

## Artículo original

### Producción y evaluación *in vitro* de IgY contra *Streptococcus mutans*

Luz Moreno<sup>a</sup>, Claudia Moreno<sup>a</sup>, Valentina Bilbao<sup>b</sup>, Alejandra Acevedo<sup>c</sup>, Ornella Felizzola<sup>a</sup>, Noraida Zerpa<sup>a</sup>, Caridad Malavé<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Fundación Instituto de Estudios Avanzados IDEA. <sup>b</sup>Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

<sup>c</sup>Facultad de Ingeniería, Universidad Católica Andrés Bello.

Recibido 02 de mayo de 2011; aceptado 12 de septiembre de 2011

**Resumen:** La caries dental es una enfermedad infecciosa de alcance mundial, producida por *Streptococcus mutans*. Una estrategia para combatir la bacteria es previniendo su adherencia al esmalte dental mediante el uso de inmunoglobulinas de yema de huevo (IgY). En este trabajo se desarrollaron IgY contra *S. mutans* y se determinó su reactividad a fin de evaluar su potencial para prevenir la caries dental. Los anticuerpos fueron producidos inmunizando gallinas con un liófilo de la bacteria. Se recolectaron los huevos pre y post inmunes y se purificaron las IgY por precipitación con PEG 6000-cloroformo. El mayor nivel de IgY se obtuvo en el día 42 postinmunización, medido por un ensayo ELISA y la reactividad se evaluó por Western Blot, observándose el reconocimiento de bandas específicas entre 41 y 150 kDa que corresponden a proteínas implicadas en la adherencia a la superficie dental. Por la prueba MABA, se observó reactividad cruzada con *S. salivarius*. Observamos la aglutinación e inhibición del crecimiento (MIC) de *S. mutans in vitro* por acción de las IgY. Los resultados demuestran el potencial de estos anticuerpos para ser aplicados en ensayos de inmunización pasiva en nuestro país como una alternativa para prevenir la caries dental.

**Palabras clave:** IgY, *S. mutans*, caries dental, estudios *in vitro*.

### *In vitro* production and evaluation of anti-*Streptococcus mutans* IgY

**Abstract:** Dental caries is a worldwide infectious disease produce by *Streptococcus mutans*. A strategy to combat this bacterium consists in preventing its adherence to tooth enamel through the use egg yolk immunoglobulin (IgY). In this study we developed anti-*S. mutans* IgY and determined its reactivity to evaluate its potential for preventing dental caries. The antibodies were produced by immunizing hens with lyophilized bacteria. Pre and post immunization eggs were collected and their IgY was purified by precipitation with PEG 6000-chloroform. The highest IgY level was obtained on the 42<sup>nd</sup> day post-immunization, as measured by an ELISA test. Reactivity was determined by Western Blot, showing the recognition of specific bands between 41 and 150 kDa, which correspond to proteins involved in the adherence to dental surfaces. A MABA test showed cross-reactivity with *S. salivarius*. IgY activity was shown by *in vitro* agglutination and growth inhibition (MIC) of *S. mutans*. These results show the potential of these antibodies for application in passive immunization trials as an alternative to prevent dental caries.

**Keywords:** IgY, *S. mutans*, dental caries, *in vitro* studies.

\* Correspondencia:  
E-mail: cmalave@idea.gob.ve

## Introducción

La caries dental es un problema de salud pública que afecta a los países en vías de desarrollo, como es el caso de Venezuela. Según la OMS, 5.000 millones de personas sufren de caries en el mundo [1]. El conocimiento que se tiene en nuestro país acerca de la prevalencia de esta enfermedad, se limita sólo a estudios regionales, encontrándose un mayor número de casos en la población infantil [2,3]. *Streptococcus mutans* es el patógeno más

comúnmente aislado de la placa dental humana por lo que es considerado el principal agente etiológico de la caries [4,5]. Existen varios factores relacionados con la virulencia de *S. mutans*, los cuales le permiten acumularse dentro de la placa dental y a la vez producir y tolerar los ácidos que causan las caries. El inicio de la infección ocurre en dos fases distintas; primero las proteínas de superficie de la bacteria interactúan con el hospedador o con los productos bacterianos adsorbidos en la superficie del diente. Luego, se forma una biopelícula de bacterias agregadas de *S. mutans* y otras

especies bacterianas, mediante la síntesis de polisacáridos extracelulares específicos como los glucanos, a través de un sistema enzimático llamado glucosiltransferasas [6,7]. Por otro lado, *S. mutans* produce las proteínas que enlazan estos glucanos, fortaleciendo así la biopelícula [6].

Desde hace varias décadas se ha demostrado que la inmunización activa de roedores y primates con proteínas o células completas de *S. mutans*, inducen la formación de anticuerpos IgA e IgG, los cuales protegen contra la colonización de estas bacterias [8-10]. Sin embargo, se ha encontrado que existen determinantes antigénicos compartidos entre proteínas de *S. mutans* y tejidos humanos, incluyendo el músculo cardíaco, que favorecen una respuesta inmunológica cruzada [11-13]. También se ha demostrado, en pacientes con fiebre reumática, la presencia de altos títulos de anticuerpos IgG contra tejido miocárdico humano, que igualmente reaccionan cruzadamente con proteínas de *S. mutans* [14]. Estos efectos colaterales representan un gran obstáculo para el desarrollo de una vacuna anticaries. Recientemente, se ha explorado la inmunización pasiva utilizando anticuerpos monoclonales murinos, anticuerpos producidos en plantas transgénicas y en leche de bovinos, como una alternativa en la prevención de la enfermedad [15-18]. Otra novedosa estrategia de inmunización pasiva, es la administración oral de anticuerpos producidos en aves o inmunoglobulinas de yema de huevo (IgY), los cuales previenen la adherencia de *S. mutans* al esmalte dental [19-21]. Estos anticuerpos se extraen de la yema de los huevos de las aves y tienen en la actualidad una gran variedad de aplicaciones por las múltiples ventajas que presentan, como es su alto rendimiento, fácil producción y, debido a la distancia filogenética existente entre aves y mamíferos, se pueden producir anticuerpos más específicos que evitarían las reacciones cruzadas [22]. En este trabajo nos propusimos producir anticuerpos IgY contra la bacteria *Streptococcus mutans* y evaluar su reactividad a fin de ser utilizados en nuestro país como una opción efectiva y económica para la prevención de la caries dental.

## Materiales y métodos

**Preparación del antígeno:** Para la inmunización de las gallinas, se utilizó como antígeno un liófilo de la cepa CVCM 660 de *S. mutans* provenientes del Centro Venezolano de Cultivos de Microorganismos, (CVCM, UCV), el cual fue resuspendido en solución salina y sonicado por 3 minutos con pulsos de 40 segundos. Luego se le determinó la concentración de proteínas utilizando el método del ácido bicinonónico (BCA) (Pierce, BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit). Para evaluar la reactividad cruzada con otras especies de *Streptococcus* relacionadas con la caries dental, se emplearon liófilos de *Streptococcus salivarius* (CVCM 791) y *Streptococcus oralis* (CVCM 657). Para análisis posteriores, estas bacterias junto con *S. mutans* fueron activadas en el medio infusión cerebro-corazón (Sigma Chemical, Brain Heart Infusión Agar, USA) y cultivadas en agar cerebro-corazón a 37 °C durante 24 horas.

Luego fueron cosechadas con solución salina estéril (SSE) y ajustadas a una concentración de  $9 \times 10^8$  organismos/mL según el estándar de MacFarland [23, 24].

**Inmunización y obtención de los anticuerpos IgY:** Se utilizaron 2 gallinas raza Isabrown de 23 semanas de edad, con una tasa de postura de 6-7 huevos semanales. Los animales fueron obtenidos de granjas comerciales, vacunados, alimentados y mantenidos en jaulas suspendidas en el bioterio del Instituto de Estudios Avanzados, (IDEA) y cuidados de acuerdo con la información contenida en la guía formulada por la Comunidad Europea para el uso de animales experimentales (L358-86/609/EEC). Se realizaron tres inmunizaciones a nivel intramuscular (en el músculo pectoral): la primera dosis fue administrada con una concentración de 100 µg/mL del liófilo de *S. mutans*, resuspendido en solución salina y mezclado (1:1 v/v) con Adyuvante Completo de Freund (ACF) (Sigma-Aldrich, Freund's Adjuvant Complete, USA) hasta obtener una emulsión. Las dos últimas se aplicaron con la mitad de la concentración inicial y Adyuvante Incompleto de Freund (AIF) (Sigma-Aldrich, Freund's Adjuvant Incomplete, USA) (1:1 v/v), con intervalos de 10 días entre cada dosis. Se recolectaron los huevos pre y post inmunes. Se purificaron las IgY a partir de las yemas de los huevos por la técnica de precipitación con polietilenglicol 6000 (Scharlau, P00065), descrita por Polson *et al.* [25]. Luego se les determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford [26] y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

**Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (ELISA):** Los niveles de anticuerpos IgY contra *Streptococcus mutans* fueron evaluados a través de un ensayo de ELISA indirecto. Las placas fueron sensibilizadas con 100 µL/ pozo de la suspensión bacteriana, a una concentración óptima de  $5,86 \times 10^5$  organismos/mL en PBS, la cual fue determinada en ensayos previos. Después de bloquear con leche descremada se incubaron los anticuerpos IgY preinmunes y los correspondientes a los días de mayor producción de anticuerpos, determinados en el laboratorio (días 13 y 42 después de la última inmunización) [27], a una dilución 1:100 e incubados por 1 1/2 hora a 37 °C. Posteriormente, se añadió el anticuerpo secundario anti-IgY, producido en conejo, conjugado a peroxidasa (Thermo Scientific Pierce Protein Research Products, Cambridge UK) diluido 1:20.000 e incubado por 1 hora a 37 °C. Se realizaron tres lavados con PBS-Tween al 0,05% v/v en cada paso de incubación. Finalmente, se añadió el sustrato O-dihidroclorofenilendiamina (Thermo Scientific Pierce Protein Research Products, USA), luego se realizó la lectura en un lector de placas (Biotek, Synergy HT) a 440 nm. Todos los valores fueron corregidos por el blanco.

**Ensayo Blot de Múltiples Antígenos (MABA):** La reactividad cruzada de los anticuerpos IgY anti-*S. mutans* se evaluó mediante un ensayo blot de antígenos múltiples (MABA, Multiple Antigen Blot Assay) [28]. Para ello, se sensibilizó

un papel de nitrocelulosa (Biorad, USA) con 50 µL de cada suspensión bacteriana de *S. mutans*, *S. salivarius* y *S. oralis* (a una concentración de  $9 \times 10^8$  organismos/mL), en una cámara acrílica (Minibloter® 28 S-L Immunetics Inc., Cambridge, MA). Después de bloquear con leche descremada, se cortaron tiras de 2 mm c/u, perpendiculares a los canales de la cámara. Cada tira se incubó con los anticuerpos IgY, diluidos 1:1.000 en solución de bloqueo, durante 1 hora y media a temperatura ambiente. Los anticuerpos IgY fueron detectados con un anticuerpo IgG anti-IgY conjugado a peroxidasa (Thermo Scientific Pierce Protein Research Products, Cambridge UK) a una dilución de 1:20.000. Las tiras fueron incubadas con un sustrato luminiscente Luminol (ECL, WB Analysis System, Amersham, UK) y reveladas en una placa fotográfica (ECL-Hiperfilm). En cada paso de incubación se realizaron tres lavados con PBS-Tween al 0,05% v/v.

**Ensayo de aglutinación:** Se preparó una suspensión de *S. mutans* completa a una concentración de 2 mg/mL, fijada con formalina al 0,3%, con una modificación del método de Otake *et al* [19]. Se mezclaron 100 µL de la suspensión de bacterias con igual volumen de los anticuerpos IgY (pre y post-inmune), diluidos en solución salina a diferentes concentraciones (1:2, 1:10 y 1:50). Las mezclas se colocaron en placas de 24 pozos y fueron incubadas durante 1 hora a 37 °C. La aglutinación fue determinada visualmente mediante un microscopio invertido con un aumento de 10X.

**Electroforesis SDS-PAGE y Western blot:** La suspensión de bacterias de *S. mutans* fue previamente sonicada por 3 minutos con pulsos de 40 segundos y se le añadió un cóctel de inhibidores de proteasas (Calbiochem Protease Inhibitor Cocktail Set III), luego se le determinó la concentración de proteínas por el método de BCA. Este sonificado (280 µg/mL) fue corrido en condiciones reductoras y resuelta en gel de poliacrilamida al 8% (SDS-PAGE) [29]. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa la cual fue bloqueada durante la noche a 4 °C y cortada en tiras para luego ser incubadas con los anticuerpos IgY durante 1 ½ hora a temperatura ambiente [30]. Por último, se enfrentaron las tiras con un anticuerpo secundario IgG anti-IgY conjugado a peroxidasa (Thermo Scientific Pierce Protein Research Products, Cambridge UK) y se revelaron como se indicó para el ensayo de MABA. En cada paso de incubación se realizaron tres lavados con PBS 0,01M-Tween al 0,05%.

**Ensayo de Western blot competitivo:** Para demostrar la especificidad del reconocimiento de *S. mutans*, el anticuerpo IgY de mayor reactividad (diluido 1:100) fue preincubado con una suspensión de *S. mutans* (20 µg/mL) durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego las tiras de nitrocelulosa con las proteínas de *S. mutans*, previamente transferidas, fueron incubadas con la mezcla del anticuerpo IgY y la suspensión de la bacteria. Por último, se incubaron las tiras con un anticuerpo secundario IgG anti-IgY conjugado a peroxidasa (Thermo Scientific Pierce Protein Research Products,

Cambridge UK) y se revelaron como se indicó para el ensayo de MABA. En cada paso de incubación se realizaron tres lavados con PBS 0,01M-Tween al 0,05%. En los casos en los cuales se observó la desaparición de una banda se consideró como un ensayo competitivo específico.

**Ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano MIC, (Minimal Inhibitory Concentration):** La suspensión bacteriana de *S. mutans*, previamente crecida en el medio infusión cerebro corazón, durante 18 horas a 37 °C en condiciones aeróbicas [31], fue ajustada a una concentración de  $7,3 \times 10^5$  organismos/mL a partir de un estándar de McFarland. Luego las bacterias fueron servidas en placas de cultivo estériles de 96 pozos a un volumen final de 200 µL; inmediatamente se añadió el anticuerpo IgY a diferentes concentraciones desde 512 µg/mL hasta 8 µg/mL y se incubó a 37 °C con agitación leve durante 18 horas [32]. El efecto de inhibición del crecimiento bacteriano fue determinado por espectrofotometría leyendo a una longitud de onda de 600 nm.

## Resultados

**Producción de IgY anti-*Streptococcus mutans*:** A través del ensayo de ELISA indirecto se observó que los animales experimentales produjeron anticuerpos IgY específicos contra el antígeno crudo de *S. mutans*, encontrándose que a una concentración de  $5,86 \times 10^5$  organismos/mL y a una dilución del anticuerpo de 1:100 (día 42 post-inmune), se obtuvo el mayor valor de absorbancia (~ 0,8) (Tabla 1).

Tabla 1. Niveles de IgY anti-*Streptococcus mutans* a través de un ensayo de ELISA, determinados a los 13 y 42 días postinmunización.

IgY	Absorbancia 440 nm
Pre-inmune	0,13 ± 0,01
13 días	0,14 ± 0,03
42 días	0,76 ± 0,12

Datos expresados como Media ± DS.

Utilizando el ensayo de MABA se observaron resultados similares, debido al reconocimiento de la bacteria *S. mutans* por los anticuerpos policlonales IgY. Sin embargo, hubo reactividad cruzada con otra especie del género *Streptococcus* debido a que los anticuerpos IgY anti-*S. mutans* reconocieron también a *S. salivarius*. Con respecto a *S. oralis* que también fue evaluada, no se observó ninguna respuesta de los anticuerpos IgY (Figura 1). En ninguno de los ensayos hubo respuesta de los anticuerpos preinmunes.

**Ensayo de aglutinación:** Se evaluó a través de un ensayo de aglutinación la capacidad de los anticuerpos IgY de unirse a *S. mutans*. Observamos que los anticuerpos IgY fueron capaces de reaccionar con las bacterias y formar agregados producto de la aglutinación. Si comparamos estos resultados con el control negativo (pre-inmune) se aprecia la evidente

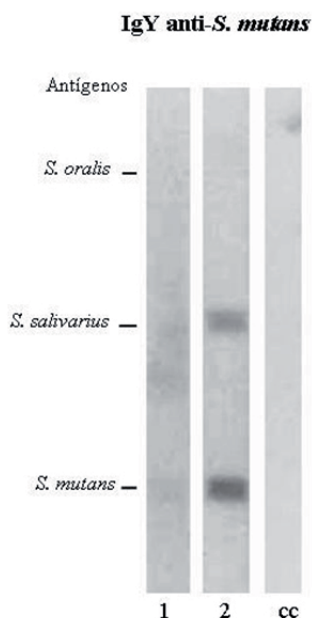


Figura 1. Especificidad y reactividad cruzada a través del ensayo de MABA. Se evaluó la IgY (día 42) frente a suspensiones bacterianas de *S. mutans*, *S. salivarius* y *S. orali* a una concentración de  $9 \times 10^8$  organismos/mL. 1: preinmune, 2: postinmune, cc: control del conjugado. Dilución de las IgY: 1:1.000.

diferencia de aglutinación, inclusive con la dilución más alta del anticuerpo post-inmune (Figura 2).

*Determinación de la inmunoreactividad de los anticuerpos por la técnica de Western blot:* A través del ensayo de Western blot se determinó que los anticuerpos IgY contra *S. mutans*, correspondientes al día 42, reconocieron 8 bandas proteicas específicas con pesos aproximados que van desde 41 hasta 150 kDa las cuales no fueron reconocidas por el anticuerpo preinmune. Todas estas bandas fueron inhibidas al preincubar los anticuerpos IgY con la suspensión bacteriana de *S. mutans* (Figura 3).

*Determinación de la inhibición del crecimiento bacteriano a través del ensayo de MIC:* La reactividad de los anticuerpos IgY contra la bacteria *S. mutans* en su forma activa, fue evaluado por medio del ensayo de MIC, en el cual se observó que el anticuerpo IgY a una concentración de 32  $\mu\text{g/mL}$ , fue capaz de inhibir el crecimiento de *S. mutans*, obteniéndose un valor de absorbancia de 0,1 a las 18 horas de incubación, mientras que con el anticuerpo preinmune fue de 0,8. La bacteria *S. mutans* crecida en el medio infusión cerebro corazón, utilizada como control, alcanzó un valor de absorbancia de 1 a las 18 horas.

## Discusión

La producción de anticuerpos en gallinas, particularmente las inmunoglobulinas extraídas a partir de la yema de los huevos (IgY), es una técnica que ha demostrado ser exitosa con fines de investigación, diagnóstico y como agentes terapéuticos, debido a las múltiples ventajas que ofrece

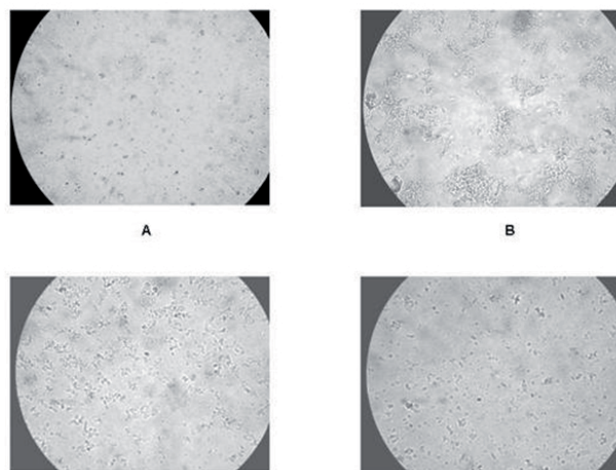


Figura 2. Ensayo de aglutinación con bacterias completas *S. mutans* y anticuerpos IgY preinmune y postinmune (día 42). Se mezcló a partes iguales la suspensión bacteriana con los anticuerpos y se colocaron en placas de 24 pozos. La aglutinación se visualizó a través de un microscopio invertido con objetivo 10X. A: preinmune (1:2); B: postinmune (1:2); C: postinmune (1:10); D: postinmune (1:50).

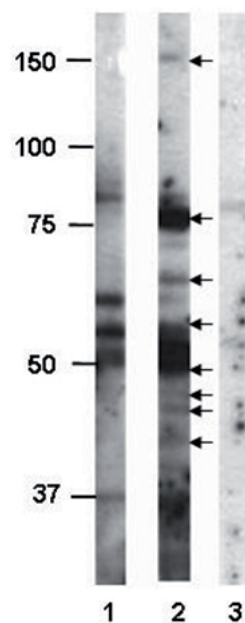


Figura 3. Western blot de la suspensión bacteriana de *S. mutans* sonicada. Líneas 1: anticuerpo preinmune, 2: anticuerpo postinmune, 3: anticuerpo postinmune incubado con la suspensión bacteriana. El anticuerpo postinmune corresponde al día 42 después de la última inmunización.

principalmente porque se evita el sufrimiento animal, además de su fácil producción y bajo costo [33].

En este estudio se generaron anticuerpos policlonales en gallinas contra una cepa de la bacteria *S. mutans* causante de la caries dental. A través del ensayo de ELISA indirecto se demostró que la bacteria fue inmunogénica, obteniéndose un anticuerpo capaz de reconocerla en su forma nativa. Se demostró también, a través del ensayo de MABA, que los anticuerpos (IgY) desarrollados no sólo reconocen a *S. mutans*, sino también a *S. salivarius*, otra especie que forma parte de la flora bacteriana implicada en la caries dental. Probablemente, *S. mutans* y *S. salivarius* compartan



determinantes antigénicos presentes en su superficie, los cuales puedan ser reconocidos por el anticuerpo [34]. Por el contrario, no se observó reactividad cruzada con *S. oralis*, otra de las especies causantes de la enfermedad y esto podría deberse al menor porcentaje de homología reportado entre ambas [34]. Por otra parte, se observó la capacidad de las IgY de aglutinar a *S. mutans* demostrándose su unión específica a la superficie de la bacteria, lo cual resultaría beneficioso, ya que se podría inhibir la formación de la placa dental, evitando de esta manera, su acción patogénica sobre el esmalte dental. Igualmente, en ensayos realizados *in vivo* (humanos) e *in vitro*, se ha demostrado la utilidad de las IgY anti-*S. mutans*, en la reducción de la bacteria en la placa dental [35]. Resultados similares han sido reportados por otros autores, quienes obtuvieron IgY contra *S. mutans* capaces de inhibir la acumulación bacteriana a la placa dental, utilizando un modelo experimental de caries en ratas [19, 20]. Los anticuerpos IgY obtenidos fueron capaces de inhibir el crecimiento de *S. mutans*, en su forma activa *in vitro* (medido por un ensayo MIC), sugiriendo que los mismos podrían inhibir también la colonización de *S. mutans* en un ensayo *in vivo* y evitar así la formación de la placa dental. En el ensayo de Western blot los anticuerpos IgY reconocieron cuatro bandas específicas de pesos moleculares de ~ 41, 64, 76 y 150 kDa. La banda de 150 kDa, podría corresponder a una de las proteínas del grupo de las glucosiltransferasas, para las cuales se han reportado pesos moleculares que van desde ~150 a 180 kDa [36]. Estas isoenzimas son catalizadores en la síntesis de glucanos, los cuales están implicados en la formación de la placa dental. Las otras bandas de ~41, 64 y 76 kDa reconocidas por los anticuerpos IgY anti *S. mutans*, han sido identificadas por otros autores como proteínas de enlace a glucanos (Gbp-B, Gbp-C y Gbp-D respectivamente) [37]. Otras bandas de pesos moleculares entre 45 y 54 kDa fueron también reconocidas, sin embargo, sus pesos moleculares no corresponden a las reportadas para *S. mutans*. Es probable que el progresivo procesamiento de la muestra pudiera clivar las proteínas y producir bandas de diferentes pesos moleculares. Es de hacer notar que el reconocimiento de las moléculas fue completamente inhibido cuando los anticuerpos IgY fueron preincubados con un extracto de *S. mutans*, demostrando la especificidad de las IgY producidas. Los resultados presentados en este estudio, confirman el potencial valor de las IgY para el desarrollo de estrategias de prevención contra la caries dental al ser utilizados en protocolos de inmunización pasiva; debido a que se ha demostrado que la inmunización activa podría tener efectos colaterales indeseables, producidos por la reactividad cruzada observada entre proteínas de bacterias del género *Streptococcus* y tejidos humanos [11-13]. Sería interesante optimizar esta estrategia, produciendo anticuerpos en gallinas utilizando cepas autóctonas de *Streptococcus*, implicadas en la caries dental, aisladas de pacientes, a fin de ampliar el espectro de protección en una inmunización pasiva. Es importante resaltar que debido a la fácil producción de los anticuerpos en gallinas, estos podrían obtenerse en grandes cantidades,

lo cual garantizaría poder ofrecer el producto a la población en general.

## Referencias

1. World Health Organization. Global oral health databases. 2002. En: [http://www.who.int/oral\\_health/databases/en/index.html](http://www.who.int/oral_health/databases/en/index.html). Acceso 10 de julio 2007.
2. Morón A, Rivera L, Rojas F. Caries dental, estrato socioeconómico y necesidades de tratamiento en escolares de dos zonas de la región nor-occidental de Venezuela. MedULA. 2002; 11:15-20.
3. Morón A. Prevalencia de caries dental en escolares del municipio Maracaibo. Acta Odontol Venez. 1998; 36:28-34.
4. World Health Organization. 2003. World Oral Health Report. En: [http://w.w.who.int/oral\\_health/publications/repost03/en/](http://w.w.who.int/oral_health/publications/repost03/en/). Acceso 18 de enero 2010.
5. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol Rev. 1986; 50:353-80.
6. Mattos-Graner RO, Jin S, King W, Chen T, Smith DJ, Duncan M. Cloning of the *Streptococcus mutans* gene encoding glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates. Infect Immun. 2001; 69:6931-41.
7. Cardenas D. Fundamentos de Odontología. 3ª ed. Bogotá: Corporación para Investigaciones Biológicas. 2003.
8. Russell MW, Childers NK, Michalek SM, Smith DJ, Taubman MA. A caries vaccine? The state of the science of immunization against dental caries. Caries Res. 2004; 38:230-5.
9. Smith D. Caries vaccines for the twenty-first century. J Dental Education. 2003; 67:1130-9.
10. Challacombe SJ, Lehner T. Salivary antibody responses in rhesus monkeys immunized with *Streptococcus mutans* by the oral, submucosal or subcutaneous routes. Arch Oral Biol. 1979; 24:917-25.
11. Van De Rijn I, Bleiweis AS, Zabriskie JB. Antigens in *Streptococcus mutans* cross reactive with human heart muscle. J Dent Res. 1976; 55:59-64.
12. Hughes M, Machardy SM, Sheppard AJ, Woods NC. Evidence for an immunological relationship between *Streptococcus mutans* and human cardiac tissue. Infect Immun. 1980; 27:576-88.
13. Dale JB, Beachey EH. Protective antigenic determinant of streptococcal M protein shared with sarcolemmal membrane protein of human heart. J Exp Med. 1982; 156:1165-76.
14. Ackermans F, Pini A, Wachsmann D, Scholler M, Ogier J, Klein J.P. Anti-IgG antibodies in rheumatic diseases cross-react with *Streptococcus mutans* SR antigen. Clin Exp Immunol. 1991; 85:265-9.
15. Ma JKC, Hunjan M, Smith R, Kelly C, Lehner T. An investigation into the mechanism of protection by local passive immunization with monoclonal antibodies against *Streptococcus mutans*. Infect Immun. 1990; 58:3407-14.
16. Ma JKC, Hiatt A, Hein M, Vine ND, Wang F, Stabila P, Van Dolleweerd C, Mostov K, Lehner T. Generation and assembly of secretory antibodies in plants. Science 1995; 268:716-9.
17. Loimaranta V, Carlen A, Olsson J, Tenovuo J, Syvaöja EL, Korhonen H. Concentrated bovine colostrum whey proteins from *Streptococcus mutans*/*Strep. sobrinus* immunized cows inhibit the adherence of *Strep. mutans* and promote

- the aggregation of mutans streptococci. J Dairy Res. 1998; 65:599-607.
18. Mitoma M, Oho T, Michibata N, Okano K, Nakano Y, Fukuyama M, Koga T: Passive immunization with bovine milk containing antibodies to a cell surface protein antigen-glucosyltransferase fusion protein protects rats against dental caries. Infect Immun. 2002; 70:2721-4.
  19. Otake S, Nishihara Y, Makimura M, Hatta H, Kim M, Yamamoto T *et al.* Protection of rats against dental caries by passive immunization with hen-egg-yolk antibody (IgY). J Dent Res. 1991; 70:162-6.
  20. Smith D, King W, Godiska R. Passive transfer of immunoglobulin Y antibody to *Streptococcus mutans* glucan binding protein B can confer protection against experimental dental caries. Infect. Immun. 2001; 69:3135-42.
  21. Koga T, Oho T, Shimazaki Y, Nakano Y. Immunization against dental caries. Vaccine. 2002; 20:2027-44.
  22. Schade R, Gutierrez C, Rodolfo S, Chacana PA, Porankiewicz J, Terzolo HR. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): A review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. Altern Lab Anim. 2005;33:129-54.
  23. MacFarland J. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. JAMA. 1907; 49:1176-8.
  24. Hendrickson DA, Krenz MM. Reagents and stains. In: Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, editors. Manual of clinical microbiology, 5<sup>th</sup> ed. Washington D.C: American Society for Microbiology. 1991. p 1296.
  25. Polson A. Isolation of IgY from the yolks of eggs by a chloroform polyethylene glycol procedure. Immunol Invest. 1990.19:253-8.
  26. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem. 1976; 72:248-54.
  27. Garcia-Marchan Y, Sojo F, Rodriguez E, Zerpa N, Malave C, Galindo-Castro I, Salerno M, Benaim G. *Trypanosoma cruzi* calmodulin: Cloning, expression and characterization. Exp Parasitol. 2009; 123:326-33.
  28. Noya O. The multiple antigen blot assay (MABA): a simple immunoenzymatic technique for simultaneous screening of multiple antigens. Immunol Lett. 1998;63:53-6.
  29. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227:680-5.
  30. Burnette WN. Western Blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal Biochem. 1981; 112:195-203.
  31. Chang H, Ou-Yang R, Tang Chen Y, Cheng Chen C. Productivity and some properties of immunoglobulin specific against *Streptococcus mutans* serotype C in chicken egg yolk (IgY). J Agric Food Chem. 1999; 47:61-6.
  32. He J, Eckert R, Pharm T, Simanian M, Hu C, Yarbrough D *et al.* Novel synthetic antimicrobial peptides against *Streptococcus mutans*. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51:1351-8.
  33. Chacana PA, Terzolo HR, Gutiérrez C, Schade R. Tecnología IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina: biología, propiedades y su aplicación en la medicina humana y veterinaria. Rev Med Vet. 2004; 85:179-89.
  34. Bentley R, Leigh J, Collins M. Intrageneric structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. Int J Syst Bacteriol. 1991; 41:487-94.
  35. Hatta H, Tsuda K, Ozeki M, Kim M, Yamamoto T, Otake S *et al.* Passive immunization against dental plaque in humans: effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to *Streptococcus mutans*. Caries Res. 1997; 31:268-74.
  36. Islam B, Khan S, Khan A. Dental caries: from infection to prevention. Med Sci Monit. 2007;13:196-203.
  37. Zhu L, Kreth J, Cross S, Gimzewski J, Shi W, Qi F. Functional characterization of cell-wall-associated protein Wap A in *Streptococcus mutans*. Microbiology. 2006; 152:2395-404.