

## COMPARACIÓN DE TRES MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA LA DETECCIÓN DE ROTAVIRUS EN HECES DE NIÑOS DIARREICOS

SONIA Y. NUSETTI P.<sup>1</sup>, ANTONIO J. MALDONADO N.<sup>2</sup> Y JESÚS W. BASTARDO G.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioanálisis, Universidad de oriente, Núcleo de Sucre, Cumaná, Estado Sucre, Venezuela.

<sup>2</sup> Postgrado en Biología Aplicada, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumaná, Estado Sucre, Venezuela.

### RESUMEN

Para encontrar un método diagnóstico de Rotavirus asequible a laboratorios clínicos pequeños, se compararon dos inmunoensayos enzimáticos y un método de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). Se comparó la sensibilidad de los métodos entre sí, y la especificidad se determinó por microscopía electrónica de transmisión (MET) como método de referencia. Las tres técnicas resultaron con una sensibilidad del 100%, sin embargo, PAGE tuvo la mayor especificidad (100%), seguido por ELISA no comercial (96%) y por último la ELISA comercial con un (79%). La prueba de PAGE resultó ser la más ventajosa por tener una alta sensibilidad y especificidad de detección de rotavirus, se puede realizar en un tiempo relativamente corto y resulta mucho más económica, a diferencia de las ELISA que cada día elevan sus costos en el comercio.

PALABRAS CLAVES: Rotavirus, ELISA, electroforesis.

### ABSTRACT

A commercial and a non commercial branded enzyme linked immunoabsorbent assays (ELISA) and a polyacrylamide gel electrophoretic assay (PAGE) for detecting human rotavirus from feces, were compared for determining their sensitivity and specificity as criteria to find a reliable analysis of human rotavirus in a basic clinical laboratory. Transmission electron microscope (TEM) was used as reference method to test the specificity of the assays. All the tested assay displayed 100% sensitivity, however PAGE showed 100% specificity followed in a decreasing order by the non commercial (96%) and commercial (79%) ELISA methods. The PAGE assay showed a better sensitivity and specificity than the ELISAs tested and demonstrated to be a most effective, low cost and rapid system for diagnosis of human rotavirus.

KEY WORDS: Rotavirus, ELISA, electrophoresis.

### INTRODUCCION

Los rotavirus humanos (RVH) son los principales agentes etiológicos de gastroenteritis aguda en infantes y niños jóvenes en países desarrollados y en vías de desarrollo (Kapikian and Chanock, 1996). En muchos países del mundo, la gastroenteritis infantil es la primera causa de muerte entre los niños de cero a cinco años de edad (Bastardo, 1993). Los rotavirus tienen una estructura icosaédrica 5-3-2 formadas por tres capas proteicas que rodean el genoma viral (Estes, 1996). El genoma está compuesto de 11 segmentos de ARN de doble cadena, cada segmento actúa como un gen individual que dirige la síntesis de una proteína. Las proteínas más importantes que forman parte de la estructura viral son la VP4, VP6, VP7 por estar asociadas a la estructura antigénica de estos virus. La VP6 es la que determina la especificidad de grupos (A hasta la G) y subgrupos (SG-1 y SG-2) (Kalica *et al.* 1981). Los rotavirus del grupo A y los subgrupos G1 y G2 tienen mayor importancia

epidemiológica, por ser reconocidos como los responsables más frecuentes de cuadros diarreicos agudos en niños de distintas partes del mundo (Pérez *et al.* 1991; Kapikian and Chanock, 1996; Maldonado y Bastardo, 1998).

Numerosas técnicas se han desarrollado para el diagnóstico de rotavirus humano (RVH), siendo las más usuales las siguientes: Microscopía Electrónica (ME) (Bishop *et al.* 1974), Inmunoensayos Enzimáticos (ELISA) (Yolken *et al.* 1977), Radioinmunoensayos (RIA) (Middleton *et al.* 1977) y Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (PAGE) (Espejo *et al.* 1977). En la microscopía electrónica (ME), la tinción negativa es la más utilizada, tanto así que se ha empleado como método estándar para evaluar otros métodos en la detección de rotavirus (Knisley *et al.* 1986).

La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) se fundamenta en la separación electroforética de los segmentos del ARN del virión, el cual fue introducido por Espejo *et al.* (1977), y utiliza el procedimiento descrito por Laemmli (1970). Sulbarán (Tesis de pregrado, 1996 Univer-

Recibido: Abril 2000. Aprobado: Febrero 2001.

sidad de Oriente, Cumaná, Venezuela) desarrolló un método rápido de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), el cual no necesita de equipos sofisticados, resultando mucho más económico que las pruebas de ELISA y MET. Además, es confiable e informativo para el diagnóstico de la enfermedad rotaviral.

Los inmunoensayos enzimáticos (ELISA), son altamente sensibles y se han utilizado con mucho éxito como alternativa en el diagnóstico de infección por rotavirus (Yolken *et al.* 1977), pero la adquisición de los "Kits" son de elevado costo en el comercio como para ensayos de rutina.

Para encontrar un método asequible a los pequeños laboratorios se comparó un inmunoensayo enzimático disponible en el comercio, con uno no comercial, y el método de electroforesis PAGE propuesto por Sulbarán, (Tesis de pregrado, 1996 Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela), para determinar la sensibilidad de los métodos entre sí; la especificidad diagnóstica fue determinada por medio de la microscopía electrónica de transmisión como método de referencia.

## MATERIALES Y METODOS

**Muestras Fecales:** Se colectaron 30 muestras fecales de niños menores de cinco años de edad con diarrea aguda, recluidos en la sala de rehidratación del Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá" de Cumaná, conservándolas congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su uso.

**Ensayo Inmunoenzimático Rotazyme II:** (Abbott Laboratories, Diagnostic Division, Texas, USA). Como anticuerpo de captura se utilizó una esfera recubierta de suero anti-rotavirus de cobayo que contiene anticuerpos policlonales. Como conjugado se utilizó anticuerpos anti-rotavirus de conejo conjugado con peroxidasa. Las lecturas se realizaron en un Espectronic Quantum II a una longitud de onda de 492 nm. El inmunoensayo se desarrolló en tres horas.

**Ensayo Inmunoenzimático no comercial:** Se utilizó un suero preinmune y un suero hiperinmune de conejo anti-rotavirus como anticuerpo de captura (1:600). Como segundo anticuerpo se utilizó un anticuerpo monoclonal 4B2D2 (suministrado por el Dr. Liprandi, IVIC), producido en ratón, dirigido contra el antígeno común de grupo A (VP6) de los rotavirus. Como conjugado se utilizó inmunoglobulina anti-ratón marcada con peroxidasa (1:300). Las lecturas se realizaron en un microlector de ELISA (Labsystem Uniskan I) a una longitud de onda de 492 nm. La técnica se desarrolló en trece horas.

**Electroforesis en Geles de Poliacrilamida (PAGE):** Se utilizó el método de electroforesis de ARN rotaviral propuesto por Sulbarán (Tesis de pregrado, 1996 Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela). La extracción del ARN viral se realizó con fenol cloroformo y acetato de sodio 0,1 M con SDS 1% (Herring *et al.* 1982), seguida de una concentración con etanol frío (Sambrook *et al.* 1989). La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida al 5% (Chudzio *et al.* 1989), siguiendo el procedimiento descrito por Laemmli (1970). Las corridas electroforéticas se realizaron a 40 mA por 4 a 5 horas a temperatura ambiente y por último se utilizó la tinción de nitrato de plata (12 mM) descrita por Herring *et al.* (1882), para visualizar las bandas de ARN en el gel. La ejecución del método tuvo una duración de catorce horas.

**Microscopía Electrónica de Transmisión (MET):** Las suspensiones fecales se colocaron en una rejilla de cobre (400 mesh) cubierta por Formvar impregnada de carbón. Las partículas virales adheridas a la rejilla fueron teñidas negativamente con ácido fosfotúngstico 2%. Luego se examinaron en MET Hitachi H-600 (60.000 a 80.000 X). Las heces fueron consideradas negativas cuando ninguna partícula viral fue detectada en los diversos campos de la rejilla.

**Análisis Estadístico:** La sensibilidad de los distintos métodos de diagnóstico fue comparada a través del análisis estadístico del "Chi cuadrado" ( $X^2$ ) (Steel and Torrie, 1980).

## RESULTADOS

De las 30 muestras 11 (36,7%) dieron positivas por la ELISA Rotazyme II, 8 (26,7%) por ELISA no comercial, 7 (23,3%) dieron positivas por PAGE, y 7 (23,3%) positivas por MET; sin embargo, de acuerdo al análisis estadístico "Chi cuadrado" no hubo diferencia significativa en el número de muestras positivas obtenidas mediante los diferentes métodos ( $p > 0,05$ ).

La Microscopía Electrónica de Transmisión, permitió observar 7 muestras positivas a rotavirus que también resultaron positivas por los demás métodos utilizados en el estudio, lo que garantiza que estas muestras son realmente positivas a RVH. Por PAGE se obtuvo 7 muestras rotapositivas que mostraron el patrón típico de ARN de los rotavirus grupo A en el gel, éstas fueron las mismas que resultaron positivas por MET. En la ELISA Rotazyme II resultaron 11 muestras positivas, de las cuales 4 se consideraron como falsos positivos. Con la ELISA no comercial se obtuvieron 8 muestras positivas de las cuales 7 fueron las mismas positivas por MET y PAGE (Tabla 1).

TABLA 1. Comparación de sensibilidad y especificidad de los tres métodos en la detección de rotavirus.

| Métodos            | Total Muestras | Verdaderos Positivos | Verdaderos Negativos | Falsos Positivos | Falsos Negativos | S <sup>2</sup> | E <sup>3</sup> |
|--------------------|----------------|----------------------|----------------------|------------------|------------------|----------------|----------------|
| PAGE               | 30             | 7                    | 23                   | 0                | 0                | 100%           | 100%           |
| ELISA <sup>1</sup> | 30             | 7                    | 22                   | 1                | 0                | 100%           | 96%            |
| ROTAZYME           | 30             | 7                    | 19                   | 4                | 0                | 100%           | 79%            |

<sup>1</sup>No comercial

<sup>2</sup>Sensibilidad

<sup>3</sup>Especificidad

Las pruebas de ELISA (Rotazyme II y no comercial) y la técnica de PAGE resultaron tener una alta sensibilidad (100%), pero en la especificidad, PAGE resultó ser la mejor con un (100%) al comparársele con el método de referencia (MET). La especificidad del ELISA no comercial (96%) estuvo por encima de Rotazyme II (79%), debido a que esta última resultó tener mayor número de posibles falsos positivos (Tabla 1).

### DISCUSION

Las pruebas de ELISA y PAGE mostraron una sensibilidad del 100%, pero la prueba de ELISA Rotazyme II resultó con mayor número de falsos positivos disminuyendo su especificidad a 79%. Resultados muy similares fueron señalados por Dennehy *et al.* (1988) y Thomas *et al.* (1989), quienes observaron que Rotazyme II mostraba mayor número de falsos positivos en comparación con otras ELISAS, lo cual se atribuye a la utilización de anticuerpos policlonales dirigidos contra múltiples determinantes antigénicos con un elevado rango de afinidades, lo que puede generar reacciones cruzadas con otros componentes de la muestra, resultando falsos positivos.

La ELISA no comercial emplea anticuerpos monoclonales de captura dirigidos directamente contra un determinante antigénico de los rotavirus, en este caso contra el antígeno común de grupo (VP6) con una elevada afinidad, lo que explica la mayor especificidad de esta técnica en comparación con Rotazyme II. El empleo de anticuerpos monoclonales en pruebas de ELISA garantiza una elevada especificidad, y por ende una mayor sensibilidad en comparación con los demás métodos serológicos, porque disminuye el riesgo de reacciones con otros componentes de la muestra fecal; por tal razón, la muestra por esta técnica que no fue confirmada por MET podría estar indicando una mayor sensibilidad de ese ensayo inmunoenzimático y no realmente un falso positivo. Es

más, ELISA podría detectar la presencia de antígenos en las heces resultantes de la ruptura de la partícula viral, que serían muy difícil detectar por MET.

En el momento de escoger una técnica se toma en cuenta su mayor sensibilidad, especificidad, economía, simplicidad y tiempo de realización. Rotazyme II es sensible, se realiza en menor tiempo, se pueden analizar de 20 a 40 muestras en un mismo ensayo, pero tiene la desventaja que es mucho más costosa y además sus resultados registran más falsos positivos que otros procedimientos similares (Dennehy *et al.* 1988; Doern *et al.* 1985; Thomas *et al.* 1988). La ELISA no comercial se realiza en mayor tiempo, pero es sensible, específica, económica, más sencilla de realizar en comparación con PAGE y puede analizar de 20 a 60 muestras en un ensayo.

PAGE resultó sensible, tuvo la mayor especificidad, permite analizar de 20 a 40 muestras simultáneamente, y tiene la ventaja sobre las pruebas de ELISA que, además de servir como método de diagnóstico en un laboratorio clínico, puede proveer información epidemiológica de la diseminación de los diversos grupos de rotavirus en la comunidad. La única desventaja es que los resultados se obtienen transcurrido mayor tiempo, pero para este problema han surgido soluciones como es el empleo de cámaras de electroforesis mucho más pequeñas, que reducen el tamaño del gel y con ello la cantidad de reactivos a utilizar, disminuyendo además el tiempo de corrida electroforética a 2,5 horas.

La prueba de PAGE descrita por Sulbarán (Tesis de pregrado, 1996 Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela), se considera una excelente alternativa para aquellos laboratorios que no disponen de suficientes recursos para la adquisición de la ELISA comercial, por ser un método sensible, específico, los resultados pueden obtenerse en un tiempo relativamente corto y resulta mucho más econó-

mica. Para adquirir los aparatos de electroforesis es preciso hacer una única inversión al comienzo, que durará por muchos años y la ganancia se obtiene a corto plazo. A diferencia de lo que ocurre con las pruebas inmunoenzimáticas comerciales, cuyos reactivos se hacen más costosos cada día y duran muy corto tiempo, lo cual aumenta considerablemente el costo de la prueba para el paciente.

### AGRADECIMIENTO

Al laboratorio de Virología Animal del Postgrado de Biología Aplicada y al Instituto de Biomedicina, por prestar su infraestructura, materiales y equipos.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASTARDO, J. 1993. Rotavirus y Gastroenteritis. Edit. Coordinación de Publicaciones del Rectorado de la Universidad de Oriente. Cumaná-Estado Sucre, Venezuela., pp. 210.
- BISHOP, R., DAVIDSON, G., HOLMES, I. AND RUCK, B. 1974. Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet* 1: 149-151.
- CHUDZIO, T., KASATIYA, S., IRVINE, N. AND SANKAR-MISTRY, P. 1989. Rapid screening test for the diagnosis of rotavirus infection. *J. Clin. Microbiol.* 27: 2394-2396.
- DENNEHY, P., GAUNTLETT, D. AND TENTE, W. 1988. Comparison of nine immunoassays for the detection of rotavirus in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 26: 1630-1634.
- DOREN, G., HERMANN, J., HENDERSON, P., STOBBS-WALRO, D., PERRON, D. AND BLACKLOW, N. 1985. Detection of rotavirus with a new polyclonal antibody enzyme immunoassay (Rotazyme II) and a commercial latex agglutination test (Rotalex): Comparison with monoclonal antibody enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 23: 226-229.
- ESPEJO, R., CALDERON, E. AND GONZÁLES, N. 1977. Distinct reovirus-like agents associated with acute infantile gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 6: 502-506.
- ESTES, M. 1996. Rotavirus and their replication. *Fields Virology*. Edited by B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, *et al.* pp. 1625-1655.
- HERRING, A., INGLIS, N., OJEH, C., SNODGRASS, D. AND MENZIES, J. 1982. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Clin. Microbiol.* 16: 473-477.
- KALIKA, A., GREENBERG, H., ESPEJO, R., FLORES, J., WYATT, R., KAPIKIAN, A. AND CHANOCK, R. 1981. Distinctive ribonucleic acid patterns of human rotavirus subgroups 1 and 2. *Infect. Immun.* 33: 958-961.
- KAPIKIAN, A., AND CHANOCK, R. 1996. Rotaviruses. In *Fields Virology*. Third edition. Edited by B.N. Fields, D.M. Knipe, Howley *et al.* Philadelphia, pp. 1657.
- KNISLEY, C., BEDNARZ-PRASHAD, A. AND PICKERING, L. 1986. Detection of rotavirus in stool specimens with monoclonal and polyclonal antibody-based assay systems. *J. Clin. Microbiol.* 23: 897-900.
- LAEMMLI, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage-T4. *Nature*. 227: 680-685.
- MALDONADO, A. y BASTARDO, J. 1998. Prevalencia de subgrupos, serotipos y electrotipos de rotavirus humano en Cumaná, Venezuela. *Invest. Clin.* 39: 39-51.
- MIDDLETON, P., HOLDAWAY, M., PETORE, M., SZYMASKY, M. AND TAM, J. 1977. Solid-phase radioimmunoassay for the detection of rotavirus. *Infect. Immun.* 16: 349-444.
- PÉREZ, I., ROJAS, A. Y FLORES, J. 1991. Desarrollo de una vacuna antirotavirus. Pruebas de campo en Venezuela. *Acta Cientif. Venez.* 42:269-312.
- SAMBROOK, J., FRITSTCH, E. AND MANIATIS, T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*, second Ed. Cold Spring Harbor laboratory, New York.
- STEEL, R. AND TORRIE, J. 1980. *Principles and procedures of statistic*. Second Ed. Mc Graw-Hill, INC. USA. pp. 58.
- THOMAS, E., PUTERMAN, M., KAWANO, E., AND CURRAN, M. 1988. Evaluation of seven immunoassays for detection of rotavirus in pediatric stool samples. *J. Clin. Microbiol.* 26: 1189-1193.
- Yolken, R., Kim, H., Clem, T., Wyatt, R., Kalica, A., Chanock, R. and Kapikian, A. 1977. Enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) for detection of human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. *Lancet*. 2: 236-266.