

# Detección de anticuerpos para Chagas y Toxoplasmosis en trasudado mucoso oral

► Edgardo Moretti<sup>1</sup>, Beatriz Basso<sup>1</sup>, Patricia Gil<sup>2</sup>, Beatriz Vaca<sup>3</sup>, Josefina Jacqueline<sup>4</sup>, Paola Yasenzanero<sup>4</sup>

- 
1. Dr. en Bioquímica.
  2. Técnica de Laboratorio.
  3. Médica.
  4. Bioquímica.

Servicio Nacional de Chagas. Rondeau 41, 5000 Córdoba, Argentina  
Hospital Universitario de Maternidad y Neonatología, Fac. de Ciencias Médicas, Univ. Nac. de Córdoba.  
Santa Rosa 1045. 5000 Córdoba.

## Resumen

El Trasudado Mucoso Oral (TMO) es un fluido biológico que puede obtenerse mediante una almohadilla absorbente colocada entre la encía y la mejilla inferior y que contiene 20% de IgG, 40% de IgA y 10% de IgM en relación al suero. El objetivo del trabajo fue analizar la confiabilidad del TMO como muestra biológica para la detección de anticuerpos en Chagas y Toxoplasmosis. Sueros de pacientes ambulatorios, embarazadas y voluntarios sanos fueron estudiados para Chagas y Toxoplasmosis empleando Inmunofluorescencia, ELISA y Hemaglutinación. Las muestras de TMO fueron estudiadas por ELISA y los resultados comparados con los métodos de referencia para determinar sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN). En Chagas, la sensibilidad osciló entre 91% y 100% con tres diferentes equipos ensayados, mientras la especificidad varió entre 90 y 100%, el VPP entre 95% y 96% y el VPN entre 97% y 99%. En Toxoplasmosis no se detectaron resultados falsos positivos (S 95%, E 100%, VPP 100% y VPN 98%). Estos resultados sugieren que el TMO puede ser un fluido biológico alternativo adecuado para estudios inmunoepidemiológicos y también servir como *screening* en el diagnóstico y prevención de la transmisión vertical de enfermedades infecciosas.

**Palabras clave:** Trasudado mucoso oral \* Chagas \* Toxoplasmosis \* inmunodiagnóstico \* estudios seroepidemiológicos.

## Summary

### **DETECTION OF ANTIBODIES TO TRYPANOSOMA CRUZI AND TOXOPLASMA GONDII IN ORAL MUCOSAL TRANSUDATE**

*Oral mucosal transudate (OMT) is a biological fluid that can be obtained by an absorbent pad placed between lower cheek and gum, and contains 20% IgG, 40% IgA and 10% IgM comparing with serum. The aim of this work was to analyse the performance of OMT as biological material to detect antibodies in Chagas' disease and Toxoplasmosis. Sera of ambulatory patients, pregnant women and healthy volunteers were tested for Chagas*

**Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

and Toxoplasmosis employing Immunofluorescence, ELISA and Hemagglutination. OMT of the same patients were assayed by ELISA, and the results compared to determinate sensibility, specificity and predictive value. In Chagas serology, three different commercial kits were assayed. The sensibility ranged from 91 to 100%, specificity between 90 and 100%. The predictive values oscillate between 95% and 99%. The studies in Toxoplasmosis did not shown false positive results. The sensibility was 95%, specificity 100% and the predictive values between 98% and 100%. Sera from neonates born from Toxoplasmosis infected mothers were also studied, and the results were in agreement with reference tests. These results suggest that OMT could be a suitable alternative biological fluid in immunoepidemiological surveys, and also as screening test in the diagnosis and prevention of materno-fetal transmission of infectious diseases.

**Key words:** Oral mucosal trasudate \* Chagas \* Toxoplasmosis \* immunodiagnosis \* seroepidemiological surveys.

## Introducción

Los métodos inmunoserológicos son herramientas epidemiológicas esenciales para conocer el estado inmune de la población, la incidencia o prevalencia de infecciones y el riesgo de transmisión materno-fetal de enfermedades causadas por virus, bacterias o parásitos. La toma de muestras de sangre en áreas rurales o en centros de salud de baja complejidad, es a menudo dificultosa, principalmente en niños y puede ser, además, fuente de contaminación para trabajadores de la salud. Actualmente se encuentra muy difundida la obtención de muestras de sangre capilar y la conservación en papel de filtro (1) (2).

El estudio de materiales biológicos alternativos a la sangre es objeto de constante búsqueda, principalmente desde el incremento de las medidas de bioseguridad que siguieron a la aparición del SIDA y al aumento constante de la incidencia de enfermedades transmisibles como hepatitis B, C, etc. Con la intención de obtener muestras por métodos no invasivos se han ensayado otros materiales biológicos como saliva y orina (3) (4) con resultados poco satisfactorios, ya que no poseen la suficiente concentración de anticuerpos para posibilitar su detección con sensibilidad aceptable.

El fluido de la cavidad bucal es una mezcla de saliva y trasudado gingival, que penetra normalmente procedente del suero, a una velocidad lenta y constante. Dicho trasudado transporta proteínas séricas, entre ellas inmunoglobulinas (Igs). A diferencia de la saliva, el Trasudado Mucoso Oral (TMO) contiene, además de IgA, mayores concentraciones de IgG e IgM, que alcanzan en promedio 36%, 20% y 10% respectivamente, de los niveles séricos de inmunoglobulinas (5). Si bien fisiológicamente las cantidades de TMO y fluido gingival en la boca son muy bajas, predominando francamente la IgA proveniente de saliva, es posible esti-

mular artificialmente el trasudado, colocando una almohadilla embebida en solución hipertónica en la hendidura gingival. De esta forma se obtiene un fluido biológico enriquecido en TMO, con una composición relativa de Igs similar a la del plasma. El TMO se ha empleado para investigación de anticuerpos contra hepatitis, HIV, rubeola y otras patologías infecciosas con elevada sensibilidad y especificidad (6-9).

En el presente trabajo se realizó la investigación de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* y *Toxoplasma gondii* en muestras de TMO, y se correlacionaron los resultados con las pruebas serológicas de referencia.

## Materiales y Métodos

**Muestras:** Suero y TMO de pacientes ambulatorios que concurren al Laboratorio del Servicio Nacional de Chagas, embarazadas atendidas en el Hospital Universitario de Maternidad y Neonatología y voluntarios del equipo de salud de ambas instituciones. A todos ellos se les solicitó consentimiento para ingresar en el estudio. También se obtuvieron muestras de niños en edad escolar en un hospital rural. En este caso en lugar de suero se realizó punción capilar para obtener sangre, utilizando como conservante glicerina (Sero-kit, Polychaco, Argentina).

**TMO:** Se obtuvo mediante un dispositivo comercial (Orasure, EPITOPE INC, Oregon, USA) consistente en una almohadilla embebida en solución hipertónica y un tubo con solución conservante, que contiene inhibidores enzimáticos y antimicrobianos. La almohadilla se colocó entre la encía inferior y la mejilla, efectuando una ligera presión. Luego de 2 a 3 min se retiró y se sumergió en la solución conservadora. Se mantuvieron los tubos en heladera para permitir la elución

de los anticuerpos desde la almohadilla, completando el proceso mediante centrifugación. Las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta su uso, o a -20 °C cuando se almacenaron por períodos prolongados.

**Métodos serológicos:** En suero se emplearon las clásicas técnicas de referencia para Chagas y Toxoplasmosis: ELISA, Inmunofluorescencia indirecta y Hemaglutinación indirecta.

Para la investigación de anticuerpos para Chagas en TMO se utilizó la técnica de ELISA con tres equipos comerciales (Biozma, GenCell y WienerLab, Argentina) con las siguientes modificaciones: se empleó TMO sin diluir, conservando los volúmenes finales de acuerdo a las instrucciones estipuladas en cada equipo y se triplicaron los tiempos de incubación con relación a lo recomendado para suero. El Límite de Corte (*Cut-off*) se calculó de acuerdo al procedimiento especificado para cada equipo de ELISA, pero variando su valor, de acuerdo a lo determinado en ensayos previos utilizando la curva ROC. Para el estudio de anticuerpos para Toxoplasmosis en TMO se empleó la técnica de ELISA con equipos marca GenCell.

**Estudios de correlación :** Las pruebas se efectuaron a doble ciego. Un resultado fue considerado positivo o negativo en suero cuando existió concordancia entre las tres técnicas empleadas. Se efectuaron tablas tetracóricas para calcular sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo, tomando como verdaderos positivos aquellos sueros que resultaron reactivos por las tres técnicas de referencia y como verdaderos negativos los sueros en los cuales no se detectaron anticuerpos contra *T. cruzi* o *T. gondii* por las mismas técnicas. Se emplearon las siguientes fórmulas matemáticas:

$$\text{Sensibilidad (S)} = \frac{\text{verdaderos positivos}}{\text{verdaderos positivos} + \text{falsos negativos}} \times 100$$

$$\text{Especificidad (E)} = \frac{\text{verdaderos negativos}}{\text{verdaderos negativos} + \text{falsos positivos}} \times 100$$

$$\text{Valor Predictivo Positivo (VPP)} = \frac{\text{verdaderos positivos}}{\text{verdaderos positivos} + \text{falsos positivos}} \times 100$$

$$\text{Valor Predictivo Negativo (VPN)} = \frac{\text{verdaderos negativos}}{\text{verdaderos negativos} + \text{falsos negativos}} \times 100$$

## Resultados

### SEROLOGÍA PARA ENFERMEDAD DE CHAGAS

En la Tabla I se pueden observar los resultados obtenidos sobre un total de 252 muestras ensayadas con el equipo 1, de las cuales en 245 existió correlación entre los resultados obtenidos en suero y en TMO, lo cual arroja los siguientes parámetros: S 98%; E 97%; VPP 95% y VPN 99%. Es de interés hacer notar que las dos muestras que dieron resultado positivo en suero y negativo en TMO correspondieron a pacientes que habían recibido tratamiento parasiticida.

En la Tabla II se observan los resultados en 188 muestras ensayadas con el segundo equipo. En este caso, 178 resultaron concordantes, por lo cual la S fue 98%, la E 97%, el VPP 95% y VPN 99%. De las tres muestras negativas en TMO con positividad en suero, dos correspondieron a los pacientes tratados.

Con el equipo 3 se analizaron 140 muestras apareadas de suero y de TMO, con los siguientes resultados (Tabla III) S 94%, E 98%, VPP 96% y VPN 97%.

Tabla I. Correlación entre resultados en suero y en TMO empleando ELISA para Chagas (Equipo 1).

		Resultados en suero	
		+	-
Resultados en TMO	+	87	5
	-	2 *	158

\* Estos pacientes habían recibido tratamiento parasiticida.

Tabla II. Correlación entre resultados en suero y en TMO empleando ELISA para Chagas (Equipo 2)

		Resultados en suero	
		+	-
Resultados en TMO	+	58	7
	-	3 *	120

\* Dos de estos pacientes habían recibido tratamiento parasiticida.

Tabla III. Correlación entre resultados en suero y en TMO empleando ELISA para Chagas (Equipo 3)

		Resultados en suero	
		+	-
Resultados en TMO	+	50	2
	-	3	85

Cuando se efectuó un estudio de campo, realizando tomas de muestra en un hospital rural, en niños de hasta 14 años de edad, simultáneamente con punción capilar y recolección de TMO los resultados fueron los siguientes (Tabla IV). Como se puede observar, existió una correlación del 100% en ambos materiales biológicos, detectándose anticuerpos contra *T. cruzi*, tanto en sangre capilar conservada en glicerina como en TMO, en 2 de 85 niños estudiados (2,4%). Con otro de los equipos empleados, existió también una elevada correlación en los resultados obtenidos (Tabla V). En este caso, existieron 3 muestras discordantes, todas ellas positivas con TMO y negativas en sangre glicerinada.

Tabla IV. Correlación entre resultados de ELISA para Chagas en sangre capilar, obtenida con conservante (Serokit) y en TMO (Equipo 1)

		Resultados en Serokit	
		+	-
Resultados en TMO	+	2	0
	-	0	83

Tabla V. Correlación entre resultados de ELISA para Chagas en sangre capilar, obtenida con conservante (Serokit), y en TMO (Equipo 2)

		Resultados en Serokit	
		+	-
Resultados en TMO	+	2	3
	-	0	80

### SEROLOGÍA PARA TOXOPLASMOSIS

Se realizó un total de 120 determinaciones. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla VI. Existió correlación en 118 muestras estudiadas. No se observa-

Tabla VI. Correlación entre resultados en suero y en TMO empleando ELISA para toxoplasmosis

		Resultados en suero	
		+	-
Resultados en TMO	+	38	0
	-	2	80

ron resultados falsos positivos y sólo 2 resultados falsos negativos, lo cual arroja los siguientes valores en los parámetros estudiados. Sensibilidad 95%, Especificidad 100%, VPP 100% y VPN 98%. Es de interés destacar que las dos pacientes con resultados positivos en suero y negativos en TMO presentaron títulos en el límite de corte por IFI y HAI, sin significado clínico.

### Discusión

Es permanente el interés por obtener muestras biológicas por métodos no invasivos, fundamentalmente para fines epidemiológicos, por razones de bioseguridad y grado de aceptación entre los sujetos de la población en estudio. La dificultad esencial en la utilización de fluidos como orina o saliva es la baja concentración de IgG presente en las mismas. De hecho, en orina la concentración de IgG es aproximadamente 10.000 veces menor que en plasma, y en saliva 800 veces menor (4). Por el contrario, el fluido gingival tiene un nivel de inmunoglobulinas marcadamente superior al encontrado en saliva. Ello lo convierte en un material biológico adecuado para la detección de anticuerpos, en la investigación de enfermedades infecciosas (10) (11), fundamentalmente cuando la obtención de sangre no es posible o resulta dificultosa. La utilización de este tipo de material puede ser muy útil en el campo, con fines epidemiológicos, en niños en los cuales la extracción de sangre resulta especialmente traumática, así como en individuos inmunosuprimidos o con dificultades en la coagulación.

En el presente trabajo se observó una elevada correlación entre los resultados alcanzados en TMO respecto a los obtenidos en suero. En efecto, con dos de los tres equipos comerciales ensayados, en pacientes chagásicos que no recibieron tratamiento parasiticida se obtuvo una sensibilidad del 100%. La importancia de analizar tres equipos comerciales radica en la comprobación de que los resultados obtenidos no dependen de la utilización de un equipo particular.

Cuando se compararon los resultados entre TMO y sangre total conservada con glicerina también se obtuvo una excelente correlación, con los dos equipos utilizados. Estos resultados son de interés por cuanto la sangre conservada en glicerina es ampliamente utilizada en la actualidad para *screenings* serológicos, fundamentalmente para estudio de la infección chagásica en niños. Es necesario destacar que en estudios epidemiológicos es imprescindible lograr elevada S y VPN, lo cual fue observado en este trabajo con el TMO, ya que se trata de métodos de tamizaje, donde los resultados positivos deben ser confirmados por técnicas de referencia.

Cuando se investigaron anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en embarazadas se obtuvieron resultados simi-

lares. Además, en ensayos preliminares, se pudo observar que, en 9 neonatos, el resultado fue concordante con ambos materiales biológicos (6 positivos y 3 negativos). Asimismo, existió correlación con los resultados obtenidos en las madres de los recién nacidos (datos no presentados). Ninguno de estos niños presentó infección congénita, de lo cual se deduce que los anticuerpos detectados fueron inmunoglobulinas maternas transferidas vía transplacentaria. Estos resultados, que deberán ser corroborados con mayor número de muestras, sugieren que este método también podría ser utilizado en neonatos y lactantes, como fuente de muestras para *screening* de infecciones de transmisión vertical (Toxoplasmosis, Chagas, Hepatitis, Rubeola, CMV, HIV, etc.)

La elevada sensibilidad y especificidad, como así también la facilidad de obtención y conservación de las muestras de TMO indican que este material biológico podría ser una alternativa adecuada para estudios seroepidemiológicos, en concordancia con lo descripto para otras infecciones (4) (6) (9-11). Asimismo, últimamente se ha preconizado la utilización del TMO para dosaje de drogas (12), para conocer el estado de activación inmune de pacientes (13), la tipificación de anticuerpos (14) y, en trabajos recientes, se sugiere su utilización para la realización de técnicas de biología molecular como PCR (15). Esto amplía el horizonte de aplicación de este tipo de material biológico.

Como datos cualitativos adicionales, el método de extracción no invasivo tuvo excelente aceptación entre los pacientes y sus padres, cuando se trató de niños, y las muestras conservaron su reactividad, por lo menos, durante 90 días a 4 °C y durante más de 1 año a - 20 °C.

En conclusión, en el presente trabajo se ha demostrado la utilidad del empleo del trasudado mucoso oral como material biológico para la detección de anticuerpos en una enfermedad parasitaria de elevada prevalencia como la Toxoplasmosis y en una endemia de gran trascendencia sanitaria como la Enfermedad de Chagas, incluyendo la realización de ensayos de campo, en las mismas condiciones que las empleadas para los estudios seroepidemiológicos convencionales.

#### CORRESPONDENCIA:

Dr. EDGARDO MORETTI.  
Güemes 383.  
5000 CÓRDOBA.  
Argentina.  
E-mail: ebi@fcm.unc.edu.ar.

#### Referencias bibliográficas

1. Cuffini CG, Cordoba P, Grutadauria SL, Zapata MT. Detection of rubella antibodies in blood samples collected on filter paper. *Rev Argent Microbiol* 1997; 29 (2): 84-91.
2. Zicker F, Smith PG, Luquetti AO, Oliveira OS. Mass screening for *Trypanosoma cruzi* infections using the immunofluorescence, ELISA and haemagglutination tests on serum samples and on blood eluates from filter-paper. *Bull World Health Organ* 1990; 68 (4): 465-71.
3. Van den Akker R, Van den Hoek JA, Van den Akker WM, Kooy H, Vijge E, Roosendaal G, et al. Detection of HIV antibodies in saliva as a tool for epidemiological studies. *AIDS* 1992; 6: 953-7.
4. Holm-Hansen C, Constantine NT, Haukenes G. Detection of antibodies to HIV in homologous sets of plasma, urine and oral mucosal transudate samples using rapid assays in Tanzania. *Clin Diag Virology* 1993; 1: 207-14.
5. George JR, Fitchen JH. Future applications of oral fluid specimen technology. *Am J Med* 1997; 102: 21-5.
6. Thieme T, Yoshiara P, Piacentini S, Beller M. Clinical evaluation of oral fluid sample for diagnosis of viral hepatitis. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1076-9.
7. Zmuda JF, Wagoneer B, Liotta L, Whiteley G. Recognition of multiple classes of hepatitis C antibodies increases detection sensitivity in oral fluid. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8 (6): 1267-70.
8. Gallo D, George JR, Fitchen JH, Goldstein QS, Hindahl M. Evaluation of a system using oral mucosal transudate for HIV-1 antibody screening and confirmatory testing. *Orasure HIV Clinical Trials Group. JAMA* 1997; 277: 254-8.
9. Thieme T, Piacentini S, Davidson S, Steingart K. Determination of measles, mumps, and rubella immunization status using oral fluid samples *JAMA* 1994. 20; 272 (3): 219-21.
10. Nokes DJ, Enquelasie F, Nigatu W, Vyse AJ, Cohen BJ, Brown DW, et al. Has oral fluid the potential to replace serum for the evaluation of population immunity levels? A study of measles, rubella and hepatitis B in rural Ethiopia. *Bull World Health Organ* 2001; 79 (7): 588-95.
11. Vyse AJ, Cohen BJ, Ramsay ME. A comparison of oral fluid collection devices for use in the surveillance of virus diseases in children. *Public Health* 2001; 115 (3): 201-7.
12. Holden WE, Bartos F, Thieme T, Green TR, Fitchen JH. Theophylline in oral mucosal transudate. A practical method for monitoring outpatient therapy. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 739-43.
13. Nishanian P, Aziz N, Chung J, Detels R, Fahey JL. Oral fluids as an alternative to serum for measurement of markers of immune activation. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998; 5: 507-12.
14. Akingbade D, Cohen BJ, Brown DW. Detection of low-avidity Immunoglobulin G in oral fluid samples: new approach for rubella diagnosis and surveillance. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10 (1): 189-90.
15. Jin L, Vyse A, Brown DW. The role of RT-PCR assay of oral fluid for diagnosis and surveillance of measles, mumps and rubella. *Bull World Health Organ* 2002; 80 (1): 76-7.

Aceptado para su publicación el 23 de marzo de 2004