



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

Estandarización de la técnica de ELISA polimixina para la  
detección de LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en  
muestras de individuos con enfermedad periodontal.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JIMÉNEZ GALICIA GUADALUPE

DIRECTOR: DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA

ASESOR: MC. MAURILIO FLORES PIMENTEL



MÉXICO, D.F., SEPTIEMBRE 2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

*“Mientras los hombres sean libres para preguntar lo que deben; libres para decir lo que piensan; libres para pensar lo que quieran; la libertad nunca se perderá y la ciencia nunca retrocederá”*

JULIUS ROBERT OPPENHEIMER

*“El amor ahuyenta el miedo y, recíprocamente el miedo ahuyenta al amor. Y no sólo al amor. El miedo también expulsa la inteligencia, la bondad, todo pensamiento de belleza y verdad. Lo que queda es la desesperación muda [...] Pues al final el miedo llega a expulsar del hombre la humanidad misma”*

ALDOUS HUXLEY

## **Mi más sincero agradecimiento**

A MIS PADRES, POR SU AMOR Y EJEMPLO

A MIS HERMANOS, POR SU AMISTAD Y APOYO

A PACO SAN, POR TODO LO QUE HEMOS COMPARTIDO

A MIS AMIGOS, POR LOS MOMENTOS DE ALEGRÍA

A MIS PROFESORES, POR DEJARME “ALGO MÁS” QUE SOLO CONOCIMIENTO

A LA UNAM, POR DARME LA OPORTUNIDAD DE CRECER COMO PERSONA Y COMO PROFESIONISTA

A LA PROFA. YOLANDA, PROF. MAURILIO, DR. LUIS Y DR. RUBÉN, GRACIAS POR TODO SU APOYO Y PACIENCIA.

**MUCHAS GRACIAS**

---

## ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	2
Marco teórico	3
Estructura dental	3
Periodontitis	4
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	9
Factores de virulencia	12
<i>A actinomycetemcomitans</i> en la periodontitis	13
ELISA	16
ELISA polimixina	18
Planteamiento del problema	20
Objetivo	21
Hipótesis	22
Diseño metodológico y Diagrama de Flujo	23
Materiales y Método	26
Resultados	44
Discusión de resultados	49
Conclusiones	52
Anexos	53
Referencias bibliográficas	59

---

## RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo fue desarrollar una técnica de ELISA ligada a polimixina para la detección de lipopolisacáridos (LPS) de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en muestras orales humanas. Para esto se realizó el cultivo de *A actinomycetemcomitans* ATCC 43718, de la biomasa se extrajo el LPS por el método de Galanos-Westphal y se obtuvo el antígeno O de la bacteria para la inmunización de un Conejo Nueva Zelanda Blanco y así obtener anticuerpos IgM anti LPS de *A actinomycetemcomitans*; se purificaron los anticuerpos y se elaboró un conjugado con peroxidasa de rábano picante. Se realizó la técnica de ELISA polimixina para determinar la presencia de LPS de *A actinomycetemcomitans* en 57 muestras orales humanas, recolectadas por medio de una punta de papel filtro estéril. Dichas muestras eran de pacientes que acudieron a la Clínica de Especialidades de Endoperio de la FES Iztacala, UNAM, de las cuales 50 correspondían a personas con enfermedad periodontal y 7 a personas sanas. Se obtuvo que de los pacientes con enfermedad periodontal 2% presentaron el LPS de *A actinomytemcomitans*, y de los pacientes sin enfermedad periodontal 42.8% presentaron dicho LPS; con lo que se demostró que la técnica es viable para determinar la presencia de LPS de *A actinomycetemcomitans* en muestras orales humanas.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente la enfermedad periodontal representa un serio problema de salud pública en todo el mundo, entre las bacterias más fuertemente asociadas a este padecimiento se encuentra *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, un cocobacilo Gram-negativo que forma parte de la flora oral humana, pero que cuenta con un gran número de factores de virulencia, lo que explica su agresividad en dicha enfermedad.

En la actualidad se han desarrollado diversas técnicas rápidas y precisas para la identificación de dicha bacteria, como son el uso de anticuerpos monoclonales, PCR, ELISA, entre otras. Sin embargo estas técnicas conllevan un costo elevado, por lo que no es viable su aplicación de forma regular.

El objetivo principal de este trabajo es desarrollar una técnica de ELISA polimixina para la detección de lipopolisacáridos (LPS) de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en muestras orales humanas. La técnica se basa en la alta afinidad que tiene la polimixina B por los LPS, lo que simplifica el procedimiento de detección de la bacteria, únicamente se pega la polimixina a la placa y se adiciona la muestra que contiene el LPS. Este es un sistema de captura lo que aumenta la sensibilidad del ensayo.

Además, esta técnica sería de gran ayuda para realizar un estudio de mayor alcance sobre la prevalencia de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en los habitantes de nuestro país, empresa que se ha realizado en otros países y que es importante, porque como se verá esta bacteria y la periodontitis están relacionados con daños sistémicos muy severos.

## MARCO TEÓRICO

### ESTRUCTURA DENTAL

En general cada diente puede dividirse en dos partes: la corona y la raíz. La primera es la parte del diente que está expuesta, en cambio la segunda únicamente puede verse con radiografías <sup>(1)</sup>.

El diente es una estructura compleja compuesta por cuatro diferentes tejidos: esmalte, dentina, pulpa y cemento. La pulpa está localizada en el centro del diente, y está rodeada por una capa de dentina. La dentina se encuentra tanto en la corona como en la raíz del diente, sin embargo en la primera está cubierta por una capa de esmalte, y en la segunda por una capa de cemento. El borde donde se unen el esmalte y el cemento es llamado el cervix del diente, el cual marca también la separación entre la raíz y la corona <sup>(2)</sup>(Fig. 1).

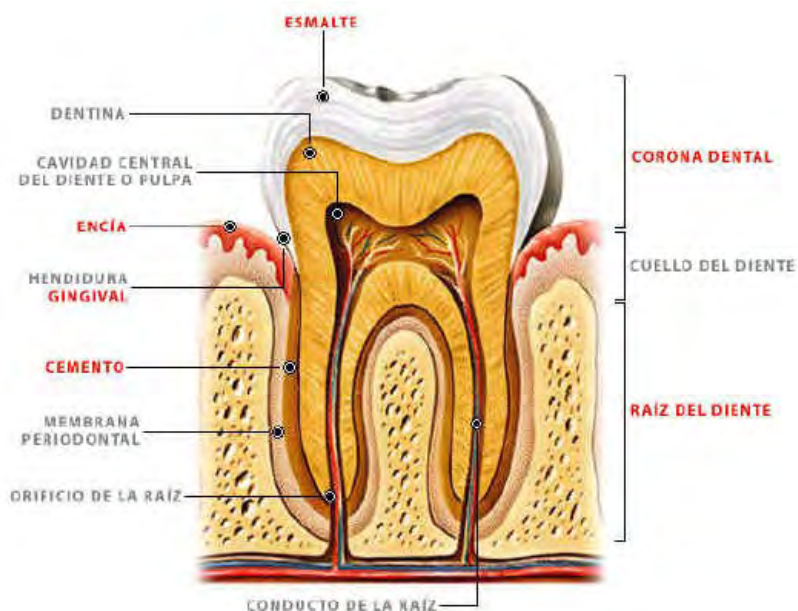


Fig 1: Estructura general del diente. Puede observarse la división general del diente en corona y raíz. Así como los cuatro principales tejidos que lo conforman: esmalte, dentina, pulpa y cemento <sup>(3)</sup>.



El cemento, el hueso alveolar y el ligamento periodontal son los tres tejidos responsables de la unión del diente con los huesos de la quijada: La raíz de un diente está suspendida en una parte de hueso individual o “alveolo” (hueso alveolar). La raíz se une al alveolo por medio de un tejido conectivo denso, el cual consiste primariamente en paquetes de fibras de colágeno, similares a tendones, altamente organizados, éste es el ligamento periodontal, el cual forma una unión especializada entre el diente y el hueso alveolar, algo comparable a una sutura <sup>(2)</sup>.

Clínicamente, el cemento y el hueso alveolar, ambos, son necesarios para la unión de un diente funcional. Si el cemento está ausente, el diente se pierde; afortunadamente, la mayoría del tiempo la resorción del cemento es un proceso localizado, de modo que algunas superficies de la raíz siempre permanecen cubiertas con cemento. De manera similar, si el hueso alveolar está ausente, como en casos severos de enfermedad periodontal, el diente se pierde <sup>(4)</sup>.

## **PERIODONTITIS**

La inflamación de las encías afecta a todas las personas en algún momento de sus vidas, lo que se conoce como gingivitis pero, si además de la inflamación, el ligamento periodontal y el hueso alveolar, que son el soporte de los dientes, también son afectados y comienzan a ser destruidos, la enfermedad es conocida como periodontitis <sup>(5)</sup> (Fig. 2).

La periodontitis es una enfermedad infecciosa que genera inflamación de los tejidos del soporte dental, pérdida de inserción progresiva y pérdida ósea, caracterizada por la formación de bolsas que pueden afectar un número variable de dientes y que muestra diferentes velocidades de progresión <sup>(7)</sup>.

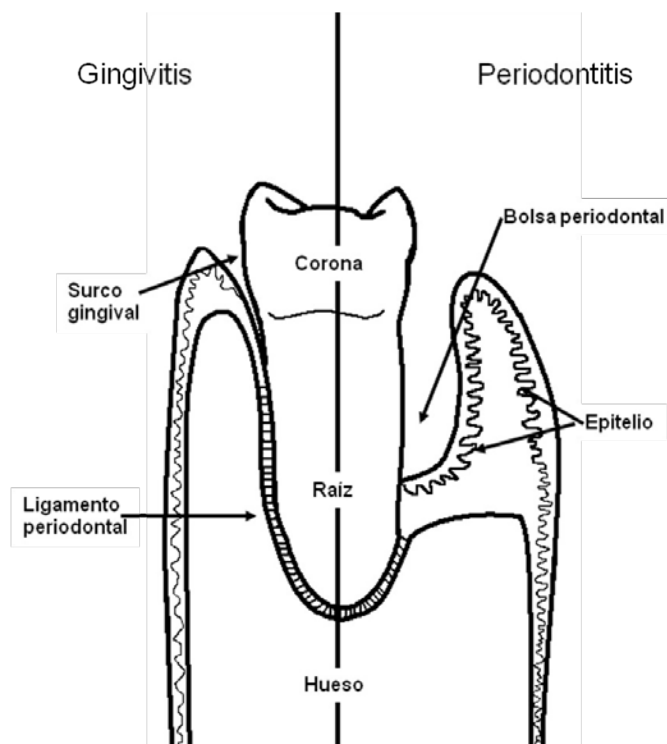


Fig. 2. Diagrama donde se compara el tejido dental cuando se encuentra mínimamente inflamado o con gingivitis y cuando es afectado con periodontitis. Puede observarse que en la periodontitis hay destrucción del ligamento periodontal, pérdida del hueso alveolar y formación de bolsa periodontal <sup>(6)</sup>.

Desde 1950 se han llevado a cabo estudios epidemiológicos de enfermedades periodontales encontrándose que hay una relación directa causa-efecto entre la placa dental y la severidad de la enfermedad periodontal <sup>(8)</sup>. La placa bacteriana es una estructura no calcificada constituida por componentes salivares y numerosos géneros bacterianos en crecimiento continuo; las diferentes especies acumuladas en dicha estructura pueden proteger contra la colonización por patógenos exógenos o constituir el inicio, progresión y destrucción de las estructuras periodontales <sup>(7)</sup>.

Se ha encontrado que la flora gingival en las enfermedades periodontales no solo se incrementa en masa, sino que también existe un cambio en la flora predominantemente de aerobios o facultativos Gram-positivos a una proporción mucho mayor de bacilos anaerobios Gram-negativos y organismos móviles <sup>(9)</sup>.

Claras diferencias en la microbiota subgingival entre sanos y enfermos han sido bien documentadas, por ejemplo, sitios sanos están asociados con placa escasa la cual consiste mayormente en cocos Gram-positivos. La placa asociada con gingivitis se presenta conteniendo números incrementados de especies de *Actinomyces* y números reducidos de *Streptococcus*. En un estudio se encontró que los sitios subgingivales que experimentaban pérdida activa estuvieron a menudo habitados por *Bacteroides forsythus*, *Bacteroides gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* o combinaciones de estos organismos <sup>(8)</sup>.

Para que la resorción del hueso, que es característica en la periodontitis, se lleve a cabo se requiere una interacción entre las células formadoras del hueso “osteoblastos” y las células encargadas propiamente de la resorción ósea “osteoclastos” <sup>(5)</sup>. El principal mecanismo regulador de la actividad osteoclástica es llevada a cabo por miembros de la familia de receptores de TNF: RANK (Receptor-activador del factor nuclear- $\kappa$ B), la osteoprotegerina OPG y el ligando RANK-L. El RANK está expresado en precursores osteoclásticos y osteoclastos maduros, mientras que su ligando el RANK-L, una proteína transmembrana, está expresada particularmente en los osteoblastos <sup>(10)</sup>.

La unión entre el RANK-L y el RANK en las células precursoras osteoclásticas estimula la producción de osteoclastos maduros. Los osteoblastos también producen una proteína soluble de unión con el RANK-L, llamada osteoprotegerina “OPG”, la cual contrarresta los efectos de la unión RANK-RANK-L. Estudios recientes han demostrado que las interacciones entre el OGP, RANK-L y el RANK forman una intrincada regulación en la osteoporosis y las enfermedades osteolíticas, como la artritis, enfermedad periodontal y metástasis óseas asociadas a tumores <sup>(11)</sup>.

Otros factores, además del sistema RANK-L, tales como las citocinas están involucradas en la fisiología y patología del tejido óseo: Entre los principales factores inmunes que promueven la resorción ósea se encuentran: IL-1, TNF $\alpha$ ,

TNF $\beta$ , IL-6, PGE2, IL-8, IL-3, IFG, de los cuales la mayoría están presentes en la gingiva inflamada y fluido crevicular durante la enfermedad periodontal y decrecen después de terapia periodontal exitosa <sup>(12,13)</sup>.

Clasificación:

De 1977 a 1989, la Academia Americana de Periodontología (AAP) pasó de 2 categorías principales de enfermedad periodontal a 5 (Cuadro 1). La clasificación de enfermedad periodontal de 1989 (acordada en los talleres mundiales de Periodontología Clínica) fue una importante mejora con respecto a las anteriores clasificaciones, sin embargo, tenía sus debilidades. En particular, algunos criterios para el diagnóstico estaban poco claros, las diferentes categorías de las enfermedades se superponían, y los pacientes no siempre encajaban en alguna de las categorías. Por otra parte, se hizo demasiado hincapié en la edad de aparición de las enfermedades y en la tasa de progresión, que a menudo son difíciles de determinar. Por último, no existía una clasificación para las enfermedades limitadas de la encía <sup>(14)</sup>.

**Cuadro 1. Evolución del sistema de clasificación de la enfermedad periodontal de la AAP**

1977	1986	1989
I. Periodontitis juvenil	I. Periodontitis juvenil	I. Periodontitis de comienzo temprano
II. Periodontitis crónica marginal	A. Prepubertal	A. Periodontitis Prepubertad
	B. Periodontitis Juvenil Localizada	1. Localizada
	C. Periodontitis Juvenil Generalizada	2. Generalizada
	II. Periodontitis adulta	B. Periodontitis Juvenil
	III. Periodontitis Gingivo ulcerativa necrozante	1. Localizada
	IV. Periodontitis refractaria	2. Generalizada
		C. Periodontitis de progreso rápido
		II. Periodontitis adulta
		III. Periodontitis ulcerativa necrozante
		IV. Periodontitis refractaria
		V. Periodontitis asociada con enfermedades sistémicas

Del 30 de octubre al 02 de noviembre de 1999, un Taller Internacional para la Clasificación de las enfermedades periodontales y sus Condiciones fue organizado por la Academia Americana de Periodontología para hacer frente a estas preocupaciones y para revisar el sistema de clasificación <sup>(15)</sup>. La nueva clasificación cuenta con numerosas subcategorías y modificaciones, las cuales se resumen en el Cuadro 2:

Cuadro 2: Versión abreviada de la clasificación de 1999 de enfermedades periodontales y sus condiciones.

I.	Enfermedades Gingivales
	A. Enfermedades gingivales inducidas por placa dental
	B. Lesiones gingivales no inducidas por placa
II.	Periodontitis Crónica
	(Leve: 1-2 mm CAL; moderada: 3-4 mm CAL; severa: > 5 mm CAL)
	A. Localizada
	B. Generalizada (> 30% de los sitios están involucrados)
III.	Periodontitis Agresiva
	(Leve: 1-2 mm CAL; moderada: 3-4 mm CAL; severa: > 5 mm CAL)
	A. Localizada
	B. Generalizada (> 30% de los sitios están involucrados)
IV.	Periodontitis como Manifestación de Enfermedades Sistémicas
	A. Asociadas con desordenes hematológicos
	B. Asociadas con desordenes genéticos
	C. No especificadas
V.	Enfermedades Periodontales Necrotizantes
	A. Gingivitis Ulcerativa Necrotizante
	B. Periodontitis Ulcerativa Necrotizante
VI.	Abscesos del Periodonto
	A. Abscesos gingivales
	B. Abscesos periodontales
	C. Abscesos pericoronales
VII.	Periodontitis Asociada con Lesiones Endodóncicas
	A. Lesiones combinadas periodonticas-endodóncicas
VIII.	Deformaciones y Condiciones Desarrolladas o Adquiridas
	A. Factores localizados relacionados con el diente que modifican o predisponen a enfermedades/periodontitis gingivales inducidas por placa
	B. Deformaciones mucogingivales y condiciones dentales
	C. Deformaciones mucogingivales y condiciones en crestas no dentadas
	D. Trauma oclusal
	CAL: Pérdida dental clínica

## **ACTINOBACILLUS ACTINOMYCETEMCOMITANS**

Por primera vez descrita en 1912 y nombrada de diversas formas a través de los años, fue reconocida como un miembro de la flora normal oral humana en los cincuenta <sup>(5)</sup>, sin embargo recientemente se le ha considerado exógeno debido a que está fuertemente asociado con estados patógenos y no con estados de salud <sup>(8)</sup>.

El hábitat primario no ha sido identificado definitivamente <sup>(5,16)</sup>, pero ha sido aislada de un gran número de hábitats, incluyendo la placa supragingival, placa subgingival, saliva, mucosa de las mejillas, mucosa bucal, gingiva, lengua (superficie lateral y dorsal), paladar y amígdalas <sup>(17,18)</sup>. Se ha especulado que su presencia en tantos sitios orales sea una de las razones por las que se ha encontrado su alta tasa de transmisión intrafamiliar <sup>(19)</sup>.

*Actinobacillus actinomycetemcomitans* es un cocobacilo Gram-negativo, no esporulado, no móvil, anaerobio facultativo, que crece en un ambiente enriquecido con 5-10% de CO<sub>2</sub>, a una temperatura de 37° C, en un pH de 7-8.5,. Son bacilos rectos o curvos, con las puntas redondeadas, tiene un tamaño de 1.0-1.5 µm por 0.4-0.5 µm. y puede ser estimulado por un número de reactivos de bajo peso molecular incluyendo varias hormonas esteroideas <sup>(5,16,17,20,21)</sup>.

La bacteria desarrolla lentamente en agar chocolate y agar sangre, donde se pueden visualizar colonias después de 48-72 horas. Las colonias son pequeñas, lisas, translúcidas, no hemolíticas y poseen bordes ligeramente irregulares. En los aislamientos clínicos frescos se producen unas colonias de 1-2 mm, rugosas, que se adhieren al agar. La incubación prolongada (5-7 días) determina el desarrollo de un área densa central que adopta el aspecto de una estrella de cuatro o seis puntas <sup>(16,17,22,23,24)</sup> (Fig. 3).



Fig. 3. Morfología de las colonias de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* observadas con microscopio estereoscópico a 4,5 aumentos (fotografía tomada en el Laboratorio de Microbiología Oral, Instituto UIBO, Universidad El Bosque) <sup>(7)</sup>.

Debido a sus requerimientos especiales se han desarrollado diversos medios de cultivo para su aislamiento <sup>(24,25,26)</sup>, entre los que destacan el agar TSBV (Soya Tripticasa-suero- bacitracina-vancomicina) y el DENTAID-1 (BHI, extracto de levadura, fumarato de sodio, formiato de sodio, vancomicina), los cuales tratan de inhibir el crecimiento de otras bacterias a través de la incorporación de antibióticos a los cuales no es susceptible *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

La morfología colonial de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* puede sufrir cambios, puede pasar de colonias rugosas a lisas después de hacerse subcultivos en medio agar. Los aislamientos de la bacteria han demostrado tener tres tipos de morfología colonial: rugosa (que puede ser vista en el primer cultivo), intermedia (vista durante la transformación) y mucoide o lisa (vista después de la transformación). Se ha descubierto que el tipo rugoso corresponde a la bacteria con una gran cantidad de fimbrias, y que su transformación a colonias lisas corresponde a la pérdida de éstas <sup>(8,17,22)</sup>.

Serológicamente, son reconocidos 6 serotipos del componente O-polisacárido del Lipopolisacárido, según las reacciones con los anticuerpos monoclonales tipo específicos, y se ha sugerido que todos tienen potencial patogénico, y van del a-f<sup>(5,16)</sup>. La incidencia del serotipo b está significativamente elevada en la Periodontitis Agresiva Localizada, en cambio los serotipos a y c han sido aislados de enfermedades extra orales<sup>(22)</sup>.

*Actinobacillus actinomycetemcomitans* ha sido asociado con infecciones actinomicóticas, endocarditis, bacteriemia, infección de las heridas, enfermedades coronarias, infecciones del tracto urinario, abscesos cerebrales, osteomielitis vertebral, diabetes, bajo peso al nacer e infecciones dentales<sup>(5,16,22)</sup>.

Anteriormente se tenía a la endocarditis bacteriana subaguda como la infección más frecuentemente asociada con la bacteria, pero estudios recientes han revelado que la dentadura deteriorada es un factor predisponente importante para el desarrollo de endocarditis, y más recientemente se ha descubierto que esta bacteria se asocia específicamente con una entidad clínica bien definida, denominada LAP (Periodontitis Agresiva Localizada, por sus siglas en inglés)<sup>(16)</sup>.

Este microorganismo comparte numerosas características de cultivo y bioquímicas con el género *Haemophilus*. En 1985 se propuso formalmente trasladar a *Actinobacillus actinomycetemcomitans* al género *Haemophilus*, y por algún tiempo se le conoció como *Haemophilus actinomycetemcomitans*, sin embargo esto finalmente fue rechazado por la Subcomisión sobre *Pasteurellaceae* y Microorganismos relacionados de la Comisión Internacional de Bacteriología Sistemática, debido a que *Actinobacillus actinomycetemcomitans* no tenía mayores similitudes con la especie tipo del género *Haemophilus*, es decir *Haemophilus influenzae*<sup>(16)</sup>. Sin embargo todavía, en algunas bibliografías se le puede encontrar como *Haemophilus actinomycetemcomitans*<sup>(27)</sup>.



## Factores de Virulencia

Aunque se han identificado un gran número de “factores de virulencia” *in vitro* de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, no han sido realizados estudios *in vivo* para establecer si algunas de estas proteínas están implicadas en la patología tisular <sup>(5,16)</sup>.

Estos factores son una potente leucotoxina, un factor inhibidor de la quimiotaxis de los neutrófilos, un factor inhibidor de los fibroblastos, una toxina inductora de la resorción ósea, colagenasa, fosfatasa alcalina y una endotoxina lipopolisacárida. También produce enzimas capaces de degradar las inmunoglobulinas G, M y A, lo que impide su opsonización por los anticuerpos <sup>(16)</sup>. Se ha reportado que *Actinobacillus actinomycetemcomitans* produce un número de proteínas que inhiben la actividad de la mitosis, causando que ésta quede atorada en la fase G2 <sup>(5)</sup>. Además cuenta con una proteína de membrana externa Omp100, la cual le faculta habilidades de adhesión, invasión y resistencia al suero <sup>(28)</sup>.

Cabe destacar que *Actinobacillus actinomycetemcomitans* también produce varios factores que estimulan la respuesta inmune. Se ha demostrado que cultivos de la bacteria con células epiteliales de la gingiva humana induce la producción de IL-1, IL8, TNF, etc <sup>(5)</sup>.

Este microorganismo también produce fimbrias, compuestas por una subunidad proteica de 6.5 kDa, que posiblemente son las que iniciarían la adherencia de las bacterias a las células orofaríngeas <sup>(5,16)</sup>.

El producto más activamente estudiado de este organismo es la leucotoxina LFA-1. El operon de esta leucotoxina consiste en cuatro genes: el LtxC, LtxA, LtxB y LtxD. La proteína LtxA es la toxina activa y tiene que ser acilada, por la LtxC, para estar biológicamente activa. Las otras dos proteínas son responsables del

transporte y secreción de la LtxA. Se ha pensado que la LtxA se encuentra enteramente asociada a la célula, esto significa que la bacteria por si misma es tóxica en las células blanco. Análisis mas detallados han revelado que las colonias adherentes (rugosas) no secretan la leucotoxina, en cambio las no adherentes (lisas) sí lo hacen. La respuesta a estas leucotoxinas por parte de las células blanco es la apoptosis, por un mecanismo que involucra la perturbación mitocondrial <sup>(5,17)</sup>.

La posibilidad de que estos factores de virulencia desempeñen un papel en la inducción de enfermedad clínica es sugerida por el desarrollo gradual de opsoninas séricas y gingivales y anticuerpos neutralizantes dirigidos contra algunos de estos componentes antigénicos <sup>(16,29)</sup>.

### ***Actinobacillus actinomycetemcomitans en la periodontitis***

El Lipopolisacárido, presente en las bacterias Gram-negativas, consiste en un fosfoglicolípido anclado a la membrana bacteriana (lípidos A), unido covalentemente a un heteropolisacárido hidrofílico, que es la que confiere actividad biológica a la molécula <sup>(30)</sup>. El heteropolisacárido comprende dos regiones: la cadena O-específica también llamada antígeno O, formada por unidades repetitivas de oligosacárido; y el *core*, éste a su vez se subdivide en *core* externo (formado por hexosas), mediante el cual se une al antígeno O; y el *core* interno (formado por heptosas). El lípidos A se une a esta porción mediante un residuo llamado KDO (ácido 2-keto-3-deoxioctanoico). La variabilidad del LPS juega un papel importante en cuanto a la capacidad inmunológica y depende de la región que estemos considerando <sup>(31)</sup> (Fig. 4).

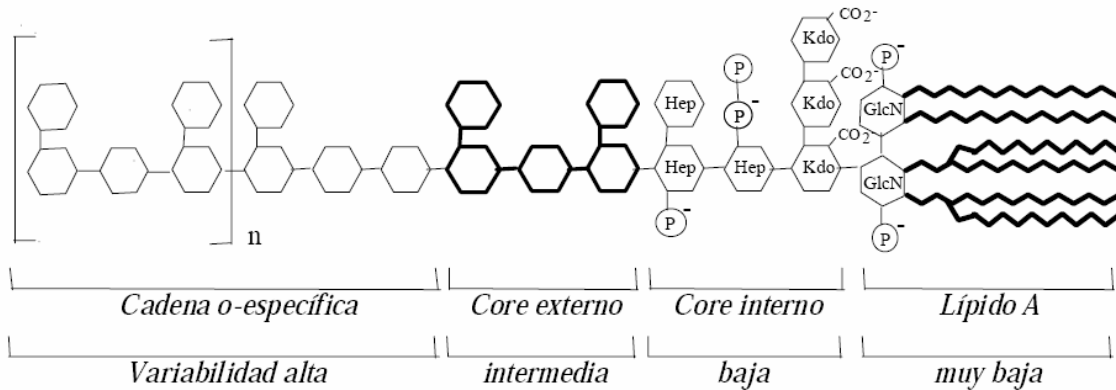


Figura 4: Estructura del Lipopolisacárido. Se muestran sus diferentes estructuras y como va modificándose la variabilidad en cada una de éstas <sup>(31)</sup>.

En todas las enfermedades bacterianas que involucran inflamación y destrucción tisular, el LPS es siempre considerado como un factor de virulencia clave <sup>(32)</sup>. El LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ha sido reportado como un estimulador de la resorción ósea *in vivo* e *in vitro*, sin embargo también se ha establecido que el LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* es un activador de citocinas menos efectivo que las proteínas secretadas por la bacteria <sup>(33)</sup>, y junto con estas proteínas secretadas está una molécula potentemente degradante del hueso, la cual fue identificada como una célula de estrés, la caperonina 60, la cual estimula la resorción ósea actuando como un factor de crecimiento del osteoclasto <sup>(17)</sup>.

La estimulación de células T-CD4 con *Actinobacillus actinomycetemcomitans* indujo la producción de RANK-L, provocando la activación de los osteoclastos y la osteoclastogénesis. *In vivo*, la inhibición de la función del RANKL por medio de su antagonista el OPG significativamente redujo tanto la destrucción del hueso alveolar después del estímulo microbiano, como el número de osteoclastos en los sitios de inflamación local periodontal. Esto sugiere que los microorganismos que estimulan la inducción de la expresión del RANK-L en las células TCD4 y la activación del osteoclasto mediada por el RANK-L representan

la explicación molecular para la destrucción del hueso alveolar observada en las infecciones periodontales <sup>(5,11)</sup> (Fig. 5).

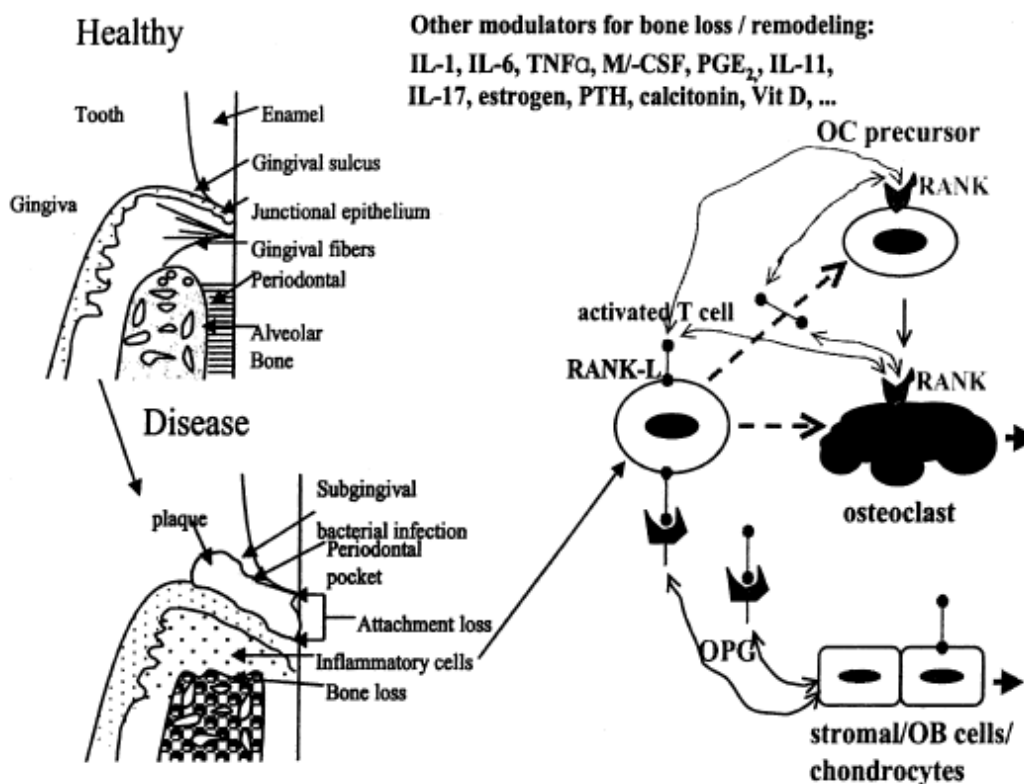


Fig. 5. A través del procesamiento y presentación de antígenos de los microorganismos patógenos periodontales (vía células dendríticas, macrófagos, células B activadas, etc.) las células T-CD4, se activan y producen moléculas de RANK-L, las cuales pueden activar directamente a los osteoclastos (OC) e inducir la resorción ósea, así como promover la diferenciación y activación de los precursores de OC. El receptor natural del RANK-L, el OPG, producido por las células del estroma (osteoblastos, condrocitos) puede competir por la unión a las moléculas de RANK-L, contrarrestando así los efectos de la resorción ósea. Tomada de: Teng Y-T A. The role of acquired immunity and periodontal disease progression. Crit Rev Oral Biol Med 2003.

Esto sugiere que, a pesar de los factores de virulencia, mucho del daño en esta enfermedad es el resultado de la respuesta del huésped a la bacteria, no a la bacteria por sí misma. Infecciones subgingivales generan varias respuestas inmunes del huésped, estimulando la secreción celular inmune de citocinas reguladoras de la resorción ósea, además algunos productos bacterianos actúan de manera sinérgica con factores de la respuesta inmune del huésped para aumentar la resorción ósea; por ejemplo, el LPS junto con PGE $_2$  o IL-1 $\beta$  incrementa la resorción <sup>(12)</sup>.

## ELISA

El Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima o ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) fue conceptualizado y desarrollado por Peter Perlmann como investigador principal, y Eva Engvall, en la Universidad de Estocolmo, Suecia <sup>(34)</sup>; y desde su primera publicación, en 1971, para demostrar cuantitativamente los niveles de IgG en suero de conejo, ésta y otras técnicas relacionadas han tenido un impacto abrumador en el ámbito de la investigación mundial <sup>(35)</sup>.

La ELISA permite identificar inmunocomplejos por medio de enzimas unidas a un antígeno o anticuerpo, estando uno de ellos adsorbido a un soporte sólido (habitualmente una placa de poliestireno). La reacción antígeno-anticuerpo se detecta mediante la utilización de una enzima conjugada químicamente al antígeno o al anticuerpo. La enzima convierte un sustrato incoloro en un producto coloreado (tras añadir un sustrato apropiado), cuyo color es proporcional a la cantidad de inmunocomplejos formados <sup>(36)</sup>. Esta técnica es muy sensible y permite analizar muchas muestras de forma simultánea <sup>(37)</sup>.

Los pasos de la ELISA se pueden resumir en los siguientes <sup>(38,39,40)</sup>:

1. Tapizado del pocillo con el antígeno o anticuerpo
2. Adición de la muestra problema con la mezcla de antígenos o anticuerpos.
3. Unión del antígeno o anticuerpo específico al anticuerpo o antígeno tapizado en el pocillo.
4. Lavado del pocillo para eliminar el exceso de antígeno o anticuerpo no unido
5. Adición del anticuerpo secundario marcado con la enzima
6. Unión del anticuerpo secundario al antígeno o anticuerpo
7. Lavado del pocillo para eliminar el exceso de enzima no unida
8. Adición del sustrato
9. Unión del sustrato a la enzima
10. Desarrollo de color

Actualmente es pueden encontrar diferentes tipos de ELISA, los cuales se pueden clasificar de la siguiente forma <sup>(41)</sup>:

- ELISA directo
- ELISA indirecto
- ELISA sándwich
  - Doble (DAS)
  - Heterólogo (HADAS)
- ELISA competitivo

Dependiendo del tipo de ELISA que se trate los pasos anteriormente mencionados se van modificando. En la Figura 6 se muestra un esquema de las variaciones en los tipos de ELISA:

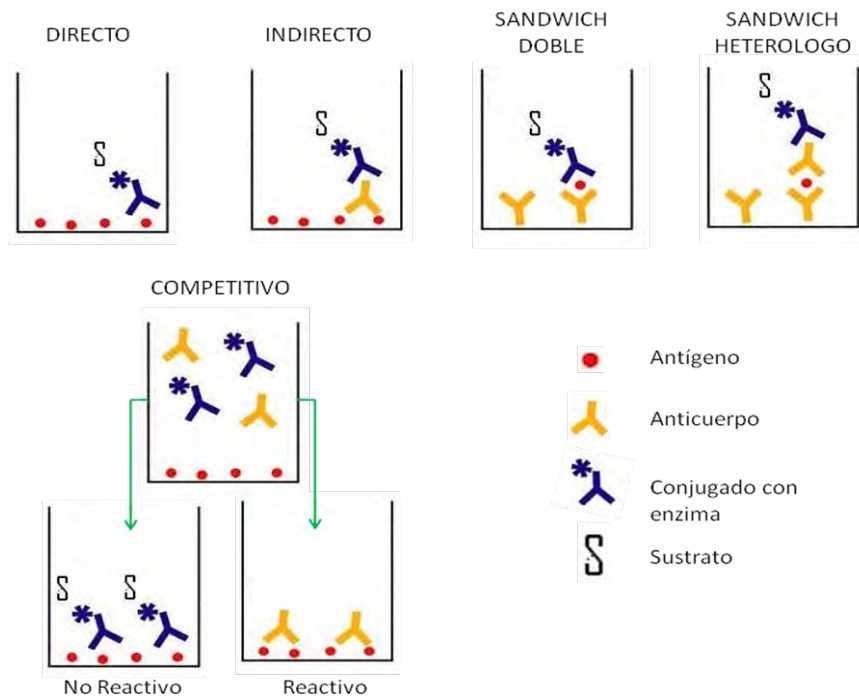


Figura 6. Esquema de los diferentes tipos de ELISA. En cada caso se muestra como quedan los pocillos en caso de que la muestra contenga el analito buscado (parte derecha del pocillo) y como si la muestra no contiene dicho analito (parte izquierda del pocillo) <sup>(42,43)</sup>.

En la actualidad la técnica se lleva a cabo en micro placas de poliestireno de 96 pocillos, lo cual facilita procesar un gran número de muestras en menor tiempo. El poliestireno es el material ideal debido a que su estructura química lo hace un material naturalmente hidrofóbico (Fig. 7), lo que permite la adsorción pasiva de un gran número de biomoléculas <sup>(45)</sup>. Además el poliestireno puede ser fácilmente modificado para aumentar sus propiedades hidrofóbicas, se ha encontrado que un método fácilmente aplicable es su exposición a la luz UV <sup>(45,46)</sup>.

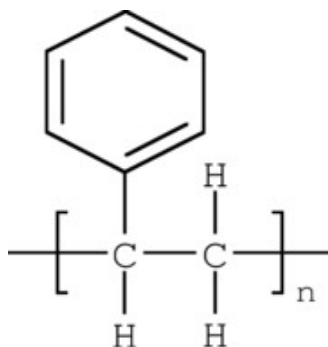


Figura 7. Estructura del poliestireno. Puede observarse que se trata de una larga cadena de carbonos de los cuales se desprenden anillos de benceno, lo que le otorga sus propiedades hidrofóbicas <sup>(44)</sup>.

Algo crucial al realizar la técnica de ELISA es elegir correctamente el tipo de enzima a utilizar para preparar el conjugado, en el Cuadro 3 se muestran las ventajas y desventajas de las enzimas generalmente utilizadas.

### ELISA polimixina

A la técnica de ELISA tradicional se le ha añadido la utilización de polimixina (en lugar de anticuerpos) como un adsorbente de alta afinidad para la captura de lipopolisacáridos (LPS), los cuales posteriormente son detectados inmunoenzimáticamente utilizando anticuerpos contra dichos LPS. Como un agente de captura de LPS la polimixina ha demostrado ser accesible y químicamente estable <sup>(48)</sup>.

Cuadro 3: Principales enzimas utilizadas en la técnica de ELISA. Ventajas y Desventajas <sup>(47)</sup>.

ENZIMA	VENTAJAS	DESVENTAJAS
B-galactosidasa	-Incrementa su tasa de reacción en presencia de alcoholes	-Sufre inhibición inducida por anticuerpos -Frecuentemente causa impedimento estérico ( $\approx 300\text{kDa}$ )
Fosfatasa alcalina	-Estable cuando se almacena y manipula adecuadamente. -Puede almacenarse a $+4^{\circ}\text{C}$ durante más de 6 meses. -Más estable que la peroxidasa. -Pequeño tamaño ( $\approx 86\text{kDa}$ ) -Amplia variedad de sustratos comerciales disponibles.	-Se inactiva por agentes quelantes, la acidez y los fosfatos orgánicos, -Necesita tampones específicos -Puede causar impedimento estérico. -Mas cara que la peroxidasa.
Peroxidasa	-Estable cuando se almacena y manipula adecuadamente. -Puede almacenarse a $+4^{\circ}\text{C}$ durante más de 6 meses. -Bastante barata - Pequeño tamaño ( $\approx 40\text{kDa}$ ) -No causa impedimento estérico. -Amplia variedad de sustratos comerciales disponibles.	-Incompatible con bastantes estabilizantes (azida de sodio, etc.) -La peroxidasa endógena y algunos metales interfieren en su actividad.



## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La periodontitis es una enfermedad con alta prevalencia en la población mundial; en Norte América y Europa este padecimiento ha sido ampliamente estudiado, sin embargo, en Centro y Sudamérica únicamente se han llevado a cabo investigaciones microbiológicas de dicha enfermedad en países como República Dominicana, Brasil, Chile y Argentina. En México, el realizar estos estudios se dificulta debido al alto costo de las técnicas actuales para la detección de los patógenos orales que provocan la periodontitis. Por esta razón, el principal objetivo de este trabajo es desarrollar una técnica de ELISA polimixina para la detección de LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en muestras orales humanas. Debido a que la polimixina tiene una elevada afinidad por los LPS, se tendría un método accesible y eficaz, que sería de gran utilidad para realizar un estudio microbiológico sobre la enfermedad periodontal en nuestro país.

## OBJETIVO

Desarrollar un método estandarizado de ELISA polimixina para la detección de LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* de muestras orales humanas.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtención y purificación del LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, así como cuantificar la concentración de carbohidratos de éste.
- Obtención del antígeno "O" de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.
- Elaboración del conjugado específico para LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, así como la cuantificación del título a utilizar en la ELISA polimixina.
- Detectar la presencia de LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en muestras orales humanas por el método de ELISA polimixina.

## HIPÓTESIS

La mayoría de los pacientes con enfermedad periodontal presentan elevados títulos de anticuerpos contra *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, algo que no sucede en personas sanas. Estos anticuerpos son producidos en respuesta al LPS de la bacteria. Si la polimixina presenta una alta afinidad por los LPS, se podrá desarrollar un método estandarizado de una ELISA polimixina que hará posible la fácil detección de LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en muestras periodontales humanas.

## DISEÑO METODOLÓGICO

### POBLACIÓN DE ESTUDIO

Muestras periodontales de mínimo 30 personas, obtenidas de pacientes que acudan a la Clínica de Especialidades de Endoperio, FES Iztacala, UNAM.

### CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Muestras periodontales obtenidas de pacientes con una edad de 20 a 75 años, diagnosticados con enfermedad periodontal, con un CPI (Índice Periodontal Comunitario) de 3 o 4, y sin tratamiento antibiótico un mes anterior a la toma de muestra.

### CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Muestras periodontales de pacientes con una edad de 0 a 19 años, mayores de 75 años, que no padezcan enfermedad periodontal, que presenten un CPI menor a 3, y/o que hayan recibido tratamiento antibiótico un mes anterior a la toma de muestra.

### TIPO DE ESTUDIO

- Observacional
- Prospectivo
- Transversal
- Descriptivo

## VARIABLES

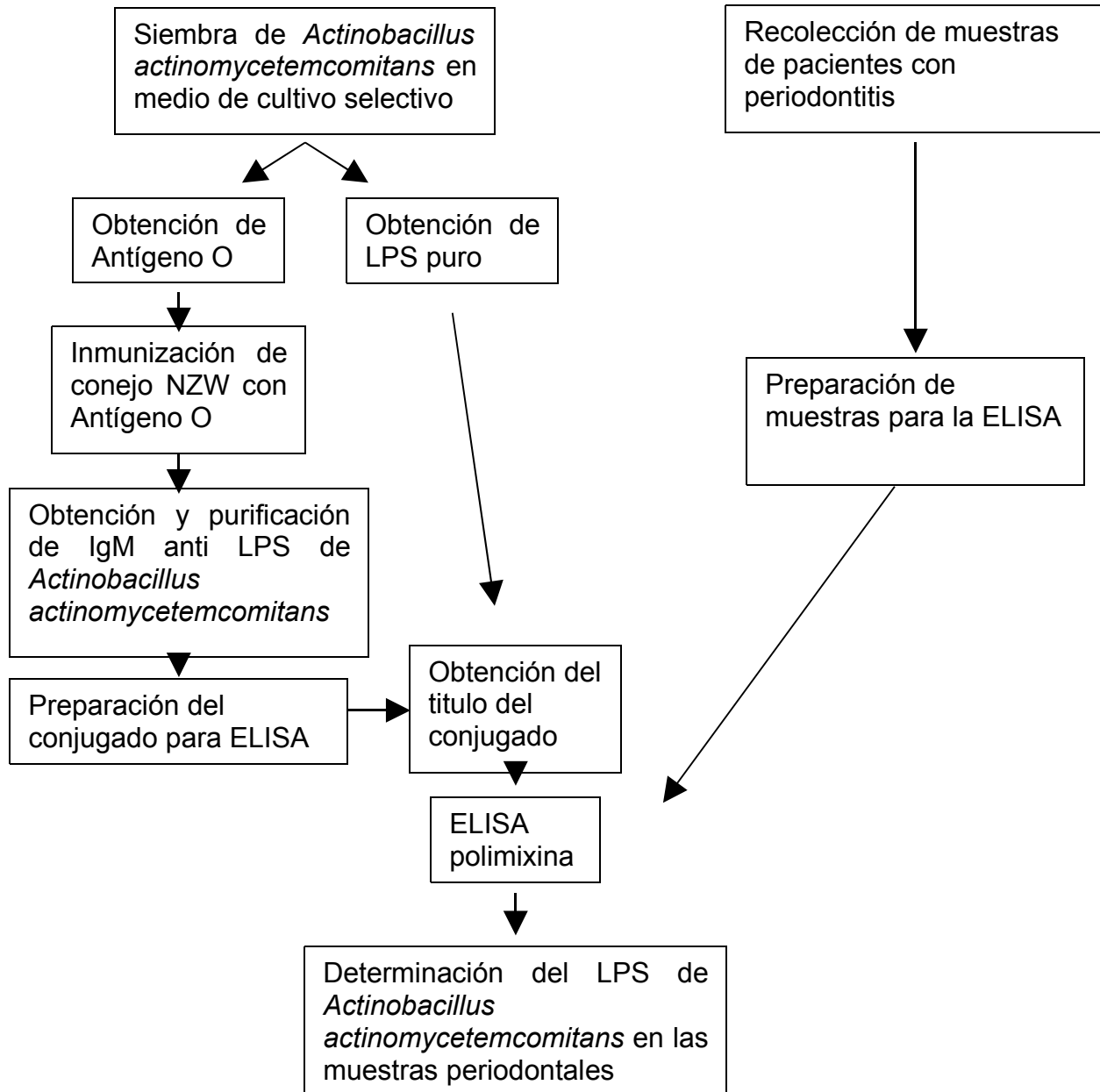
Variable dependiente:

- Presencia de LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en muestras periodontales

Variables independientes:

- Edad y sexo de los pacientes donantes de muestra periodontal.
- Clínica de procedencia de las muestras periodontales.

### DIAGRAMA DE FLUJO



## MATERIALES, EQUIPO Y REACTIVOS

### MATERIAL BIOLÓGICO

- Cepa ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo, por sus siglas en Inglés) 43718 de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*
- Conejo Nueva Zelanda Blanco (NZW)
- Sangre de carnero desfibrinada
- Muestras periodontales

### MATERIAL

- Probeta 100 mL y 1000 mL, Pyrex
- Jeringas desechables de plástico 1mL, BD
- Jeringas desechables de plástico 5 mL y 20 mL, BD
- Pipeta semiautomática 5-40 $\mu$ L, Finnpipette
- Pipeta semiautomática 40-200 $\mu$ L, Labssystem
- Pipeta semiautomática 100-1000 $\mu$ L, Proline
- Cajas Petri de plástico estériles desechables 100X15 mm, SyM Laboratorios
- Tubos para centrifuga Nalgene 50 mL, Nalge Company
- Vaso de precipitado 250 mL, Pyrex
- Asa bacteriológica
- Matraz Erlen Meyer 1000 mL y 2000 mL, Pyrex
- Tripie metálico
- Malla metálica
- Tubos de ensaye 13X100, Pyrex
- Tubos de ensaye 18X150, Pyrex
- Gradilla metálica
- Placas de poliestireno para ELISA, Costar

- Parafilm "M" 4inX125ft, American National Can
- Desecador de vidrio, Vakuumfest
- Puntas estériles de papel filtro
- Termómetro - 10 a 150° C
- Portaobjetos, Corning
- Velas
- Mechero Fisher y manguera para gas 1.5 m
- Algodón
- Gasas
- Papel estraza
- Tabletas efervescentes
- Membrana de celulosa de 21 X 33mm 12000 Daltons, Sigma
- Columna de vidrio 1 X 50 cm
- Soporte universal
- Pinza de tres dedos con nuez
- Pizeta de plástico de 500 mL
- Película autoadherente, Kleen Pack
- Filtro estéril 0.22 µm, Millipore
- Cronometro

#### EQUIPO

- Balanza granataria, Ohaus
- Balanza analítica, Ohaus
- Incubadora, Shel Lab
- Olla de presión 21 Lt, Presto
- Lámpara UV, UVP, Inc.
- Refrigerador, Whirpool
- Vortex, Scientific Industries Inc.



- Centrifuga, Damon IEC Division
- Espectrofotómetro UV/Visible, Jenway 6305
- Lector de ELISA, Awareness Technology Inc.
- Microscopio, ZEISS

## REACTIVOS

- Sulfato de Polimixina, Laboratorios Sophia S.A. de C.V.
- Agar soya tripticaseína, Bioxon
- Extracto de levadura, Bioxon
- Agar-Agar, Dibico
- Formiato de sodio
- Ácido sulfúrico, J.T. Baker
- Hemina
- Menadiona
- Agua destilada
- Clorato de sodio
- Cloruro de sodio, Hycel de México S.A. de C.V.
- Fosfato de potasio monobásico, Técnica Química S.A.
- Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado, J.T. Baker
- Cloruro de potasio, Técnica Química S.A.
- Safranina, Sigma de México, S.A. de C.V.
- Cristal violeta, Sigma Chemical Co.
- Lugol, Hycel de México, S.A. de C.V.
- Alcohol etílico, J.T Baker, S.A. de C.V.
- Acetona, J.T. Baker
- Ortofenilendiamina, Sigma de México, S.A. de C.V.
- Tween 20
- Dextrosa anhidra, Hycel de México, S.A. de C.V.

- Timerosal, Sigma de México
- Glutaraldehído, Sigma Chemical Co.
- Carbonato de sodio, J.T Baker, S.A. de C.V.
- Bicarbonato de sodio, J.T Baker, S.A. de C.V.
- L-lisina, Sigma Chemical Co.
- Sephadex G200
- Peroxidasa de rábano, Sigma Chemical Co.
- Solución acuosa de cloruro de sodio (NaCl) al 85%. Hycel de México.
- Acido cítrico, Hycel de México, S.A. de C.V.
- Azul brillante, Sigma Chemical Co
- Dextran azul, Sigma Chemical Co.
- Fenol, J.T Baker, S.A. de C.V.
- Formaldehído, J.T Baker, S.A. de C.V.
- Glicerol, Sigma Chemical Co.
- Éter, J.T Baker, S.A. de C.V.

## MÉTODO

### Preparación del medio de cultivo

1. Fórmula del medio de cultivo utilizado:

1.1. Agar-Agar, Dibico	5.0 g
1.2. Agar soya tripticaseína, Bioxon	40.0 g
1.3. Extracto de levadura, Bioxon	5.0 g
1.4. Formiato de sodio	1.0 g
1.5. Hemina	5.0 mL
1.6. Menadiona	1.0 mL
1.7. Suero de carnero	60 mL
1.8. Agua destilada	1000 mL

2. Preparación de 500 mL de medio de cultivo:

- 2.1. Se pesaron 20 g de agar soya tripticaseína, 2.5 g extracto de levadura y 2.5 g Agar Agar
- 2.2. Se disolvieron en 500 mL de agua destilada, y se añadieron 2.5 mL de la solución madre de hemina
- 2.3. Se esterilizó a 121° C / 15 lb/ in<sup>2</sup> por 15 minutos en la olla de presión.
- 2.4. Se preparó el área de siembra con dos mecheros Fisher, y se sanitizó con una solución de hipoclorito de sodio al 3% la mesa de trabajo.
- 2.5. Se dejó enfriar a aproximadamente 50° C el medio de cultivo y se añadió en condiciones estériles 30 mL de suero de carnero estéril
  - 2.5.1. Para obtener el suero, con anterioridad se dejó que la sangre desfibrinada de carnero se separará por sedimentación.
- 2.6. Se agregó a través de un filtro estéril 0.5 mL de la solución de menadiona al medio,
- 2.7. Se mezcló y se dispensaron 30 mL del medio en cajas Petri estériles de plástico
- 2.8. Se cerraron las cajas y se esperó a que solidificaran.
- 2.9. Se esperó dos días para observar si existía alguna contaminación en el medio de cultivo.

### **Siembra de la cepa ATCC 43718 de *A actinomycetemcomitans***

1. Ya que se verificó que no existía contaminación alguna se procedió a la siembra de la bacteria:
  - 1.1. Se preparó el área de siembra con dos mecheros Fisher, y se sanitizó con hipoclorito de sodio al 3% la mesa de trabajo.
  - 1.2. Se sembró masivamente la cepa ATCC 43718 de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en cada una de las cajas con el medio selectivo.
  - 1.3. Se colocaron las cajas sembradas en un desecador de vidrio y se incubaron a 37° C por 5 días, en condiciones de anaerobiosis
    - 1.3.1. La anaerobiosis fue generada con 4 tabletas efervescentes y una vela, en un desecador de vidrio.
2. Transcurridos los 5 días se sacaron las cajas del desecador y se les realizó un frotis al crecimiento obtenido en cada una de las cajas.
  - 2.1. Cada frotis fue teñido con la técnica de Gram.
  - 2.2. Se inspeccionó que únicamente hubiera bacilos cortos Gram negativos en los frotis realizados para asegurar que no existiera contaminación.

### **Preparación del Antígeno O**

1. Se tomó con una jeringa estéril 2 mL de solución salina fisiológica (SSF) y se vertió sobre una caja de las cajas de Petri anteriormente inoculadas.
2. Se resuspendió el crecimiento bacteriano ayudándonos de un asa previamente incinerada.
3. Una vez que se hubo resuspendido la mayor parte del crecimiento se recolectó nuevamente en la jeringa antes utilizada.
4. En un tubo de ensaye de 18X150, con 2 mL de SSF, se agregó gota a gota la suspensión bacteriana contenida en la jeringa, hasta igualar al tubo 1 del nefelómetro de McFarland.
5. Dicha suspensión se colocó en baño maría, a temperatura de ebullición, durante 120 minutos, agregando agua destilada para evitar desecación.
6. Transcurrido el tiempo, se retiró del baño maría y se dejó enfriar.

7. La suspensión se guardó en refrigeración hasta ser utilizada para la inmunización.

### **Preparación del LPS para la prueba de aglutinación**

1. Se tomó con una jeringa estéril 2 mL de solución salina fisiológica (SSF) y se vertió sobre una caja de las cajas de Petri anteriormente inoculadas.
2. Se resuspendió el crecimiento bacteriano ayudándonos de un asa previamente incinerada.
3. Una vez que se hubo resuspendido la mayor parte del crecimiento, se recolectó nuevamente en la jeringa antes utilizada.
4. En un tubo de ensayo de 18X150, con 2 mL de SSF, se agregó gota a gota la suspensión bacteriana contenida en la jeringa, hasta igualar al tubo 3 del nefelómetro de McFarland.
5. Dicha suspensión se colocó en baño maría, a temperatura de ebullición, durante 120 minutos, agregando agua destilada para evitar desecación.
6. Transcurrido el tiempo, se retiró del baño maría y se dejó enfriar.
7. Posteriormente se le agregó formaldehído hasta una concentración de 0.3%.
8. Mezclar y agregar cuidadosamente una pizca de colorante de azul brillante.
9. La suspensión se guardó en refrigeración hasta ser utilizada para la prueba de aglutinación.

### **Inmunización y obtención del Suero**

1. Con el Antígeno O obtenido anteriormente se procedió a la inmunización de un conejo raza Nueva Zelanda Blanco (NZW) adulto (aprox. 2,8 Kg), por vía intravenosa; siguiendo el siguiente esquema:

Día	Volumen (mL)
0	0.25
3	0.25
7	0.3
10	0.3
16	Sangrar

2. Para obtener la sangre de conejo el día 16, se procedió a realizar una punción cardiaca.
  - 2.1. Se anestesió al conejo con un paño humedecido con éter.
  - 2.2. Se limpio con yodo la zona a puncionar.
  - 2.3. Se puncionó utilizando una jeringa de 20 mL, hasta obtener toda la sangre posible.
3. Se recolecto toda la sangre obtenida en un vaso de precipitado de 250 mL y se dejó reposar hasta su completa coagulación.
4. Una vez coagulada, se fraccionó el suero en diferentes tubos de ensaye y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min. para separar completamente el suero de cualquier residuo de glóbulos rojos.
5. El suero obtenido se guardó en refrigeración.

### **Purificación de la IgM anti *A actinomycescomitans***

1. Se pesaron 17 g de peso seco de SEPHADEX G-200 y se disolvieron en un litro de agua destilada.
2. Dicha suspensión se mantuvo en ebullición durante 5 horas
3. Se dejó enfriar el gel a temperatura ambiente.
4. Se colocó la columna de 1 cm de diámetro por 50 cm de altura en posición vertical sobre un soporte universal, sujeta con dos pinzas de tres dedos con nuez

5. Se agregó amortiguador de fosfatos (PBS) hasta la mitad de la columna y después se adicionó con agitación el SEPHADEX hasta llenarla.
6. Se abrió la válvula y poco a poco se fue dejando ir el PBS y simultáneamente agregando más SEPHADEX hasta tener llena la columna con éste.
7. Se calculó el volumen vacío utilizando dextran azul disuelto en 1 mL de agua destilada.
  - 7.1. Se agregó el colorante por arriba de la columna y se esperó hasta la obtención del colorante en la parte de abajo, el volumen recolectado durante ese tiempo (14 mL) fue el volumen vacío.
8. Posteriormente se dejó pasar el suero de conejo obtenido anteriormente
  - 8.1. La columna nunca se dejó secar, por lo que constantemente se fue eluyendo con PBS.
9. Después de que saliera el volumen correspondiente al volumen vacío se fueron tomando fracciones de 3 mL, hasta recolectar un total de 12 fracciones.
10. Dichas fracciones se utilizaron para realizar pruebas de aglutinación y así saber cual era la que contenía la mayor cantidad de IgM contra LPS de *Actinomyces comitans*.

### **Preparación del conjugado**

1. Se disolvieron 10 mg de peroxidasa de rábano en 200  $\mu$ L de buffer de fosfatos 0.1 M, pH 6.8, que contenía 1.25% de glutaraldehído
2. Se dejó reposar durante 18 hrs a temperatura ambiente.
3. Se eliminó el glutaraldehído dializando con una membrana G12000, en una solución de PBS.
4. Se concentró a 1 mL y se le adicionaron 2 mL de la fracción que mostró más afinidad hacia el LPS en la prueba de aglutinación y 0.1 mL de buffer de bicarbonato de sodio 1 M, pH 9.5
5. Se agitó suavemente y se dejó reposar 24 horas a 4° C
6. Posteriormente se adicionaron 0.1 mL de lisina a 0.2 M.

7. Se dejó 2 horas a temperatura ambiente y se dializó contra PBS a 4° C por 2 días, utilizando una membrana G12 000
8. El conjugado se separó de la peroxidasa libre por diálisis contra agua destilada durante 24 horas.
9. Posteriormente se extrajo de la membrana de diálisis la solución que contenía el conjugado, se vertió dentro de un tubo limpio y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min.
10. Se decantó el sobrenadante y el precipitado se redisolvió en PBS con 0.01% de timerozal o formalina.
11. Guardar en refrigeración.

### **Obtención del LPS puro**

1. A cada una de las cuatro cajas de Petri restantes, con el crecimiento de *Actinomyces comitans*, se le agregaron 5 mL de SSF, con una jeringa estéril, y se resuspendió la masa bacteriana con ayuda de un asa bacteriológica.
2. Se reunieron las suspensiones bacterianas con ayuda de la misma jeringa que se utilizó anteriormente y se colocaron todas las suspensiones en una botella para centrifuga de 250 mL, marca Nalgene.
3. Se volvió a adicionar 5 mL de SSF a cada caja, para recolectar posibles residuos de masa bacteriana y se colocaron las suspensiones nuevamente en la botella para centrifuga.
4. Se realizó el paso 3 nuevamente.
5. Posteriormente se centrifugó la botella con la suspensión bacteriana a 6000 rpm durante 60 min.
6. Transcurrido este tiempo se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón de bacterias en más SSF (aprox. 30 mL)
7. Nuevamente se centrifugó a 6000 rpm durante una hora.
8. Se desechó el sobrenadante y el botón de biomasa se resuspendió en 5 mL de SSF contenidos en un tubo de ensayo de 18X150
9. Posteriormente se le agregaron 3 mL de una mezcla fenol – agua en una proporción de 9:1, respectivamente.



10. Se agitó el tubo perfectamente, y se dejó en refrigeración durante 24 hrs.
11. Transcurrido ese tiempo se retiró el tubo de refrigeración, se agitó y se introdujo en un baño de agua a 70° C durante 90 minutos.
12. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 3000 rpm durante 30 minutos.
13. Se separó la fase acuosa (superior) y se guardó en un tubo de ensaye 18X150 en refrigeración.
14. Se reextrajo la interfase y la fase fenólica con 3 mL de SSF y se dejó en un baño de agua a 70° C durante 60 minutos.
15. Trascurrido ese tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 3000 rpm durante 30 minutos.
16. Se volvió a separar la fase acuosa (superior) y se colocó en el tubo con el extracto acuoso anterior.
17. Se reextrajo nuevamente la interfase y la fase fenólica con 3 mL de SSF y se dejó en un baño de agua a 70° C durante 30 minutos.
18. Trascurrido ese tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 3000 rpm durante 30 minutos.
19. Se volvió a separar la fase acuosa (superior) y se colocó en el tubo con los extractos acuosos anteriores.
20. Los extractos acuosos se dializaron contra PBS, con una membrana de 12,000 Da de exclusión, durante 3 días, para eliminar posibles residuos de fenol.
  - 20.1 La solución de PBS se cambió cada 24 horas.
21. Después de dicho tiempo se recolectó el dializado en un tubo de 18X150 perfectamente identificado y el LPS puro se guardó en refrigeración.

**Determinación de la concentración de carbohidratos del LPS, por el método de fenol-ácido sulfúrico.**

1. Se realizó una curva estándar de glucosa de la siguiente manera:
  - 1.1. Se prepararon diez tubos de vidrio de 18X100 y rotularlos del 1 al 10
  - 1.2. Se preparó la solución estándar de dextrosa a una concentración de 0.1 mg/mL

- 1.3. Se preparó una solución de fenol al 80%
- 1.4. En la campana de extracción y utilizando lentes de seguridad, se llenaron los tubos como se muestra en la siguiente tabla, teniendo extremo cuidado al agregar el ácido sulfúrico ya que se produce una reacción altamente exotérmica.

	TUBOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sol'n dextrosa	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
Agua destilada	1.9	1.8	1.7	1.6	1.5	1.4	1.3	1.2	1.1	1.0
Fenol 80%	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc.	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

Nota: Todas las cantidades están en mililitros.

- 1.5. Se dejaron reposar todos los tubos de 20-30 minutos.
- 1.6. Se leyó en el espectrofotómetro a una absorbancia de 490 nm.
- 1.7. Se graficaron las absorbancias para obtener la curva estándar de glucosa.
2. La determinación de la concentración de carbohidratos en el LPS obtenido se realizó de la siguiente forma:
  - 2.1. Del LPS se realizaron diluciones de 1:10, 1:50 y 1:100, de la siguiente manera:

			Dilución final
Tubo 1	0.5 mL LPS +	4.5 mL agua	1:10
Tubo 2	1 mL tubo 1 +	4 mL agua	1:50
Tubo 3	2 mL tubo 2 +	2 mL agua	1:100

- 2.2. Se tomaron dos mililitros de cada dilución y se colocarlos (por separado) en tubos de vidrio de 18X100.
- 2.3. En la campana de extracción y utilizando lentes de seguridad se agregó a cada tubo 0.1mL de fenol al 80%.
- 2.4. Posteriormente se agregó a cada tubo 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, con extremo cuidado
- 2.5. Se dejaron reposar todos los tubos de 20-30 minutos.
- 2.6. Se leyó en el espectrofotómetro a una absorbancia de 490 nm.

2.7. Con las absorbancias obtenidas se interpoló en la gráfica estándar para obtener la concentración de las diferentes diluciones de LPS.

2.7.1. Para obtener la concentración real del LPS se multiplicó por el respectivo factor de dilución.

### **Titulación del conjugado por el método de tablero de ajedrez**

1. Se irradió durante una hora con luz UV una placa de poliestireno para ELISA marca Costar.
2. En cada pocillo se colocaron 100  $\mu$ L de una solución de sulfato de polimixina B (a una concentración de 50  $\mu$ g/mL)
3. Se cubrió la placa con una película autoadherente para evitar evaporación y se incubó durante 1 hora a 37° C.
4. Transcurrido dicho tiempo se sacó la placa de la incubadora y en un solo movimiento se tiro el contenido de la placa en la tarja.
5. Después se lavó la placa con PBS tween, utilizando una pizeta.
  - 5.1. Con la pizeta se va colocando el PBS en cada pocillo de tal forma que la solución inunde toda la placa.
  - 5.2. Posteriormente se tira el PBS tween en un solo movimiento a la tarja.
6. Se realizó el lavado tres veces más, como se describió anteriormente.
  - 6.1. Después del último lavado se dejo escurrir la placa encima de papel absorbente para eliminar en lo posible residuos del PBS tween.
7. Una vez hecho los lavados se colocaron 200  $\mu$ L de la solución bloqueadora en cada pocillo.
8. Se cubrió la placa con una película autoadherente para evitar evaporación y se incubó durante 30 min. a 37° C.
9. Transcurrido dicho tiempo se sacó la placa de la incubadora y en un solo movimiento se tiro el contenido de la placa en la tarja.
10. Se procedió a realizar cuatro lavados en la placa, como se explicó en el punto 5.
11. Con anterioridad se realizaron diluciones del LPS de la siguiente forma:

Tubo				Dilución final
<b>1</b>	500 µL LPS	+	3.5 mL PBS	1:8
<b>2</b>	1.5 mL tubo 1	+	1.5mL PBS	1:16
<b>3</b>	1.5 mL tubo 2	+	1.5mL PBS	1:32
<b>4</b>	1.5 mL tubo 3	+	1.5mL PBS	1:64
<b>5</b>	1.5 mL tubo 4	+	1.5mL PBS	1:128
<b>6</b>	1.5 mL tubo 5	+	1.5mL PBS	1:256
<b>7</b>	1.5 mL tubo 6	+	1.5mL PBS	1:512

12. Con la solución resultante de cada tubo, se procedió a llenar cada fila de la placa de ELISA, es decir, con el tubo 1 se llenaron los pocillos de la fila A, con el tubo 2 los pocillos de la fila B, con el tubo 3 los pocillos de la fila C, y así sucesivamente.

12.1. En cada pocillo se colocaron 100 µL de solución correspondiente.

13. En la fila H no se colocó ninguna solución.

14. Una vez que se terminó de llenar la placa se cubrió con una película autoadherente para evitar evaporación y se incubó durante 30 min. a 37° C.

15. Transcurrido dicho tiempo se sacó la placa de la incubadora y en un solo movimiento se tiro el contenido de la placa en la tarja.

16. Se procedió a realizar cuatro lavados en la placa, como se explicó en el punto 5.

17. Con anterioridad se realizaron diluciones del Conjugado de la siguiente forma:

Tubo				Dilución final
<b>1</b>	100 µL Conjugado	+	9.9 mL PBS	1:100
<b>2</b>	1.5 mL tubo 1	+	1.5mL PBS	1:200
<b>3</b>	1.5 mL tubo 2	+	1.5mL PBS	1:400
<b>4</b>	1.5 mL tubo 3	+	1.5mL PBS	1:800
<b>5</b>	1.5 mL tubo 4	+	1.5mL PBS	1:1600
<b>6</b>	1.5 mL tubo 5	+	1.5mL PBS	1:3200
<b>7</b>	1.5 mL tubo 6	+	1.5mL PBS	1:6400
<b>8</b>	1.5 mL tubo 7	+	1.5mL PBS	1:12800
<b>9</b>	1.5 mL tubo 8	+	1.5mL PBS	1:25600
<b>10</b>	1.5 mL tubo 9	+	1.5mL PBS	1:51200
<b>11</b>	1.5 mL tubo 10	+	1.5mL PBS	1:102400

18. Con la solución resultante de cada tubo se procedió a llenar la columna correspondiente de la placa de ELISA, es decir, con el tubo 1 se llenaron los

pocillos de la columna 1, con el tubo 2 los pocillos de la columna 2, con el tubo 3 los pocillos de la columna 3, y así sucesivamente.

18.1. En cada pocillo se colocaron 100  $\mu$ L de solución correspondiente.

19. En la columna 12 no se colocó ninguna solución.

20. Una vez que se terminó de llenar la placa se cubrió con una película autoadherente para evitar evaporación y se incubó durante 30 min. a 37° C.

21. Transcurrido dicho tiempo se sacó la placa de la incubadora y en un solo movimiento se tiro el contenido de la placa en la tarja.

22. Se procedió a realizar cuatro lavados en la placa, como se explicó en el punto 5.

23. Posteriormente colocar en cada pocillo 100  $\mu$ L de la solución “sustrato-cromógeno”.

23.1. Dicha solución fue preparada inmediatamente antes de usarla, ya que se degrada rápidamente.

24. Una vez que se terminó de llenar la placa se cubrió con una película autoadherente para evitar evaporación y se incubó durante 20 min. a 37° C.

25. Transcurrido el tiempo se sacó la placa de la incubadora y se llevó al Lector de ELISA, Awareness Technology Inc. para realizar la lectura a 450 nm.

### **Toma de muestras periodontales**

1. Se recolectaron 50 muestras periodontales de pacientes que acudieron a la Clínica de Especialidades de Endoperio de la FES Iztacala, UNAM.

2. Dichos pacientes cumplieron con criterios de selección que se mencionan a continuación:

2.1. Edad de 20 a 75 años

2.2. Diagnosticados con Enfermedad periodontal

2.3. Que tuvieran un CPI (Índice Periodontal Comunitario) de 3 o 4

2.4. Sin tratamiento antibiótico un mes anterior a la toma de muestra.

3. La toma de muestra se realizó de la siguiente manera:

3.1. Se colocó una punta de papel filtro número 70 sobre la bolsa periodontal del paciente, y se mantuvo en ella por espacio de 10 a 15 segundos

- 3.1.1. Con anterioridad la punta fue sometida a rayos UV durante 30 min. para asegurar su esterilidad.
- 3.2. Se retiró la punta y se colocó en un tubo estéril de plástico etiquetado con el nombre del paciente, fecha de la toma y número asignado.
- 3.3. Se guardaron las muestras en refrigeración a 4° C, hasta su uso.
4. También se recolectaron 7 muestras de pacientes entre 20 a 75 años que no presentaban ninguna sintomatología de enfermedad periodontal.
  - 4.1. Las muestras fueron tomadas como se explicó en el punto 3.
5. Para la selección de los pacientes adecuados y la toma de muestras se contó con el apoyo de Dr. Eduardo Llamosas, Director de la Clínica y de su equipo.

#### **Determinación de la presencia de *A actinomycetemcomitans* en las muestras periodontales por el método de ELISA polimixina**

1. Se trataron las muestras periodontales anteriormente obtenidas de la siguiente forma:
  - 1.1. Cada punta de papel filtro se colocó en un tubo de ensayo de 13X100 y se le agregaron 450 µL de PBS y 50 µL de colato de sodio al 5%
  - 1.2. Se calentaron por 10 minutos a temperatura de ebullición.
  - 1.3. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se retiró el papel filtro de cada tubo y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min.
  - 1.4. Se separó el sobrenadante y se reservó en refrigeración hasta su uso.
2. Se irradió durante una hora con luz UV una placa de poliestireno para ELISA marca Costar.
3. En cada pocillo se colocaron 100 µL de una solución de sulfato de polimixina B (a una concentración de 50 µg/mL)
4. Se cubrió la placa con una película autoadherente para evitar evaporación y se incubó durante 1 hora a 37° C.
5. Transcurrido dicho tiempo se sacó la placa de la incubadora y en un solo movimiento se tiró el contenido de la placa en la tarja.
6. Después se lavó la placa con PBS tween, utilizando una pizeta.
  - 6.1. Con la pizeta se va colocando el PBS en cada pocillo de tal forma que la solución inunde toda la placa.

- 6.2. Posteriormente se tira el PBS tween en un solo movimiento a la tarja.
7. Se realizó el lavado otras tres veces, como se describió anteriormente.
- 7.1. Después del último lavado se dejó escurrir la placa encima de papel absorbente para eliminar en lo posible residuos del PBS tween.
8. Una vez hecho los lavados se colocaron 200  $\mu$ L de la solución bloqueadora en cada pocillo.
9. Se cubrió la placa con una película autoadherente para evitar evaporación y se incubó durante 30 min. a 37° C.
10. Transcurrido dicho tiempo se sacó la placa de la incubadora y en un solo movimiento se tiro el contenido de la placa en la tarja.
11. Se procedió a realizar cuatro lavados en la placa, como se explicó en el punto 5.
12. Posteriormente se colocaron 100  $\mu$ L del LPS en una dilución 1:16 en cada uno de los pocillos de la fila A, como controles positivos.
13. Se colocaron 100  $\mu$ L de cada una de las muestras periodontales anteriormente tratadas de la siguiente forma:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS
B	1	2	2'	3	4	5	6	7	8	9	10	PBS
C	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	PBS
D	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	PBS
E	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	PBS
F	44	45	46	47	48	49	50	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
G	A	B	C	D	E	F	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

14. En los espacios restantes se colocaron 100  $\mu$ L de PBS como control negativo.
15. Una vez que se terminó de llenar la placa se cubrió con una película autoadherente para evitar evaporación y se incubó durante 30 min. a 37° C.
16. Transcurrido dicho tiempo se sacó la placa de la incubadora y en un solo movimiento se tiro el contenido de la placa en la tarja.
17. Se procedió a realizar cuatro lavados en la placa, como se explicó en el punto 5.
18. En cada pocillo se colocaron 100  $\mu$ L del Conjugado a una dilución 1:400.

19. Una vez que se terminó de llenar la placa se cubrió con una película autoadherente para evitar evaporación y se incubó durante 30 min. a 37° C.
20. Transcurrido dicho tiempo se sacó la placa de la incubadora y en un solo movimiento se tiro el contenido de la placa en la tarja.
21. Se procedió a realizar cuatro lavados en la placa, como se explicó en el punto 5.
22. Posteriormente colocar en cada pocillo 100  $\mu$ L de la solución “sustrato-cromógeno”.
  - 22.1. Dicha solución fue preparada inmediatamente antes de usarla, ya que se degrada rápidamente.
23. Una vez que se terminó de llenar la placa se cubrió con una película autoadherente para evitar evaporación y se incubó durante 20 min. a 37° C.
24. Transcurrido el tiempo se saco la placa de la incubadora y se llevo al Lector de ELISA, Awareness Technology Inc. para realizar la lectura a 450 nm.



## RESULTADOS

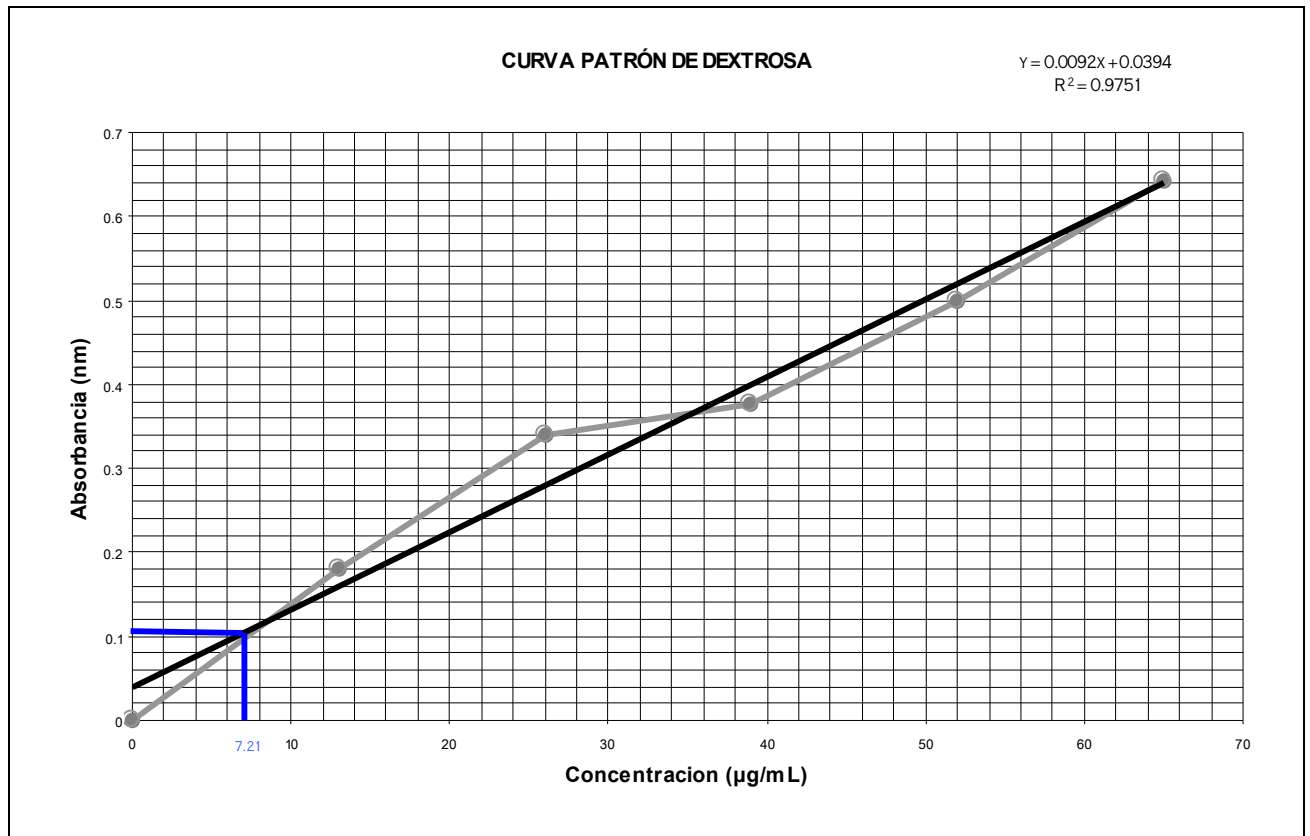
- De la siembra de la cepa ATCC 43718 de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* se obtuvo una biomasa de la cual se extrajo el LPS utilizando el método de Galanos-Westphal.
- A este LPS se le determinó la concentración de carbohidratos, utilizando el método de fenol-ácido sulfúrico (Cuadro 3, Gráfica 1). La absorbancia de LPS de *A actinomycetemcomitans* a una dilución 1:10 fue de **0.106** nm, calculando con regresión lineal corresponde a un valor de 7.2101 µg/mL. Al multiplicar por el factor de dilución, que es de 10, resulta **72.101 µg/mL**
- Partiendo de la biomasa de *A actinomycetemcomitans* se obtuvo el antígeno O, con el cual se inmunizó a un conejo Blanco Nueva Zelanda para obtener el suero y de ahí purificar la IgM anti LPS de *A actinomycetemcomitans*.
- Con las fracciones del suero ya purificado en al columna de sephadex se realizaron reacciones de aglutinación con el LPS. En el cuadro 4 se muestran los resultados.
- Para elaborar el conjugado se escogió la fracción con mayor cantidad de IgM, hallada por una mayor aglutinación, en este caso en la fracción 1.
- Se realizó la titulación del conjugado por el método de tablero de ajedrez (Cuadro 5, Gráfica 2), obteniéndose que el conjugado debe utilizarse a una dilución de 1:400.
- En la misma gráfica (Gráfica 2) se observa que las diluciones en las que el LPS alcanza su reacción más alta son de 1:16 y 1:32, que equivalen a una concentración de 2.2531 µg/mL a 4.5063 µg/mL de carbohidrato.
- Con las muestras orales obtenidas se realizó la ELISA ligada a polimixina para detectar LPS de *A actinomycetemcomitans*.
- En el cuadro 6 se muestra la disposición de las muestras en la placa de ELISA. En el cuadro 7 las absorbancias obtenidas. En el cuadro 8 el cálculo de los valores de corte (cut-off) para determinar que muestras son positivas.

- En el cuadro 9 se muestran en rojo las muestras que dieron positivo para presencia de LPS de *A actinomycetemcomitans*.

Cuadro 3: Curva patrón de concentración de dextrosa:

TUBOS	Solución estándar* (mL)	Concentración estándar (µg/mL)	ABSORBANCIA
Blanco	0	0	0
1	0.1	13	0.181
2	0.2	26	0.3385
3	0.3	39	0.3765
4	0.4	52	0.4995
5	0.5	65	0.6415

\*Concentración de la solución estándar de dextrosa: 130 µg/mL



Gráfica 1: Se observa la curva patrón de dextrosa (gris) y la línea de regresión lineal (negro) con la cual se interpola la absorbancia del LPS con dilución 1:10, a una absorbancia de 490 nm.

Cuadro 4. Resultados de la reacción de aglutinación del LPS de *A. actinomycetemcomitans* frente a las fracciones del anticuerpo purificado.

Vol. LPS	Fracción 1	Fracción 2	Fracción 3	Fracción 4	Fracción 5
80 µL	<b>++++</b>	+++	+++	+	-----
40 µL	<b>++++</b>	+++	+++	-----	-----
20 µL	<b>++++</b>	+++	++	-----	-----
10 µL	<b>++++</b>	++	++	-----	-----
5 µL	<b>++++</b>	++	-----	-----	-----

En negritas se muestra la fracción con mayor respuesta de aglutinación frente a diversas diluciones.

Cuadro 5: Placa de ELISA para la titulación del conjugado

		Log (10) Dilución del conjugado											
		2	2.3010	2.6020	2.9030	3.2041	3.5051	3.8061	4.1072	4.4082	4.7092	5.0103	-
Factor dil. LPS		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
8	A	1.8540	1.3700	0.7210	0.3800	0.2170	0.1190	0.0540	0.0280	0.0190	-0.0030	0.0040	0.0240
16	B	1.9860	1.2670	0.6490	0.3820	0.1940	0.1060	0.0520	0.0310	0.0070	-0.0150	-0.0100	0.0130
32	C	2.0080	1.1820	0.6430	0.3710	0.1690	0.1010	0.0620	0.0160	0.0120	-0.0290	-0.0030	-0.0070
64	D	1.2200	0.7620	0.3190	0.1950	0.0740	0.0450	0.0050	-0.0080	0.0050	-0.0130	-0.0030	0.0840
128	E	0.3760	0.1800	0.0920	0.0530	0.0290	0.0290	0.0000	-0.0110	0.0110	0.0050	-0.0200	-0.0020
256	F	0.0720	0.0380	0.0040	0.0090	0.0020	0.0000	-0.0070	0.0080	0.0050	-0.0020	-0.0150	-0.0060
512	G	0.1120	0.0360	0.0040	0.0040	0.0320	0.0070	-0.0230	-0.0070	0.0020	0.0030	-0.0070	0.0760
-	H	0.0490	0.0230	-0.0010	-0.0020	0.0140	0.0090	-0.0060	-0.0050	0.0430	0.0130	0.0030	0.0090

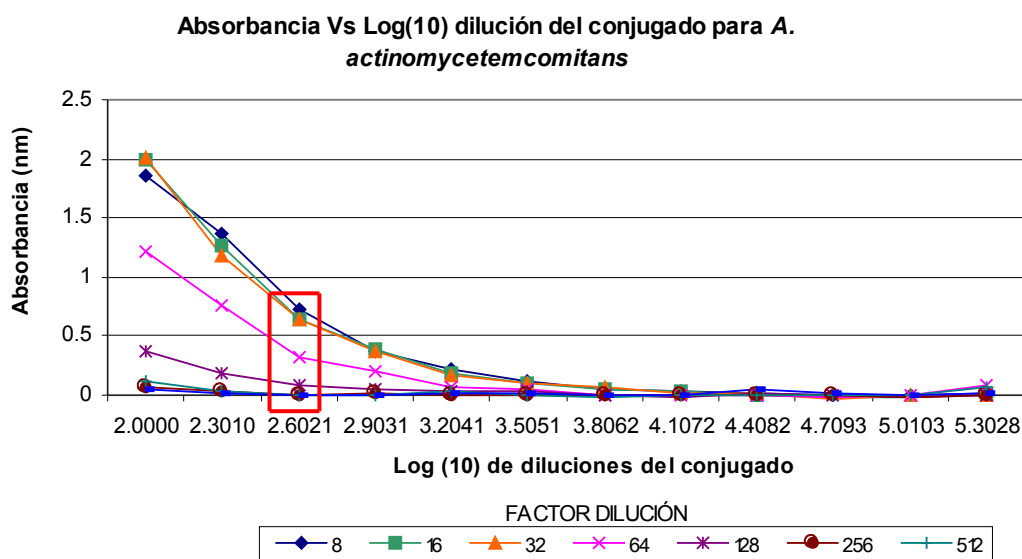
Puede observarse como va disminuyendo la dilución tanto del LPS como del conjugado, el primero en sentido vertical y el segundo en sentido horizontal de la placa.

Cuadro 6: Disposición de las muestras en la placa de ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS
B	1	2	2'	3	4	5	6	7	8	9	10	PBS
C	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	PBS
D	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	PBS
E	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	PBS
F	44	45	46	47	48	49	50	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
G	A	B	C	D	E	F	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

Cuadro 7: Absorbancias resultantes en la placa de ELISA polimixina.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.672	0.866	0.782	0.655	0.448	0.505	0.407	0.432	0.441	0.422	0.409	0.429
B	0.072	0.158	0.174	0.096	0.046	0.144	0.061	0.073	0.069	0.077	0.078	0.069
C	0.074	0.133	0.075	0.059	0.036	0.041	0.082	0.056	0.111	0.051	0.083	0.067
D	0.072	0.088	0.062	0.052	0.081	0.047	0.012	0.049	0.082	0.116	0.127	0.051
E	0.110	0.080	0.120	0.064	0.048	0.075	0.045	0.079	0.127	0.115	0.115	0.040
F	0.087	0.094	0.041	0.073	0.107	0.079	0.102	0.198	0.068	0.068	0.100	0.059
G	0.237	0.184	0.202	0.122	0.107	0.126	0.067	0.103	0.101	0.098	0.086	0.113
H	0.145	0.204	0.109	0.102	0.124	0.106	0.088	0.120	0.140	0.116	0.204	0.156



Gráfica 2: Comportamiento de diferentes diluciones de LPS de *A. actinomycetemcomitans* interactuando con diferentes concentraciones del conjugado. En el cuadro se muestra la concentración del conjugado en la que la mayoría de las diluciones de LPS de *A. actinomycetemcomitans* tienen una reacción media.

Cuadro 8: Determinación de los valores de corte (cut-off) en la placa de ELISA

## Absorbancias de los controles negativos (pozos con PBS)

0.145	0.116	0.068
0.204	0.204	0.068
0.109	0.156	0.100
0.102	0.113	0.067
0.124	0.059	0.103
0.106	0.040	0.101
0.088	0.051	0.198
0.120	0.067	0.098
0.140	0.069	0.086

## Estadística descriptiva

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación Std.
Negativos	27	.0400	.2040	.107481	.0443893

CORTE: Media + 2 (desviación estándar)

CORTE:  $0.107481 + (2)(.0443893) = 0.19625$ 

Datos &gt;0.19625 (sombreado) se eliminan y se recalcula

## Estadística descriptiva

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación Std.
Negativos	24	.0400	.1560	.095667	.0302564

CORTE: Media + 2 (desviación estándar)

CORTE:  $0.095667 + (2)(0.0302564) = 0.15617$ **Valores >0.15617 son POSITIVOS**

Cuadro 9: Muestras positivas en la placa (encerradas en cuadro)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.672	0.866	0.782	0.655	0.448	0.505	0.407	0.432	0.441	0.422	0.409	0.429
B	0.072	0.158	0.174	0.096	0.046	0.144	0.061	0.073	0.069	0.077	0.078	0.069
C	0.074	0.133	0.075	0.059	0.036	0.041	0.082	0.056	0.111	0.051	0.083	0.067
D	0.072	0.088	0.062	0.052	0.081	0.047	0.012	0.049	0.082	0.116	0.127	0.051
E	0.110	0.080	0.120	0.064	0.048	0.075	0.045	0.079	0.127	0.115	0.115	0.040
F	0.087	0.094	0.041	0.073	0.107	0.079	0.102	0.198	0.068	0.068	0.100	0.059
G	0.237	0.184	0.202	0.122	0.107	0.126	0.067	0.103	0.101	0.098	0.086	0.113
H	0.145	0.204	0.109	0.102	0.124	0.106	0.088	0.120	0.140	0.116	0.204	0.156

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La técnica de ELISA es un procedimiento sensible y específico, ya que esta basado en reacciones antígeno-anticuerpo, y el que dicha reacción quede adherida a una superficie sólida de la que pueden eliminarse todos los analitos que no reaccionan por medio de lavados sucesivos permite que el tamaño de la muestra a analizar sea mínimo. Estas características hacen que sea uno de los métodos más utilizados, sin embargo continúa siendo un procedimiento costoso y poco accesible para el grueso de la población o para el sector educativo, utilizándose principalmente en el sector privado para la detección de enfermedades como hepatitis, VIH, etc. y teniendo un costo elevado.

El reciente descubrimiento de que la polimixina presentaba una alta afinidad por los LPS, ha permitido desarrollar una técnica de ELISA para la detección de bacterias Gram negativas, las cuales presentan esta sustancia en su membrana celular y representa uno de sus factores de virulencia, haciéndolas bacterias altamente resistentes y agresivas. Un ejemplo es *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, uno de los principales agentes causales de la periodontitis, enfermedad con un alto índice de morbilidad en el mundo.

Generalmente, para la detección de la bacteria, se han ideado diversos medios de cultivo para proporcionar una alta eficacia en su aislamiento y una mínima contaminación, pero al tratarse de una bacteria exigente la contaminación es común, y la recuperación no es segura.

Al utilizar polimixina B en la placa de ELISA se asegura la recuperación del LPS presente en la muestra, y al obtener un anticuerpo específico contra el LPS que deseamos identificar aseguramos la especificidad de la reacción. Además el LPS es altamente resistente a condiciones ambientales adversas, su naturaleza de carbohidrato permite que resista altas temperaturas, lo que hace que su recuperación no tenga que realizarse bajo condiciones especiales.

La utilización de una cepa ATCC es indispensable, ya que esto asegura la identidad de la bacteria, sin embargo su alto rendimiento contrarresta el costo que pueda tener.

Al realizar la determinación del título del conjugado específico de LPS de *Actinobacillus actinomyetemcomitans* obtenemos una gráfica en la que se observa como se comportan el LPS de *Actinobacillus actinomyetemcomitans* y el conjugado a diferentes concentraciones. Las absorbancias más altas se obtuvieron con diluciones del LPS de 1:32 y 1:16 que corresponden a una concentración de 2.2531 µg/mL a 4.5063 µg/mL, respectivamente, por lo tanto podemos decir que lo ideal es utilizar el LPS de *Actinobacillus actinomyetemcomitans* dentro de este rango.

En el caso del conjugado específico para LPS de *Actinobacillus actinomyetemcomitans* se eligió la dilución que da un término medio de reacción con las diferentes concentraciones de LPS, dicha dilución fue de 1:400, y al utilizarla podemos asegurar que dicho conjugado no únicamente reaccionará con concentraciones altas o bajas de LPS, sino que tendrá un mayor rango de reacción.

Al realizar la determinación de LPS en las 57 muestras periodontales con la técnica de ELISA polimixina se obtuvo que 4 fueron positivas para la presencia de LPS de *Actinobacillus actinomyetemcomitans*, una correspondiente a un paciente (el número 2) con enfermedad periodontal y 3 a pacientes que no mostraban signos de dicha enfermedad. Por lo tanto, de los pacientes con enfermedad periodontal 2% presentaron la presencia de LPS de *Actinobacillus actinomyetemcomitans*, y de los pacientes sin enfermedad periodontal 42.8% presentaron dicho LPS.

Cabe mencionar que las muestras de pacientes sin enfermedad periodontal únicamente se introdujeron en el experimento para observar de qué forma podía

diferir su comportamiento al momento de realizar la ELISA, por esta razón se introdujeron pocas en la placa. Sin embargo, la elevada presencia de *Actinobacillus actinomyetemcomitans* en estos pacientes podría explicarse debido a que la bacteria en si no es la causante del daño periodontal, sino la respuesta inmune que ésta desata, por lo tanto cuando ya esta presente la lesión, en este caso con la presencia de abscesos y bolsas periodontales, la bacteria como tal puede estar ausente.

Otro aspecto a destacar es que, entonces, esta técnica sería muy eficiente para una detección temprana de la bacteria, incluso antes de que se presente el daño periodontal, lo que ayudaría a dar un seguimiento en ese paciente y de esta forma retardar o anular la aparición de los síntomas.

Los resultados obtenidos demuestran que la técnica de ELISA polimixina desarrollada es útil para detectar la presencia de LPS de *Actinobacillus actinomyetemcomitans* en muestras orales humanas, de hecho dicha técnica también demostró su eficacia en la detección de LPS de otras bacterias Gram negativas, como son *Prevotella intermedia* y *Porphyromonas gingivalis* (Proyecto “Estandarización de ELISA–polimixina para la identificación de LPS de *Prevotella intermedia* y *Porphyromonas gingivalis*, en muestras tomadas de bolsas periodontales”, ANEXO VII). Lo que confirma que la ELISA polimixina es una técnica totalmente funcional y accesible.



## CONCLUSIONES

- Se logró desarrollar un método estandarizado de ELISA ligado a Polimixina para la detección de LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* de muestras orales humanas.
- Se obtuvo el LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* con una concentración de carbohidratos de 72.101 µg/mL
- Se determinó que la dilución del conjugado más adecuada para trabajar este sistema es de 1:400.
- Encontramos que la técnica de ELISA polimixina es útil en la detección de LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* utilizando una muestra obtenida de la bolsa periodontal por medio de un papel filtro estéril.
- Toda la técnica y sus procedimientos son factibles de realizar en cualquier laboratorio de investigación o docente.

---

## ANEXOS

### ANEXO I. Preparación de soluciones

#### Solución madre de hemina:

Hemina 50 mg.

NaOH 1N 1 mL.

Agua destilada 100 mL.

Esterilizar a 121° C/ 15 lb /in<sup>2</sup> por 15 minutos.

#### Solución madre de menadiona.

Menadiona o vitamina K 100 mg.

Alcohol etílico del 96° 20 mL.

Esterilizar por filtración para su uso. Conservar protegido de la luz en refrigeración.

#### Solución acuosa de fenol al 90%

Fenol 9 g

Agua destilada 1 mL

Disolver en un vaso de precipitado agitando con mucho cuidado. Utilizar guantes durante todo el proceso.

#### Buffer de fosfatos 0.1M pH 6.8

Fosfato dibásico dodecahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 3.58g

Fosfato de sodio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 1.38g

Agua destilada 100mL

#### Buffer de carbonato-bicarbonato 1M pH 9.5

Carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 10.59 g

Bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) 8.4 g

Agua destilada 100 mL

**Buffer salina fosfatos (PBS)**

Cloruro de sodio NaCl	8.0 g
Cloruro de potasio KCl	0.2 g
Fosfato bibásico dodecahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	2.9 g
Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.2 g
Agua destilada	1000 mL

**Buffer de salina fosfatos / NaCl 0.85% para Elisa**

Cloruro de sodio NaCl	8.5g
Cloruro de potasio KCl	0.2g
Fosfato bibásico dodecahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	2.9g
Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.2g
Agua destilada	1000mL

**Buffer de salina fosfatos / NaCl 0.85% / Tween 20 al 0.05% para ELISA.**

Cloruro de sodio NaCl	8.5g
Cloruro de potasio KCl	0.2g
Fosfato bibásico dodecahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	2.9g
Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.2g
Tween 20	0.5mL
Agua destilada	1000mL.

**Bloqueador para ELISA**

Leche descremada en polvo	5 g
Albúmina de huevo	1 g
Agua destilada	100 mL

**Amortiguador de Sustrato****Solución A**

Fosfato bibásico dodecahidratado de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	1.4196 g
Agua destilada	50mL

**Solución B**

Ácido cítrico	1.0507 g
Agua destilada	50mL

**Solución de trabajo C**

Mezclar

25.7 mL de la solución A

24.3mL de la solución B

**Sustrato - Cromogeno**

Solución de trabajo C	100 mL
O-Fenilendiamina	40 mg (proteger de la luz)
Peroxido de hidrogeno al 30%	40 $\mu\text{L}$

Agregar en el orden anotado. Utilizar inmediatamente después de preparada.

**ANEXO II. Escala de McFarland**

Tubo	$\text{BaCl}_2$ al 1% (mL)	$\text{H}_2\text{SO}_4$ al 1% (mL)	Bacterias / mL
1	0.1	9.9	$3.0 \times 10^8$
2	0.2	9.8	$6.0 \times 10^8$
3	0.3	9.7	$9.0 \times 10^8$
4	0.4	9.6	$1.2 \times 10^9$
5	0.5	9.5	$1.5 \times 10^9$
6	0.6	9.4	$1.8 \times 10^9$
7	0.7	9.3	$2.1 \times 10^9$
8	0.8	9.2	$2.4 \times 10^9$
9	0.9	9.1	$2.7 \times 10^9$
10	1.0	9.0	$3.0 \times 10^9$

### ANEXO III. Relación de Muestras periodontales

#### Muestras de pacientes con Periodontitis y CPI\* de 3 y 4.

CLAVE	EDAD (años)	SEXO
01	65	F
02	29	M
02'	29	M
03	52	F
04	66	M
05	63	M
06	47	F
07	30	F
08	49	F
09	52	F
10	34	F
11	55	M
12	40	M
13	43	F
14	48	M
15	47	F
16	33	F
17	55	M
18	55	F
19	57	F
20	32	M
21	37	M
22	66	F
23	29	F
24	28	M

CLAVE	EDAD (años)	SEXO
25	24	F
26	44	M
27	29	M
28	46	F
29	65	M
30	39	F
31	36	F
32	29	F
33	70	M
34	47	F
35	51	F
36	74	F
37	47	F
38	47	F
39	73	F
40	40	F
41	42	M
42	58	F
43	41	F
44	40	F
45	42	F
46	28	F
47	40	F
48	36	F
49	30	F
50	20	F

F: sexo femenino

M, sexo masculino

**Muestras periodontales de pacientes sin Periodontitis, con una profundidad de sondeo menor a 3 mm.**

CLAVE	EDAD	SEXO
A	56	F
B	72	M
C	50	F
D	56	F
E	47	F
F	35	F

F: sexo femenino

M, sexo masculino

**\* ÍNDICE PERIODONTAL COMUNITARIO**

COMMUNITY PERIODONTAL INDEX FOR TREATMENT NEEDS (Ainamo et al. 1982; CPI OMS 1997)

0 = Sin sangrado después de sondear

1 = Sangrado después de sondear

2 = Cálculo supra o subgingival, o restauraciones con márgenes deficientes profundidad de sondeo menor de 4mm.

3 = Profundidad de sondeo de 4 – 5.5 mm

4 = Profundidad de sondeo de más de 6mm

**ANEXO IV. Resultados del trabajo experimental “Estandarización de ELISA-polimixina para la identificación de LPS de *Prevotella intermedia* y *Porphyromonas gingivalis*, en muestras tomadas de bolsas periodontales”**

***Porphyromonas gingivalis***

Se muestra las absorbancias obtenidas en la placa de ELISA, y en cuadro las que fueron positivas para la presencia de *Porphyromonas gingivalis*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.957	0.698	0.753	0.642	0.720	0.618	0.698	0.777	0.665	0.567	0.641	0.067
B	0.099	0.082	0.049	0.051	0.044	0.022	0.026	0.027	0.019	0.030	0.061	0.061
C	0.043	0.079	0.072	0.043	0.028	0.024	0.080	0.032	0.032	0.066	0.021	0.054
D	0.095	0.053	0.067	0.041	0.041	0.027	0.022	0.032	0.010	0.016	0.030	0.039
E	0.090	0.077	0.066	0.059	0.009	0.027	0.113	0.081	0.020	0.012	0.015	0.048
F	0.033	0.040	0.029	0.031	0.020	0.021	0.019	0.007	0.004	0.015	0.032	0.033
G	0.054	0.060	0.033	0.042	0.035	0.082	0.030	0.020	0.066	0.050	0.026	0.033
H	0.121	0.048	0.091	0.035	0.079	0.062	0.091	0.090	0.030	0.036	0.052	0.046

***Prevotella intermedia***

Se muestra las absorbancias obtenidas en la placa de ELISA, y en cuadro las que fueron positivas para la presencia de *Prevotella intermedia*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.259	0.210	0.223	0.234	0.153	0.112	0.134	0.124	0.246	0.123	0.140	0.038
B	0.064	0.180	0.024	0.023	0.018	0.011	0.006	0.017	0.038	0.021	0.012	0.011
C	0.076	0.126	0.006	0.012	0.007	0.000	0.017	0.000	0.062	0.000	0.035	0.012
D	0.036	0.035	0.035	0.029	0.031	0.012	0.026	0.024	0.023	0.057	0.056	0.000
E	0.038	0.083	0.070	0.017	0.022	0.019	0.017	0.016	0.016	0.007	0.014	0.000
F	0.022	0.019	0.068	0.036	0.018	0.031	0.027	0.036	0.030	0.003	0.041	0.044
G	0.048	0.030	0.020	0.023	0.035	0.020	0.016	0.099	0.023	0.055	0.032	0.046
H	0.027	0.010	0.029	0.014	0.027	0.003	0.005	0.043	0.026	0.058	0.082	0.016

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. MacPhee T, Cowley G. Fundamentos de parodoncia. México :Editorial Limusa; 1989. p. 17-22
2. Moss-Salentijn L, Hendricks-Klyvert M. Dental and Oral Tissues, an introduction. 3 ed. Malvern: Lea & Febiger;1990. p. 161-4.
3. Caries Dental. Dentalsalud [on line] 2009 [citado 11 Jun 2009] Disponible en: URL: <http://www.dentalsalud.com.ve/Caries.htm>.
4. Grant DA, Stern IB, Listgarten MA. Periodontics. 6 ed. St Louis: The C.V. Mosby Company;1988. p. 94-96
5. Henderson B, Wilson M, Sharp L, Ward JM. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Med Microbiol 2002;51:1013-20
6. Zoellner H, Chapple CC, Hunter N. Microvasculature in Gingivitis and Chronic Periodontitis: Disruption of Vascular Networks With Protracted Inflammation. Micros Res Tech 2002;56:15-31
7. Mayorga I, Lafaurie GI, Contreras A, Castillo DM, Barón A, Aya MR. Microflora subgingival en periodontitis crónica y agresiva en Bogotá, Colombia: un acercamiento epidemiológico. Biomédica 2007;27:21-33.
8. Jenco RJ, Zambon JJ, Christersson LA. The origin of periodontal infections. Adv Dent Res 1988;2:245-59.
9. Slots J, Taubman MA. Contemporary Oral Microbiology and Immunology. St Louis: Mosby Year Book;1992. p.
10. Silva TH, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory Diseases: Apical Periodontitis and Periodontal Disease. J Dent Res 2007;86:306-19.
11. Teng Y-T A. The role of acquired immunity and periodontal disease progression. Crit Rev Oral Biol Med 2003;14:237-52.
12. Baker PJ. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. Microbes and Infection 2000;2:1181-92
13. Gemmell E, Seymour GJ. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. Periodontol 2004;35:21-41.



14. Wiebe CB, Putnins EE. The periodontal disease classification system of the American Academy of Periodontology —an update. *J Can Dent Assoc* 2000;66:594-7
15. Armitage GC. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol* 1999;4:1-6
16. Koneman EW. Diagnóstico Microbiológico. 5 ed. Buenos Aires: Editorial Médica panamericana;1999. p. 390-93
17. Henderson B, Nair SP, Ward JM, Wilson M. Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Annu Rev Microbiol* 2003;57:29-55.
18. Cortelli SC, Feres M, Shibli JA, Figueiredo LC, Oliveira VP, Cortelli JR. Presence of Aa on the Community Periodontal Index (CPI) teeth in periodontally healthy individuals. *J Contem dent pract* 2005;6:1-8
19. Van Winkelhoff AJ, Boutaga K. Transmission of periodontal bacteria and models of infection. *J Clin Periodontol* 2005;32:16-27
20. López M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis* en relación a las periodontitis agresivas. *Rev Estomatol Herediana* 2005;15:178-83
21. Chavarria J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en la enfermedad periodontal [Tesis licenciatura] México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2006.
22. Zambon JJ, Umemoto T, De Nardin E, Nakazawa F, Christersson LA, Genco RJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of human periodontal disease. *Adv Dent Res* 1988;2:269-74.
23. Sahm D, Forbes B, Bailey S. Bailey & Scott. Diagnóstico Microbiológico. 11 ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana;2004. p. 470-77
24. Slots J. Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol* 1982;15:606-9.
25. Alsina M, Olle E, Frias J. Improved, Low-Cost Selective Culture Medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol* 2001;39:509-13

26. Mandell RL, Socransky SS. A selective médium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the incidence of the organism in Juvenile Periodontitis. J Periodontol 1981;52:593-8
27. McFadin YF. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 5 ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana;2003. p. 596-617
28. Asakawa R, Kamatsuzawa H, Kawai T, Yamada S, Goncalves RB, Izumi S, et al. Outer membrane protein 100, a versatile virulence factor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Mol Microbiol 2003;50:1125-39.
29. Ebersole JL, Cappelli D, Steffen MJ. Antigenic specificity of gingival crevicular fluid antibody to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Dent Res 2000;79:1362-70.
30. Page RC, Sims TJ, Engel LD, Moncla BJ, Bainbridge B, Stray J, et al. The immunodominant Outer Membrane Antigen of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is located in the serotype-specific high-molecular-mass carbohydrate moiety of LPS. Infect Immun 1991;59:3451-62
31. Bermejo A, Duarte J. Mecanismos de transducción del lipopolisacárido. Ars Pharmaceutica 2003;44:121-39.
32. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Introducción a la Microbiología. 9 ed. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana;2007. p.
33. Kelk P, Claesson R, Hänström L, Lerner UH, Kalfas S, Johansson A, Abundant secretion of Bioactive Interleukin-1 $\beta$  by human Macrophages induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leucotoxin. Infect Immun 2005;73:453-8.
34. Lequin RM. Enzyme Immunoassay (EIA) / Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Clin Chem 2005;51:2415-18
35. Wisdom GB. Enzyme-Immunoassay. Clinical Chemistry 1976;22:1243-55
36. Regueiro JR, López C, González S, Martínez E. Inmunología, biología y patología del sistema inmune. 3 ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2003. p. 195-8.

37. Stites DP, Stobo JD, Fudenberg HH, Weiss JV. Inmunología Básica y Clínica. 5 ed. México D.F.: Editorial El Manual Moderno; 1985. p.
38. Gibbs J. Optimizing the Immobilization of Protein and Other Biomolecules. ELISA Technical Bulletin - No. 2 Corning Incorporated [on line] Julio 2001 [citado 17 Mayo 2009]. Disponible en: URL: [http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/ELISA\\_tapizado.pdf](http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/ELISA_tapizado.pdf)
39. Gibbs J. Effective Blocking Procedures. ELISA Technical Bulletin - No.3. Corning Incorporated [on line] Julio 2001 [citado 17 Mayo 2009]. Disponible en: URL: [http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/ELISA\\_bloqueo.pdf](http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/ELISA_bloqueo.pdf)
40. Gibbs J. Optimizing the Separation Step on 96 Well Plates. ELISA Technical Bulletin - No. 4. Corning Incorporated [on line] Julio 2001 [citado 17 Mayo 2009]. Disponible en: URL: [http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/ELISA\\_lavado.pdf](http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/ELISA_lavado.pdf)
41. Fundamentos y tipos de ELISAs. Cultek [on line] Feb 2006 [citado 17 May 2009] Disponible en: URL: <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-ELISA-protocolos.pdf>
42. Decker JM. ELISA. University of Arizona [on line] Feb 2006 [citado 26 Jun 2009] Disponible en: URL: <http://www.microvet.arizona.edu/courses/mic419/ToolBox/elisa.html>
43. Elisa de tipo competitivo. Fundación Sivida [on line] 2000 [citado 26 Jun 2009] Disponible en: URL: [http://www.sivida.com.ar/medica/elisa\\_competitivo.htm](http://www.sivida.com.ar/medica/elisa_competitivo.htm)
44. Garcia MD. Poliestireno expandido y acetona. Club Científico Bezmiliana. [on line] Abr 2007 [citado 27 Junio 2009]. Disponible en: URL: <http://www.ciencias.ies-bezmiliana.org/blog/quimica/poliestireno-expandido-y-acetona/>
45. Gibbs J. Immobilization Principles – Selecting the Surface. ELISA Technical Bulletin - No. 1. Corning Incorporated [on line] Julio 2001 [citado 17 Mayo 2009]. Disponible en: URL: [http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/ELISA\\_superficie.pdf](http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/ELISA_superficie.pdf)

46. Boudet F, Théze J, Zouali M. [UV-treated polystyrene microtitre plates for use in an ELISA to measure antibodies against synthetic peptides](#). *J Immunol Methods* 1991;142:73-82
47. Gibbs J. Selecting the Detection System - Colorimetric, Fluorescent, Luminescent Methods. ELISA Technical Bulletin - No. 5. Corning Incorporated [on line] Julio 2001 [citado 17 Mayo 2009]. Disponible en: URL: [http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/ELISA\\_deteccion.pdf](http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/ELISA_deteccion.pdf)
48. Blais BW, Bosley J, Martínez A, Popela M. Polymyxin-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Escherichia coli* O111 and O26. *J Microbiol Methods* 2006;65:4