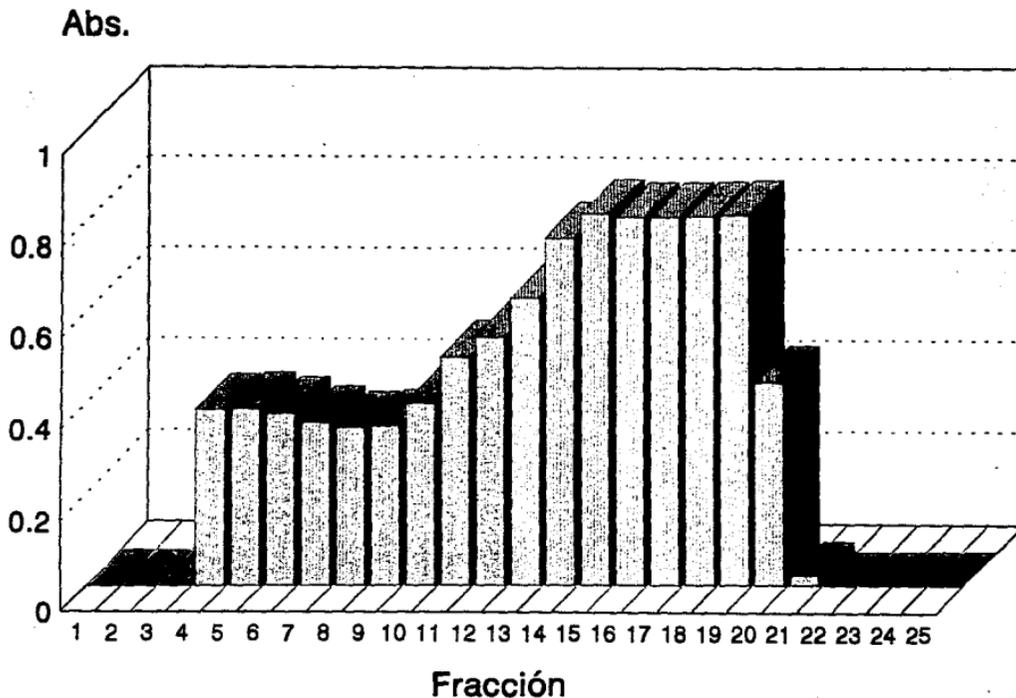


TABLA NO. 3 CONTINUACION

NO. DE MUESTRA	CLAVE	SEXO	EDAD*	TITULO**
24	M408	F	15	1250
25	M336	M	18	166
26	BETY	F	25	166
27	GERARDO	M	30	125
28	M673	F	35	166
29	M289	M	53	166
30	RCVE	F	61	125
31	M283	F	43	100
32	M390	F	46	0
33	R34EB	F	34	50
34	R3ST	F	60	250
35	M287	F	7	50
36	R335MJ	M	25	50
37	M387	F	59	0
38	M374	F	34	125
39	M276	M	62	125
40	Y	F	27	50
41	M288	F	32	50
42	M644	M	8	166
43	M292	F	18	250
44	M315	M	36	166
45	M324	F	51	50

Número de lote 494

*Años

**Unidades Todd

TABLA NO. 4 ESTANDARIZACION DEL METODO DE PRUEBA

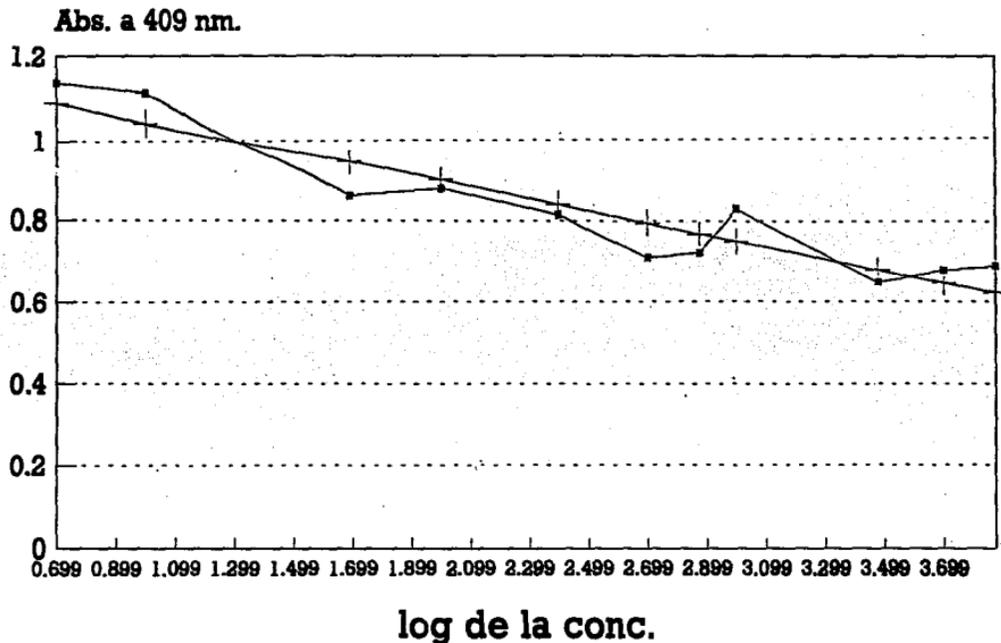
ELISA Método Indirecto

LOG DE CONC.	ABS. A 409 NM	REGRESION
0.699	1.134	1.087
1.000	1.110	1.043
1.690	0.858	0.942
2.000	0.875	0.896
2.397	0.814	0.838
2.699	0.709	0.794
2.875	0.722	0.768
3.000	0.828	0.750
3.477	0.649	0.680
3.699	0.679	0.648
3.875	0.689	0.622

Conc. de estreptolisina de 0.5 mg/ml

Curva de Titulación para ELISA

Método Indirecto



— Curva D 0.5 mg/ml + Curva de regresión

Determinación de condiciones óptimas

TABLA NO. 5 ESTANDARIZACION DEL METODO DE PRUEBA

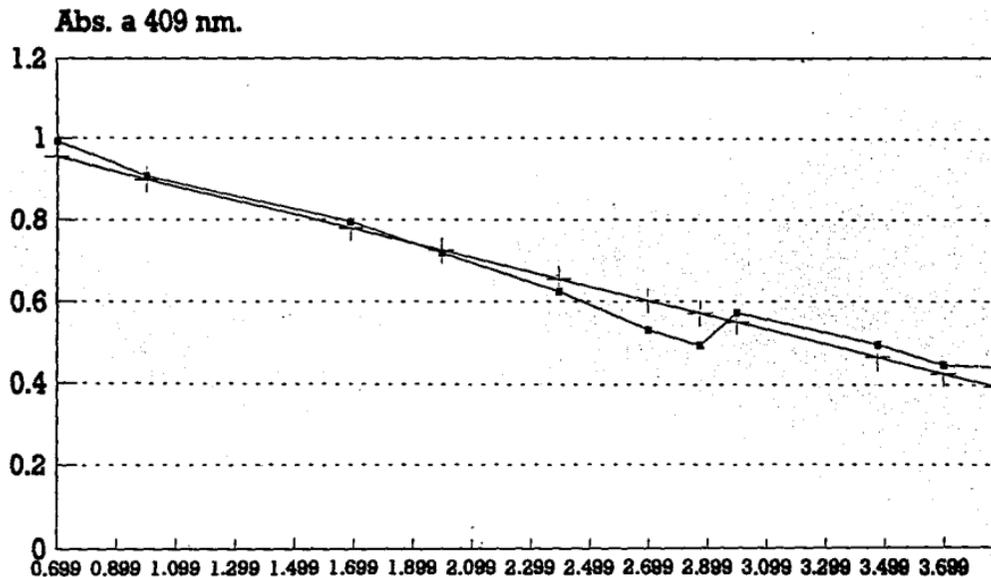
ELISA Metodo Indirecto

LOG DE CONC.	ABS. A 409 NM	REGRESION
0.699	0.992	0.954
1.000	0.901	0.901
1.690	0.796	0.782
2.000	0.720	0.725
2.397	0.626	0.656
2.699	0.531	0.603
2.875	0.493	0.572
3.000	0.574	0.550
3.477	0.496	0.466
3.699	0.448	0.427
3.875	0.443	0.396

Conc. de estreptolisina de 0.25 mg/dl

Curva de Titulación para ELISA

Método Indirecto



—•— curva E 0.25 mg/ml + curva de regresión

Determinación de condiciones óptimas

TABLA NO. 6 RESULTADOS DEL ANALISIS POR ELISA

Concentración de IgG de suero

NO. DE MUESTRA	ABS. IgG SUERO	UNIDADES TODD
1	0.638	166
2	0.663	833
3	0.568	833
4	0.464	833
5	0.754	2500
6	0.495	833
7	0.531	625
8	0.497	1250
9	0.498	1250
10	0.487	1250
11	0.534	833
12	0.773	625
13	0.624	833
14	0.554	833
15	0.319	625
16	0.706	625
17	0.492	833
18	0.777	1250
19	0.627	1250
20	0.479	1250
21	0.625	1250
22	0.721	833
23	0.653	1250

TABLA NO. 6 CONTINUACION

Unidades Todd vs IgG de suero

NO. MUESTRA	ABS. IgG SUERO	UNIDADES TODD
25	0.575	166
26	0.678	166
27	0.561	125
28	0.612	166
29	0.672	166
30	0.352	125
31	0.456	100
32	0.586	0
33	0.379	50
34	0.331	250
35	0.398	50
36	0.254	50
37	0.512	0
38	0.471	125
39	0.343	125
40	0.727	50
41	0.485	50
42	0.649	166
43	0.446	250
44	0.773	166
45	0.439	50

TABLA NO. 7 RESULTADOS DE LA REGRESION Y ANADEVA
Unidades Todd vs IgG de suero

Salida de regresión

Constante	-170.863
Error std de Y est	521.0580
R al cuadrado	0.111793
No. de observaciones	45
Grados de libertad	2
Coefficiente de X	1367.738
Error std de coef	587.9180

Análisis de varianza para la regresión

Fuente de variacion	gl	SC	MC
REG	1	1469415	Mc _r = 1469415
ERR	43	11674566	Mc _{er} = 271501.5

$$F_{cal} = Mc_r / Mc_{er} = 5.412182$$

$$F_{tab} = 4.0$$

HIPOTESIS:

H₀ X y Y no estan relacionadas linealmente

H_a X y Y estan relacionadas linealmente

Como F_{cal} es mayor que F_{tab} se rechaza H₀, por lo tanto las variables se relacionan linealmente

Nivel de significancia de $\alpha = 0.05$

TABLA NO. 8 RESULTADOS DEL ANALISIS POR ELISA

Unidades Todd vs IgA de suero

NO. MUESTRA	ABS. IgA SUERO	UNIDADES TODD
1	0.498	166
2	0.238	833
3	0.367	833
4	0.438	833
5	0.226	2500
6	0.180	833
7	0.167	625
8	0.262	1250
9	0.238	1250
10	0.178	1250
11	0.278	833
12	0.201	625
13	0.331	833
14	0.464	833
15	0.116	625
16	0.317	625
17	0.281	833
18	0.833	1250
19	0.224	1250
20	0.130	1250
21	0.211	1250
22	0.342	833
23	0.314	1250

TABLA NO. 8 CONTINUACION

Unidades Todd vs IgA de suero

NO. MUESTRA	ABS. IgA SUERO	UNIDADES TODD
24	0.325	1250
25	0.802	166
26	0.160	166
27	0.128	125
28	0.380	166
29	0.196	166
30	1.181	125
31	0.219	100
32	0.604	0
33	0.121	50
34	0.100	250
35	0.118	50
36	0.232	50
37	0.024	0
38	0.540	125
39	0.133	125
40	0.382	50
41	0.033	50
42	0.182	166
43	0.147	250
44	0.092	166
45	0.447	50

TABLA NO. 9 RESULTADOS DE LA REGRESION Y ANADEVA
Unidades Todd vs IgA de suero

Salida de regresión

Constante	605 8871
Error std de Y est	552 6776
R al cuadrado	0 000724
No. de observaciones	45
Grados de libertad	2
Coefficiente de X	-72 6936
Error std de coef	411 7529

Análisis de varianza para la regresión

Fuente de variación	gl	SC	MC
REG	1	9520 570	Mcr = 9520 570
ERR	43	13134461	Mcer = 305452 5

$$F_{cal} = M_{cr} : M_{CER} = 0.031168$$

$$F_{tab} = 4.0$$

HIPOTESIS:

Ho: X y Y no están relacionadas linealmente

Ha: X y Y están relacionadas linealmente

Como F_{cal} es menor que F_{tab} se acepta Ho, por lo tanto las variables no se relacionan linealmente

Nivel de significancia de $\alpha = 0.05$

TABLA NO. 10 RESULTADOS DEL ANALISIS POR ELISA

Unidades Todd vs IgG de saliva

NO. MUESTRA	ABS. IgG SALIVA	UNIDADES TODD
1	0.319	166
2	0.358	833
3	0.265	833
4	0.284	833
5	0.572	2500
6	0.512	833
7	0.335	625
8	0.216	1250
9	0.493	1250
10	0.147	1250
11	0.550	833
12	0.384	625
13	0.342	833
14	0.211	833
15	0.209	625
16	0.887	625
17	0.083	833
18	0.725	1250
19	0.121	1250
20	0.416	1250
21	0.307	1250
22	0.317	833
23	0.328	1250

TABLA NO. 10 CONTINUACION

Unidades Todd vs IgG de saliva

NO. MUESTRA	ABS. IgG SALIVA	UNIDADES TODD
24	0.276	1250
25	0.246	166
26	0.237	166
27	0.489	125
28	0.333	166
29	0.636	166
30	0.08	125
31	0.319	100
32	0.812	0
33	0.311	50
34	0.369	250
35	0.093	50
36	0.392	50
37	0.344	0
38	0.282	125
39	0.223	125
40	0.220	50
41	0.179	50
42	0.231	166
43	0.114	250
44	0.222	166
45	0.084	50

TABLA NO. 11 RESULTADOS DE LA REGRESION Y ANADEVA
Unidades todd vs IgG de saliva

Salida de regresión

Constante	296 1600
Error std de Y est	534 1131
R al cuadrado	0 066728
No de observaciones	45
Grados de libertad	2
Coefficiente de X	913 0536
Error std de coef	520 7280

Análisis de varianza para la regresión

Fuente de variación	gl	SC	MC
REG	1	877075 9	MCr = 877075 9
ERR	43	12266906	MCer = 285276 8

$$F_{cal} = MCr/MC_{er} = 3 074472$$

$$F_{tab} = 4.0$$

HIPOTESIS:

H₀ X y Y no estan relacionadas linealmente

H_a X y Y estan relacionadas linealmente

Como F_{cal} es menor que F_{tab} se hacepta H₀, por lo tanto

las variables no se relacionan linealmente

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

TABLA NO. 12 RESULTADOS DEL ANALISIS POR ELISA

Unidades Todd vs IgA de saliva

NO. MUESTRA	ABS. IgA SALIVA	UNIDADES TODD
1	0.228	166
2	0.214	833
3	0.511	833
4	0.528	833
5	0.271	2500
6	0.062	833
7	0.108	625
8	0.007	1250
9	0.214	1250
10	0.316	1250
11	0.087	833
12	0.152	625
13	0.735	833
14	0.307	833
15	0.038	625
16	0.388	625
17	0.271	833
18	0.573	1250
19	0.322	1250
20	0.085	1250
21	0.486	1250
22	0.399	833
23	0.457	1250

TABLA NO. 12 CONTINUACION

Unidades Todd vs IgA de saliva

NO. MUESTRA	ABS. IgA SALIVA	UNIDADES TODD
24	0.261	1250
25	0.636	166
26	0.139	166
27	0.161	125
28	0.329	166
29	0.339	166
30	1.219	125
31	0.388	100
32	1.662	0
33	0.138	50
34	0.085	250
35	0.215	50
36	0.495	50
37	0.077	0
38	0.664	125
39	0.134	125
40	0.623	50
41	0.074	50
42	0.277	166
43	0.182	250
44	0.136	166
45	0.556	50

TABLA NO. 13 RESULTADOS DE LA REGRESION Y ANADEVA
Unidades Todd vs IgA de saliva

Salida de regresión

Constante	657 7868
Error std de Y est	550 1436
R al cuadrado	0 009866
No. de observaciones	45
Grados de libertad	2
Coefficiente de X	-226 322
Error std de coef	345 7423

Análisis de varianza para la regresión

Fuente de variación	gl	SC	MC
REG	1	129688 6	Mcr =129
ERR	43	13014293	Mcer = 302657 9

$$F_{cal} = M_{cr} / M_{cer} = 0 428498$$

$$F_{tab} = 4 0$$

HIPOTESIS:

H₀: X y Y no estan relacionadas linealmente

H_a: X y Y estan relacionadas linealmente

Como F_{cal} es menor que F_{tab} se acepta H₀, por lo tanto las variables no se relacionan linealmente

Nivel de significancia de $\alpha = 0 05$

TABLA NO. 14 RESULTADOS DEL ANALISIS POR ELISA

IgG de saliva vs IgG de suero

NO. MUESTRA	ABS. IgG SALIVA	ABS. IgG SUERO
1	0.319	0.638
2	0.355	0.663
3	0.265	0.568
4	0.284	0.464
5	0.572	0.754
6	0.512	0.495
7	0.338	0.531
8	0.216	0.497
9	0.493	0.498
10	0.147	0.487
11	0.550	0.534
12	0.384	0.773
13	0.342	0.624
14	0.211	0.554
15	0.209	0.319
16	0.557	0.706
17	0.053	0.492
18	0.728	0.777
19	0.121	0.627
20	0.416	0.479
21	0.307	0.625
22	0.317	0.721
23	0.325	0.653

Comparación entre variables

TABLA NO. 14 CONTINUACION

IgG de saliva vs IgG de suero

NO. MUESTRA	ABS. IgG SALIVA	ABS. IgG SUERO
24	0.325	0.679
25	0.502	0.575
26	0.160	0.678
27	0.128	0.561
28	0.350	0.612
29	0.196	0.672
30	1.151	0.352
31	0.219	0.456
32	0.604	0.586
33	0.121	0.379
34	0.100	0.331
35	0.115	0.398
36	0.232	0.254
37	0.024	0.512
38	0.540	0.471
39	0.133	0.343
40	0.382	0.727
41	0.088	0.485
42	0.182	0.649
43	0.147	0.446
44	0.092	0.773
45	0.447	0.439

Comparación entre variables

TABLA NO. 15 RESULTADOS DE LA REGRESION Y ANADEVA
IgG de saliva vs IgG de suero

Salida de regresión

Constante	0.454733
Error std de Y est	0.126215
R al cuadrado	0.127922
No. de observaciones	45
Grados de libertad	2
Coefficiente de X	0.309043
Error std de coef	0.123052

Análisis de varianza para la regresión

Fuente de variación	gl	SC	MC
REG	1	0.100481	MCr = 0.100481
ERR	43	0.655005	MCer = 0.015930

$$F_{cal} = MCr / MCer = 6.307530$$

$$F_{tab} = 4.0$$

HIPOTESIS:

H₀ X y Y no están relacionadas linealmente

H_a X y Y están relacionadas linealmente

Como F_{cal} es mayor que F_{tab} no se acepta H_0 , por lo tanto las variables se relacionan linealmente

Nivel de significancia de $\alpha = 0.05$

TABLA NO. 16 RESULTADO DEL ANALISIS POR ELISA

IgA de suero e IgG de suero

NO. MUESTRA	ABS. IgA SUERO	ABS. IgG SUERO
1	0.495	0.638
2	0.235	0.6638
3	0.567	0.568
4	0.438	0.464
5	0.226	0.754
6	0.150	0.495
7	0.167	0.531
8	0.262	0.497
9	0.238	0.498
10	0.175	0.487
11	0.275	0.534
12	0.201	0.773
13	0.581	0.624
14	0.464	0.554
15	0.116	0.319
16	0.317	0.706
17	0.251	0.492
18	0.533	0.777
19	0.224	0.627
20	0.130	0.479
21	0.211	0.625
22	0.342	0.721
23	0.314	0.653

Comparación entre variables

TABLA NO. 16 CONTINUACION

IgA de suero vs IgG de suero

NO. MUESTRA	ABS. IgA SUERO	ABS. IgG SUERO
24	0.325	0.679
25	0.502	0.575
26	0.160	0.678
27	0.128	0.561
28	0.350	0.612
29	0.196	0.672
30	1.151	0.352
31	0.219	0.456
32	0.604	0.586
33	0.121	0.379
34	0.100	0.331
35	0.115	0.398
36	0.232	0.254
37	0.024	0.512
38	0.540	0.471
39	0.133	0.343
40	0.382	0.727
41	0.088	0.455
42	0.182	0.649
43	0.147	0.446
44	0.092	0.773
45	0.447	0.439

Comparación entre variables

TABLA NO. 17 RESULTADOS DE LA REGRESION Y ANADEVA
IgA de suero vs IgG de suero

Salida de regresión

Constante	0.541231
Error std de Y est	0.134930
R al cuadrado	0.003337
Nº de observaciones	45
Grados de libertad	2
Coefficiente de X	0.038142
Error std de coef	0.100525

Análisis de varianza para la regresión

Fuente de variación	gl	SC	MC
REG	1	0.002621	MCr = 0.002621
ERR	43	0.782865	MCer = 0.18206

$$F_{cal} = MCr/MC_{er} = 0.143972$$

$$F_{tab} = 4.0$$

HIPOTESIS:

H₀ X y Y no están relacionadas linealmente

H_a X y Y están relacionadas linealmente

Como F_{cal} es menor que F_{tab} se acepta H₀, por lo tanto las variables no se relacionan linealmente

Nivel de significancia de $\alpha = 0.05$

TABLA NO. 18 RESULTADOS DEL ANALISIS POR ELISA

IgA y IgG en saliva y suero

NO. MUESTRA	ABS. IgA SALIVA	ABS. IgG SUERO
1	0.225	0.638
2	0.214	0.663
3	0.511	0.568
4	0.528	0.464
5	0.271	0.754
6	0.062	0.495
7	0.108	0.531
8	0.007	0.497
9	0.214	0.498
10	0.316	0.487
11	0.087	0.534
12	0.152	0.773
13	0.735	0.624
14	0.307	0.554
15	0.038	0.319
16	0.388	0.706
17	0.271	0.492
18	0.573	0.737
19	0.322	0.627
20	0.085	0.479
21	0.486	0.625
22	0.399	0.721
23	0.457	0.653

Comparación entre variables

TABLA NO. 18 CONTINUACION

IgA de saliva vs IgG de suero

NO. MUESTRA	ABS. IgA SALIVA	ABS. IgG SUERO
24	0.261	0.679
25	0.636	0.575
26	0.139	0.678
27	0.161	0.561
28	0.329	0.612
29	0.339	0.672
30	1.219	0.352
31	0.388	0.456
32	0.662	0.586
33	0.138	0.379
34	0.085	0.331
35	0.215	0.398
36	0.495	0.254
37	0.077	0.512
38	0.664	0.471
39	0.134	0.343
40	0.623	0.727
41	0.074	0.485
42	0.277	0.649
43	0.182	0.446
44	0.136	0.773
45	0.556	0.439

Comparación entre variables

TABLA NO. 19 RESULTADOS DE LA REGRESION Y ANADEVA
IgA de saliva vs IgG de suero

Salida de regresión

Constante	0.543245
Error std de Yest	0.134981
R al cuadrado	0.002575
No. de observaciones	45
Grados de libertad	2
Coefficiente de X	0.028257
Error std de coef	0.084830

Análisis de varianza para la regresión

Fuente de variación	gl	CS	MC
REG	1	0.002021	MCr = 0.002021
ERR	43	0.784373	MCer = 0.018220

$$F_{cal} = MCr/MC_{er} = 0.110955$$

$$F_{tabl} = 4.0$$

HIPOTESIS:

H₀. X y Y no están relacionadas linealmente

H_a. X y Y están relacionadas linealmente

Como F_{cal} es menor que F_{tab} se acepta H₀, por lo tanto las variables no se relacionan linealmente

Nivel de significancia de $\alpha = 0.05$

TABLA NO. 20 RESULTADOS DEL ANALISIS POR ELISA

Titro de IgA vs IgA en suero

NO. MUESTRA	ABS. IgA SALIVA	ABS. IgA SUERO
1	0.225	0.495
2	0.214	0.235
3	0.511	0.567
4	0.528	0.438
5	0.271	0.226
6	0.062	0.250
7	0.108	0.156
8	0.007	0.262
9	0.214	0.238
10	0.316	0.175
11	0.087	0.275
12	0.152	0.201
13	0.735	0.581
14	0.307	0.464
15	0.038	0.116
16	0.388	0.317
17	0.271	0.254
18	0.573	0.533
19	0.322	0.224
20	0.085	0.130
21	0.486	0.211
22	0.399	0.342
23	0.457	0.314

Comparacion entre variables

TABLA NO. 20 CONTINUACION

IgA de saliva vs IgA de suero

NO. MUESTRA	ABS. IgA SALIVA	ABS. IgA SUERO
24	0.261	0.325
25	0.636	0.502
26	0.139	0.160
27	0.161	0.128
28	0.329	0.350
29	0.339	0.196
30	1.219	1.151
31	0.388	0.219
32	0.662	0.604
33	0.138	0.121
34	0.085	0.100
35	0.215	0.115
36	0.495	0.232
37	0.077	0.024
38	0.664	0.540
39	0.134	0.133
40	0.623	0.382
41	0.074	0.088
42	0.277	0.182
43	0.182	0.147
44	0.136	0.092
45	0.556	0.447

Comparación entre variables

TABLA NO. 21 RESULTADO DE LA REGRESION Y ANADEVA
Iga de saliva vs Iga de suero

Salida de regresión

Constante	0.054619
Error std de Y est	0.100357
R al cuadrado	0.759620
No de observaciones	45
Grados de libertad	2
Coefficiente de X	0.735207
Error std de coef	0.063070

Análisis de varianza para la regresión

Fuente de variación	gl	SC	MC
REG	1	1.368570	MCr = 1.368570
ERR	43	0.433079	MCer = 0.010071

$$F_{cal} = MCr/MC_{er} = 135.8838$$

$$F_{tab} = 4.0$$

HIPOTESIS:

H₀. X y Y no están relacionadas linealmente

H_a. X y Y están relacionadas linealmente

Como F_{cal} es mayor que F_{tab} no se acepta H₀, por lo tanto las variables se relacionan linealmente

Nivel de significancia de $\alpha = 0.05$

DISCUSION

Los resultados de la purificación de la estreptolisina O por sephadex G-100 representados en la tabla número 2 (figura 1) muestran que la estreptolisina O presenta dos tipos de proteínas y que ambas son necesarias para que se presente actividad hemolítica. De éstas fracciones se juntaron las 6, 7, 8 y 9 para obtener un pool que proporcionara un 100% de actividad se le proporcionó la concentración de proteínas (480 mg/ml) y se usó como fase sólida durante todo el estudio.

Los resultados del análisis de estreptolisinas para cada muestra de suero son representados en la tabla número 3 para fines prácticos se les asigno un número el cual se manejó en lo sucesivo. Se especifica además el sexo y la edad de los pacientes de los cuales la mayor parte son adultos. Para la estandarización de la técnica se tomó la muestra número 24 por tener un título de antiestreptolisinas alto (1250 UT) de esta forma se aseguró que las determinaciones de absorbancia a 409 nm no sobrepasaran el valor de 1.

Durante la estandarización del método de análisis se trabajó con diferentes concentraciones de estreptolisina (8, 4, 2, 1, 0.5 0.25 y 0.125 mg/ml) y de suero (1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:250, 1:500, 1:750, 1:1000, 1:3000, 1:5000 y 1:7500) pero sólo se reportaron los resultados que van más acorde con el objetivo del estudio y están representados en las tablas número 4 y 5 .

La tabla no. 4 (fig. 2) muestra los resultados de absorbancia para una concentración de estreptolisina de 0.50 mg/ml y los datos que se obtienen a partir de la ecuación de la recta:

$$y = - 0.14644 (x) + 1.189209$$

resultado de la regresión lineal la cual tuvo un coeficiente de regresión $r^2 = 0.866$ lo que indica un considerable hacercamiento a una recta pero con bastante dispersión.

La tabla no. 5 (figura 3) muestra los resultados de absorbancia una concentración de estreptolisina de 0.25 mg/ml, realizando el cálculo de la regresión se obtuvo la ecuación de la recta siguiente:

$$y = -0.17461 (x) + 1.07329$$

con un coeficiente de regresión $r^2 = 0.949$. Estos resultados asemejan una línea recta lo cual se pudo observar en la figura 3, la dispersión en los puntos centrales es posible se deban a un lavado poco eficiente, por lo tanto se dispuso que la concentración de estreptolisina O más adecuada para el trabajo es de 0.25 mg/ml así mismo la dilución de suero conveniente es de 1:100, porque en este rango se obtienen absorbancias con valores superiores a 0.5. También se realizaron pruebas con saliva (no reportadas) de las cuales se obtuvieron absorbancias muy pequeñas por lo que se trabajaron en forma directa, es decir, sin dilución.

En la búsqueda de una relación entre los títulos de antiestreptolisinas en suero, con los valores de antiestreptolisina

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

de tipo IgA e IgG en saliva de pacientes asintomáticos se estableció la hipótesis de que los valores deberían correlacionar linealmente, es decir, que cuando se tuvieran títulos de unidades Todd altos se tendrían valores de antiestreptolisinas de tipo IgA e IgG altos, por lo tanto, para analizar los resultados se utilizó la regresión lineal como arma estadística para buscar correlación entre el conjunto de datos y el análisis de varianza para la regresión para finalmente establecer si existe o no una relación entre las variables.

En la tabla no. 6 se presentan los resultados de las lecturas de ELISA para antiestreptolisinas de tipo IgG en suero y los correspondientes valores de unidades Todd de suero, en la tabla no. 7 se presentan los resultados de la regresión lineal y su análisis de varianza, como se observa, no existe una correlación lineal entre el grupo de datos ya que su coeficiente de correlación $r^2 = 0.111793$ es sumamente bajo. Al realizar el análisis de varianza se encontró un valor de $F_{cal} = 5.41$, que es mayor que la $F_{tab} = 4.0$, a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, por lo tanto, si existe una correlación lineal entre las variables, esto se esperaba por tratarse de IgG de suero e indica una exposición reciente al estreptococo y que la respuesta inmune es en su mayor proporción de tipo IgM y sólo una pequeña parte de otros tipos, se propone, que en los siguientes estudios se realice un monitoreo de por lo menos cuatro determinaciones a diferentes tiempos, para observar cómo se comportan los valores de ELISA y establecer así una posible correlación.

En la tabla no. 8 se presentan los resultados de las antiestreptolisinas de tipo IgA en suero con sus unidades Todd, y en la tabla no. 9 los resultados de la regresión lineal junto con el análisis de varianza, encontrándose que tampoco existe una correlación entre los datos ya que el coeficiente de regresión es todavía más bajo que el anterior $r^2 = 0.031168$. Con el análisis de varianza se acepta H_0 , por lo que no hay ninguna relación entre las variables, estos resultados concuerdan con lo mencionado anteriormente y es debido al nivel de especialización de la respuesta inmune, primero se presenta la IgM, seguida por la IgG, después IgA, IgD e IgE. De igual forma se sugiere un monitoreo seriado.

En la tabla no. 10 se presentan los resultados de las antiestreptolisinas IgG de saliva contra las unidades Todd, la tabla no. 11 presenta los resultados de la regresión lineal y análisis de varianza de la regresión donde tampoco se encontró relación alguna entre ambos grupos, aunque el valor de F_{cal} para la ANADEVIA fue muy cercano al de tablas sugiriendo que en otras condiciones de mayor tiempo de exposición del estreptococo con el huésped es posible encontrar alguna relación con las unidades Todd. Esto mismo sucede con los resultados correspondientes a las antiestreptolisinas de tipo IgA en saliva contra las unidades Todd, presentados en las tablas no. 12 y 13 en donde no hay ninguna relación entre variables.

Debido a estos resultados se realizaron comparaciones entre variables, es decir, buscar relación entre los resultados del análisis por ELISA y como las estreptolisinas del tipo IgG en suero fueron las únicas que presentaron una relación con las unidades Todd, este conjunto de datos se confrontó con los otros resultados, encontrándose que, comparando las antiestreptolisinas de tipo IgG de suero contra las de tipo IgG de saliva (tablas no. 14 y 15) su

análisis de varianza de la regresión indica que existe una relación lineal entre las variables, esto se explica porque dentro de la estructura de la encía existen capilares de irrigación por los cuales puede existir transudación de IgG del suero hacia la cavidad oral, originando por esta razón una cantidad de antiestreptolisinas de tipo IgG en saliva, aunque tiene un coeficiente de regresión bastante bajo.

En los resultados presentados en las tablas 16, 17, 18 y 19 se comparan las antiestreptolisinas de tipo IgG de suero con las de tipo IgA de suero e IgA de saliva encontrándose que no existe relación alguna entre ellas y esto es prácticamente por que se trata de una reproducción local de IgA a nivel de encía, en donde, la célula B se encuentra produciendo IgA e IgA secretora contra la estreptolisina O obedeciendo al fenómeno llamado de *homing*. Esto se relaciona con los resultados de la tabla no. 21, en la cual se compara la antiestreptolisina de tipo IgA de suero contra la de IgA de saliva encontrándose un coeficiente de regresión $r^2 = 0.7596$ que es el más alto encontrado en todo el estudio realizado, esto indica que sí existe un grado de correlación lineal entre las variables antes mencionadas y el análisis de varianza para la regresión lo demuestra, por tanto, existe transudación de IgA a la cavidad oral y torrente sanguíneo, por lo que se presenta una relación estrecha entre las cantidades de IgA salival e IgA sérica.

CONCLUSIONES

Se determinó el nivel de antiestreptolisina IgA secretora específica en saliva de pacientes, utilizando el método indirecto de ELISA, se comparó con el valor de las unidades Todd, encontrándose que ninguna antiestreptolisina de tipo IgA de saliva, IgA de suero, IgG de saliva e IgG de suero presentan una correlación lineal contra las unidades Todd.

La antiestreptolisina IgG específica sérica está relacionada con las unidades Todd pero no linealmente.

La antiestreptolisina IgG específica sérica e IgG específica salival están relacionadas únicamente por transudación del suero hacia cavidad oral.

La antiestreptolisina IgA específica secretora e IgA específica sérica se correlacionan linealmente por producción local y transudación a cavidad oral.

RECOMENDACIONES

Aunque las determinaciones de antiestreptolisinas IgA secretora específica no se relacionaron correctamente con las unidades Todd de suero es recomendable realizar un monitoreo seriado de los pacientes con un mínimo de cuatro determinaciones de antiestreptolisinas seleccionando sólo aquellos con predisposición a una fiebre reumática aguda, para reducir las variables y buscar una correlación congruente con las unidades Todd y considerar así, la técnica de ELISA como una alternativa en el seguimiento de procesos no supurativos como la fiebre reumática aguda.

BIBLIOGRAFIA

1. Braude A. Microbiología Clínica. Buenos Aires: Ed. Panamericana, 1984: 326-330.
2. Balows A, Hrvsler H, Senberg J. Manual of Clinical Microbiology. 15a ed. 1991: pp. 238-257.
3. Collee JG, Duguid JP, Fracer AG. Practical Medical Microbiology. 13a ed. Churchill Livingstone London and New York, 1989.
4. Damian RT. Molecular mimicry: antigen sharing by parasite and host consequences. Am Naturalist 1964; 98: 129-149.
5. Froude J. Cross-reactivity between streptococcus and human tissue, a model of molecular mimicry and autoimmunity in Molecular mimicry. Current topics in Microbiology and Immunology Ed. Oldstone MBA. 1989; Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
6. Fillit HM, Zabriskie JB. Cellular immunity in glomerulonephritis. Am J Pathol 1982; 109: 227-243.
7. Fillit HM, Damle SP, Gregory JD, Volin C, Poon-King T, Zabriskie JB. Sera from patients of poststreptococcal glomerulonephritis contain antibodies to glomerula heparan sulphate proteoglycan. J Exp Med 1984; 161: 227.
8. Fillit HM, McCarty M, Blake M. Induction of antibodies to hyaluronic acid by immunization of rabbits with encapsulated streptococci. J Exp Med 1986; 164: 772-776.
9. Lancefield RC. Current Knowledge of the type specific M antigens of group A streptococci. J Immunol 1962; 89: 307-313.
10. Sargent SJ, Beachey EH, Corbett CE, Dale JB. Sequence of protective epitopes of streptococcal M proteins shared with cardiac sarcolemmal membranes. J Immunol 1987; 139: 1285-1290.
11. Dale JB, Beachey EH. Sequence of myosin-cross-reactive epitopes of streptococcal M protein. J Exp Med 1986; 162: 1785-1790.
12. Dale JB, Beachey EH. Localization of protective epitopes of the amino terminus of type 5 streptococcal M protein. J Exp Med 1986; 163: 119-1202.
13. McCarty M. The streptococcal cell wall. The Harvey lectures series 1970; 65: 71-96.
14. Goldstein I, Caravano R. Determination of antigroup A streptococcal polysaccharide antibodies in human sera by and

hemagglutination technique. Proc Soc Exp Biol Med 1967; 124(4): 1209-1212.

15. Goldstein I, Rebeyrotte P, Parlebas J, Halpern B. Action of group A streptococcus extracellular product on the connective tissue of the bovine heart valve. Infect Immunity 1968; 9: 20-25.

16. Zabriskie JB, Freimer EH. An Immunological relationship between the group A streptococcus and mammalian muscle. J Exp Med 1966; 124: 661-678

17. Cunningham MW, McCormack JM, Talaber LR, Harley JB, y col. Human monoclonal antibodies reactive with antigens of the group A streptococcus and human heart. J Exp Med 1988; 164: 988-1012.

18. Cunningham MW, Hall NK, Krisher KK, y col. A study of anti-group A streptococcal monoclonal antibodies cross-reactive with myosin. J Immunol 1986; 136: 293-298.

19. Husby G, Van de Rijn I, Zabriskie JB, Abdin Zh, Williams RC Jr. Antibodies reacting with cytoplasm of subthalamic and caudate nuclei neurons in chorea and acute rheumatic fever. J Exp Med 1976; 144: 1094-1110.

20. Fitzsimmons EJ, Weber M, Lange CF. The isolation of cross-reactive monoclonal antibodies: hybridomas to streptococcal antigens cross-reactive, with mammalian basement membranes. Hybridoma 1987; 6: 61-69.

21. Ellis RJ, Ebert PA, McCarty M, Zabriskie JB. Prolongation of myocardial tissue allografts by pretreatment with streptococcal membrane. Transl Proc 1976; 7: 355-359.

22. Ayoub EA, Barrett DJ, Maclaren NK, Krischer JP. Association of class II human histocompatibility leucocyte antigens with rheumatic fever. J Clin Invest 1986; 77: 2019-2026.

23. Anastasiou-Nana MI, Anderson JL, Carlquist JF, Nanas JN. HLA-DR typing and lymphocyte subset evaluation in rheumatic heart disease: a search for immune response factors. Am Heart J 1986; 112: 992-997.

24. Jhingan B, Reddy KS, Taneja V, Vaidya MC, Bhatia ML. HLA, blood groups and secretor status in patients with established rheumatic fever and rheumatic heart disease. Tissue Antigens 1986; 27: 172-178.

25. Forsberg B, Johnson U et al (1987): Age at onset, sex distribution, and HLA antigens frequency in patients with primary glomerulonephritis progressing to terminal uraemia. An epidemiological survey. Scand J Urol Nephrol 1987; 21: 301-306.

26. Mestecky J. Selective induction of an immune response in human external secretion by ingestion of bacterial antigen. J of Clinical Invest 1978; 61: 731-737.

27. Markowitz AS . Streptococcal related glomerulonephritis in the rhesus monkey. *Trans Proc* 1964; 1: 985-991.
28. Jimenez JC. *Patología médica*. Barcelona: Salvat, 1986:760-765
29. Gremman, DM. *Manual de reumatología*. México D.F.: Interamericana, 1987: 94-99.
30. Organización Mundial de la Salud (OMS). *Estreptococias y Estafilococias*. Serie de informes técnicos No. 394. 1968; Ginebra Suiza.
31. Sanchen CA, Zuaso SJ. Infección por estreptococo beta hemolítico. Relación entre títulos de estreptolisina O. *Rev Cub Med* 1981; 33: 26-38.
32. Ansell, BM. *Rheumatic disorders in chidhood*. London: Butterworths, 1988: 115- 133.
33. Strober W, Brown WR. The mucosal immunosystem. In *immunological diseases*, 4th ed Samter M. Little Brown 1988.
34. Splegelber HL. Biological activities of immunoglobulins of different classes and subclasses. *Adv Immunol* 1974; 19: 259.
35. Natvig IB, Kunkel HG. Immunoglobulins: classes subclasses, genetic variants, and idiotypes. *Adv Immunol* 1973; 16:1.
36. Scientific American Inc/ Editora Científica Médica Latinoamericana 1991 Tomo VII.
37. Mestecky A, Mcghee J. Immunoglobulin A (IgA) molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis, and immune response. *Adv Immunol* 1987; 40:153.
38. Stites P, Daniel T, Abba. *Inmunología básica y clínica*. 7a ed. México D.F.: Manual Moderno, 1993: 115-138.
39. Rubenstein KE, Scheneider RS. Homogeneous enzyme immunoassay a new immunochemical tool. *Biochim Biophys Res Commun* 1972; 47: 846-851.
40. Engvall E, Perlmann P. ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme linked antiimmunoglobulin in antigen coated tubes. *J Immunol* 1972; 109: 129-135.
41. Avrameas ST, Teryck JL, Guesdon. Coupling of enzymes to antibodies and antigens. *Scand J Immunol* 1978; 7: 7-23.
42. Carlsson HE, Lindberg AA. Application of enzyme immunoassay for the diagnosis of bacterial and mycotic infections. *Scand J Immunol* 1978; 8(7): 97-110.
43. Voller A, Didwell D, Bartlett A. *Enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) in manual of clinical immunology*. Roset I, 1980

44. Díaz F. Prevalencia de fiebre reumática y portadores de estreptococos beta hemolíticos grupo A en niños. An Med 1966; 16(3): 215-225.

45. Garrocho C, Vázquez H. Valoración de los métodos de diagnóstico Arch Inst Cardiol 1970; 40: 261-270.