

COMPARACION DE LA ELECTROFORESIS DEL ARN VIRICO CON EL METODO ELISA INDIRECTO PARA EL DIAGNOSTICO DE INFECCION POR ROTAVIRUS HUMANO¹

Luis F. Avendaño,² Sylvia Dubinovsky² y Harvey D. James, Jr.³

Se comparó un método relativamente económico y de fácil aplicación para detectar rotavirus patógenos (electroforesis del ARN vírico) con el método ELISA indirecto, utilizando para ello muestras fecales de 177 niños chilenos menores de dos años.

Introducción

Se ha estimado que aproximadamente 420 000 niños menores de cinco años mueren cada año en América Latina, y que la mayor parte de las víctimas tiene menos de un año de edad (1). El síndrome diarreico es responsable de 75 729 de estas muertes; las cifras de frecuencia de diarrea que se han comunicado han sido relativamente bajas (del orden de 250 000 casos por año) a causa de las deficiencias de registro estadístico que imperan en algunos países. No obstante, incluso estas cifras son suficientes para brindar cierta idea de la importancia de este problema de salud (2).

En Chile se ha demostrado que es posible aislar los probables agentes que causan diarrea infantil (bacterias, parásitos o virus) en aproximadamente el 60% de los casos; sin embargo, aun cuando se apliquen modernas técnicas de diagnóstico, en un porcentaje importante de casos la etiología permanece sin determinar (3). Esta circunstancia ha hecho que se conceda una gran importancia a las técnicas para diagnosticar rotavirus; estos virus se han identificado cada vez con mayor frecuencia como uno de los principales agentes productores de diarreas desde que en 1973 la microscopía electrónica los detectó en biopsias intestinales de niños con síndrome diarreico (4). A partir de ese momento, numerosas publicaciones han demostrado que existe una clara correlación entre la presencia de rotavirus y de diarrea en porcentajes que van del 30 al 80% de los casos, dependiendo de las condiciones del estudio (4-7). En general, como resultado de estas investigaciones, se ha podido designar al rotavirus como el agente etiológico único que se encuentra con mayor frecuencia asociado a la diarrea infantil transmisible.

¹ El trabajo que se presenta en este artículo recibió el apoyo parcial del Proyecto M 1625-831-2 de la Dirección General Académica, Departamento de Desarrollo de la Investigación, Universidad de Chile, Santiago, Chile. Este artículo se publica en inglés en el *Bulletin of the Pan American Health Organization*, 1984.

² Universidad de Chile, División de Ciencias Médicas (Norte), Facultad de Medicina, Departamento de Microbiología y Parasitología, Sección de Virología. Dirección postal: Casilla 9183, Correo Central, Santiago, Chile.

³ Institutos Nacionales de Salud, Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas, Laboratorios de Enfermedades Infecciosas, Bethesda, Maryland, EUA.

La diarrea por rotavirus se puede diagnosticar con suma precisión mediante la microscopía electrónica; sin embargo, el costo del equipo necesario y de la tecnología relacionada limita la capacidad de aplicar este método normalmente en la práctica diaria. En consecuencia, a fin de permitir la detección y el estudio de estos virus en los laboratorios clínicos o de investigación comunes, se han ideado varios procedimientos alternativos (8, 9).

Uno de estos procedimientos, la electroforesis del ARN vírico en geles de agarosa puesto en práctica por Espejo *et al.* (10), se basa en el hecho de que el ácido nucleico del rotavirus está formado por ARN de doble hebra fraccionado en 11 segmentos los cuales poseen patrones característicos de migración electroforética. Se trata de un método de diagnóstico económico, sencillo y altamente específico, cuya sensibilidad todavía no se ha determinado bien.

Otro procedimiento, el ensayo inmunosorbente enzima conjugada (ELISA), que se basa en reacciones antígeno-anticuerpo, representa un método semejante al radioinmunoensayo en sensibilidad, pero más económico y sencillo; este método en general es aceptado por los centros científicos como un buen procedimiento de diagnóstico de rotavirus (8, 9, 11). Sin embargo, presenta ciertos problemas, tales como la generación de resultados falsos positivos y las dificultades para preparar localmente los reactivos necesarios. El problema de resultados falsos positivos no específicos es importante sobre todo cuando se usan las pruebas de diagnóstico disponibles comercialmente que utilizan el método ELISA directo (12), ya que estas no incluyen controles destinados a reducir las lecturas positivas no específicas; así, el empleo de este método en la investigación clínica o científica no es aceptado universalmente. Por el contrario, el ELISA indirecto, utilizado por los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos de

América, incluye el examen de las muestras con suero caprino preinmune y postinmune (hiperinmune) con objeto de reducir este problema al mínimo. El propósito del presente trabajo consistió en comparar los resultados obtenidos con la electroforesis del ARN vírico en geles de agarosa, con los obtenidos mediante el método ELISA indirecto, con el fin de evaluar la capacidad del primer método para detectar rotavirus en muestras fecales.

Materiales y métodos

La detección del rotavirus mediante las dos técnicas se comparó analizando por una parte 50 muestras fecales obtenidas al azar, procedentes de 50 pacientes menores de dos años, ambulatorios y hospitalizados, que presentaban diarrea aguda. Los pacientes habían sido admitidos en la Unidad Infantil del Hospital Roberto del Río o estaban siendo tratados en consultorios externos en el Area Norte de Salud de Santiago. Por otra parte, las dos técnicas también se utilizaron en el estudio de 127 muestras fecales procedentes de 42 pacientes del mismo grupo de edad, internados en dicho hospital, que presentaban síndrome diarreico prolongado (13). Posteriormente se evaluaron los resultados de estas 127 muestras desde dos puntos de vista: como muestras individuales (sin considerar el paciente del cual procedían) y como especímenes seriados de 42 pacientes.

La electroforesis del ARN vírico en geles de agarosa se efectuó de acuerdo con la técnica descrita por Espejo *et al.* (10). Se consideraron positivos todos aquellos casos en que se observaron por lo menos las primeras cuatro de las nueve bandas de migración características del ARN del rotavirus.

La prueba de ELISA indirecta se llevó a cabo en los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos (8, 11) empleando

el sistema de suero preinmune y postinmune (suero caprino preinmune e hiperinmune al rotavirus humano). Los resultados, obtenidos mediante fotocolorimetrías, se consideraron positivos si la lectura con el suero hiperinmune era por lo menos el doble de la obtenida con el suero preinmune. Las muestras que dieron resultados inespecíficos altos se diluyeron a la décima parte y se volvieron a someter a prueba.

Resultados

De las 50 muestras fecales procedentes de niños con diarrea aguda 18 (36%) resultaron positivas después de la prueba para la detección de rotavirus mediante el método electroforético y 23 (46%) dieron resultados positivos con el método ELISA indirecto (cuadro 1). Todas las muestras que dieron resultados negativos con el método ELISA también produjeron resultados negativos con la electroforesis, aunque cinco muestras dieron resultados negativos con la electroforesis y positivos con el método ELISA indirecto. En consecuencia, la diferencia neta entre los dos conjuntos de resultados fue del 10%. Si los resultados obtenidos con el método ELISA se utilizan como referencia, el método electroforético mostró una sensibilidad de 78% y una especificidad de 100%.

Los resultados obtenidos en las 127 muestras fecales de los pacientes con

diarrea prolongada fueron bastante semejantes (cuadro 2). En efecto, 32 (25%) de las muestras dieron resultados positivos con el método electroforético y 48 (38%) con el método ELISA indirecto; la diferencia en el nivel de resultados positivos fue de 13%. Tres muestras que dieron resultados negativos con el método ELISA fueron positivas con la electroforesis y 19 muestras que dieron resultados negativos con la electroforesis produjeron resultados positivos por ELISA. Por lo tanto, la sensibilidad indicada del método electroforético fue de 63%, mientras que la del método ELISA fue de 94%.

Si estos resultados obtenidos con muestras de pacientes con diarrea prolongada se evalúan en función de pacientes individuales (todos los cuales suministraron por lo menos dos especímenes consecutivos), se observa que en 12 (29%) de los 42 pacientes se obtuvieron resultados positivos por el método electroforético, y en 17 (40%) los resultados fueron positivos por ELISA; la diferencia en el nivel de resultados positivos fue de 11% (cuadro 3). En dos pacientes se obtuvieron resultados negativos por ELISA y resultados positivos con la electroforesis; en siete pacientes se encontraron resultados negativos con la electroforesis y se obtuvieron resultados positivos con el método ELISA. Así pues, la sensibilidad del método electroforético fue de 63%, mientras que la del método ELISA fue de 90%.

CUADRO 1—Resultados obtenidos con 50 muestras fecales de pacientes con diarrea aguda. La respuesta (positiva o negativa respecto al rotavirus) de cada muestra con los métodos de electroforesis del ARN vírico y ELISA indirecto fue como se muestra en el cuadro.

	ELISA (+)	ELISA (-)	Total	
EF ARN v (+)	18	0	18 (36%)	
EF ARN v (-)	5	27	32 (64%)	
Total	23 (46%)	27 (54%)	50 (100%)	

$$\chi^2 = 3.2; 0.10 > p > 0.05.$$

CUADRO 2—Resultados obtenidos con 127 muestras fecales de 42 pacientes con diarrea prolongada. La respuesta (positiva o negativa respecto al rotavirus) de cada muestra con los métodos de electroforesis del ARN vírico y ELISA indirecto fue como se muestra en el cuadro.

	ELISA (+)	ELISA (-)	Total	
EF ARN v (+)	29	3	32 (25%)	
EF ARN v (-)	19	76	95 (75%)	
Total	48 (38%)	79 (62%)	127 (100%)	

$$\chi^2 = 10.2; 0.01 > p > 0.001.$$

CUADRO 3—Resultados obtenidos con 127 muestras de 42 casos de diarrea prolongada en función de los diagnósticos de los pacientes. El número de pacientes que de acuerdo con cada uno de los dos métodos de prueba presentó rotavirus en las heces fue como se indica en el cuadro.

	ELISA (+)	ELISA (-)	Total
EF ARN v (+)	10	2	12 (29%)
EF ARN v (-)	7	23	30 (71%)
Total	17 (40%)	25 (60%)	42 (100%)

$$\chi^2 = 1,7; 0,20 > p > 0,10.$$

Discusión

En el presente estudio se observa que el método ELISA indirecto detecta aproximadamente un 10% más de infecciones por rotavirus que la técnica de electroforesis del ARN vírico. Es probable que la diferencia se deba al hecho de que el método electroforético empleado requiere una alta concentración de virus (alrededor de 10^7 y 10^{10} partículas de virus por gramo de heces para dar un resultado positivo (10). Por el contrario, el método ELISA necesita una concentración menor de rotavirus y parece probable que el anticuerpo específico reaccione no solo con partículas víricas completas, sino también con fragmentos o componentes del rotavirus. Quizá estas circunstancias, consideradas en su conjunto, expliquen la mayor sensibilidad del segundo método (9).

El análisis de la información presentada en los cuadros 1, 2 y 3 demuestra que el método electroforético fue menos sensible que el método ELISA. No se calcula el valor positivo predictivo ya que una de las principales características del método electroforético empleado es su gran especificidad, que tiende a evitar la obtención de resultados falsos positivos.

En Chile, el empleo de esta técnica de electroforesis del ácido nucleico vírico, ha hecho posible la detección de rotavirus en aproximadamente el 30% de los niños lactantes hospitalizados por diarrea agu-

da durante todo el año; por otra parte, no ha dado resultados positivos en los controles sin diarrea (14, 15). Estos resultados han demostrado que el rotavirus es uno de los agentes etiológicos más importantes del síndrome diarreico en Chile. Asimismo, si bien los resultados demuestran que esta técnica es menos sensible que el método ELISA indirecto, su gran especificidad, facilidad de aplicación y bajo costo, en comparación con el método ELISA (para el cual en la actualidad resulta difícil obtener los reactivos), convierten a la electroforesis del ARN vírico en un método alternativo sumamente útil para estudios clínicos y epidemiológicos de infección por rotavirus. Además, el empleo de una técnica modificada de la electroforesis del ARN vírico podría suministrar más información acerca del patrón electroforético del genoma del rotavirus, haciendo posible establecer correlaciones clínicas y epidemiológicas con las variantes de rotavirus que se han descrito (16, 17).

Por último, el empleo de técnicas de diagnóstico muy sensibles tales como el método ELISA que se utilizó en este estudio ha ayudado a destacar la importante función patógena que desempeña el rotavirus en las diarreas infantiles y, por ende, ha demostrado la necesidad de contar con otras técnicas de diagnóstico relativamente sencillas, que se puedan incluir como procedimientos normales en laboratorios de centros médicos asistenciales en los países en desarrollo. En consecuencia, a pesar de la menor sensibilidad de la técnica de la electroforesis del ARN vírico, los autores piensan que constituye un instrumento muy útil para estudiar las infecciones por rotavirus.

Resumen

Un total de 177 muestras fecales procedentes de pacientes chilenos menores de dos años de edad que presentaban dia-

rea se estudiaron para detectar la presencia de rotavirus por medio de dos métodos: el ensayo inmunosorbente enzima conjugada indirecto (ELISA indirecto) y la electroforesis del ARN vírico en geles de agarosa. Del total de muestras 50 procedían de pacientes con diarrea aguda y 127 de pacientes con diarrea prolongada. Con el método de electroforesis se detectó rotavirus en el 36% de las muestras de pacientes con diarrea aguda y en el 25% de las muestras de pacientes con diarrea prolongada, mientras que con el método ELISA indirecto se detectó rotavirus en un porcentaje más alto: 46 y 38% respectivamente. Estos resultados respaldan la conclusión de que la electroforesis del ARN vírico es un método menos sensible para detectar rotavirus que el método ELISA indirecto; no obstante, la gran especificidad, facilidad de aplicación y bajo costo del primer

método lo convierten en una alternativa valiosa del método ELISA indirecto. En consecuencia, si se tiene en cuenta la importante función que desempeña el rotavirus en la diarrea infantil y la necesidad de contar con una técnica de diagnóstico que se pueda incluir como procedimiento normal en laboratorios de centros médicos asistenciales en los países en desarrollo, existen buenas razones para afirmar que la electroforesis del ARN vírico constituye un instrumento útil para estudiar la diarrea causada por rotavirus. ■

Agradecimiento

Los autores agradecen la ayuda clínica brindada por los doctores Gastón Duffau, Marcos Emilfork y Aquiles Calderón; el apoyo técnico del Dr. Albert Z. Kapikian y la colaboración en el campo de la estadística del Dr. Néstor Montecinos.

REFERENCIAS

1. Organización Panamericana de la Salud. *Las condiciones de salud en las Américas, 1977-1980*. Washington, D.C., 1982. (Publicación Científica 427.)
2. Soriano, H. y Macaya, J. Síndrome diarreico agudo. In: Meneghello, J. *Pediatría*. 2 ed. Buenos Aires, Intermédica, 1978. pp. 1040-1065.
3. Duffau, G. *Síndrome diarreico agudo del lactante*. Santiago, Editorial Andrés Bello, 1978. Capítulos 1 y 2.
4. Bishop, R. F., Davidson, G. P., Holmes, I. H. y Ruck, B. J. Evidence for viral gastroenteritis. *N Engl J Med* 289:1096, 1973.
5. Flewitt, T. H., Bryden, A. S. y Davis, H. Virus particles in enteritis. *Lancet* 2:1497, 1973.
6. Kapikian, A. Z., Kim, H. W., Wyatt, R. G., Cline, W. L., Arrobio, J. O., Brand, C. D., Rodriguez, W. J., Sack, D. A., Chanock, R. M. y Parrott, R. H. Human reovirus-like agent as a major pathogen associated with "winter" gastroenteritis in hospitalized infants and young children. *N Engl J Med* 294:965, 1976.
7. Calderón, E., Espejo, R., González, N., Hernández, M., Romero, P. y Maulen, Y. Aspectos epidemiológicos de la gastroenteritis producida por rotavirus. *Bol Med Hosp Infant Mex* 35:45, 1978.
8. Kapikian, A. Z., Yolken, R., Greenberg, H., Wyatt, R. G., Kalica, A. R., Chanock, R. M. y Kim, H. W. Gastroenteritis viruses. In: Lanette, E. y Schmidt, N. *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*. 5 ed. American Public Health Association, Washington, D.C., 1979. pp. 927-995.
9. Simhon, A., Amato, S., Hernández, F., Yolken, R. y Matta, L. Diagnóstico de rotavirus por microscopía electrónica y el ensayo inmunosorbente enzima conjugada (ELISA). *Bol Of Sanit Panam* 86(5):391-397, 1979.
10. Espejo, R., Romero, P., Calderón, E. y González, N. Diagnóstico de rotavirus por electroforesis del RNA viral. *Bol Med Hosp Infant Mex* 35:323, 1978.
11. Yolken, R., Kim, H. W., Clem, T., Wyatt, R. G., Kalica, A. R., Chavock, R. M. y Kapikian, A. Z. Enzyme-linked immunosorbent assay

- (ELISA) for detection of human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. *Lancet* 2:263, 1977.
12. Alvarez, M. T., Guiscafre, J. P., Mondragón, C., Morales, M. E., Ruiz, J. y Martínez, A. Comparison between viral RNA electrophoresis, ELISA, and complement fixation techniques with electronic microscopy to demonstrate rotavirus. *Arch Invest Med (Mex)* 13:145, 1982.
 13. Emilfork, M., Duffau, G. y Avendaño, L. Rotavirus y síndrome diarreico prolongado del lactante. *Bol Med Hosp Infant Mex* 39:345, 1982.
 14. Avendaño, L. F., Calderón, A., Macaya, J., Prenzel, I. y Duarte, E. Rotavirus viral RNA electrophoresis in hospitalized infants with diarrhea in Santiago, Chile. *Pediatr Res* 16:329, 1982.
 15. Avendaño, L. F., Spencer, E., Calderón, A. y Martínez, A. Infección por rotavirus en lactantes con diarrea aguda: Aspectos clínicos y epidemiológicos. *Rev Med Chil* 111:240, 1983.
 16. Spencer, E., Avendaño, L. F. y García, B. Analysis of human rotavirus mixed electropherotypes. *Infect Immun* 39:569, 1983.
 17. Spencer, E., Avendaño, L. F. y Araya, M. Characteristics and analysis of electropherotype of human rotavirus isolated in Chile. *J Infect Dis* 148:41, 1983.

Comparison of viral RNA electrophoresis and indirect ELISA methods in the diagnosis of human rotavirus infection (Summary)

A total of 177 stool samples from Chilean diarrhea patients under two years of age were tested for rotavirus by two methods—the indirect enzyme-linked immunosorbent assay (indirect ELISA) and viral RNA electrophoresis in agarose gels (v RNA EPH). Fifty of the specimens came from patients with acute diarrhea and 127 came from patients with protracted diarrhea. The electrophoretic method detected rotavirus in 36% of the acute samples and 25% of the samples from protracted cases, while the indirect ELISA method detected rotavirus in higher percentages of samples—46 and 38%, respectively. These

results support the conclusion that v RNA EPH is a less sensitive method for detecting rotavirus than the indirect ELISA. Nevertheless, the former method's high specificity, ease of application, and low cost make it a worthwhile alternative to indirect ELISA. Thus, considering the important role played by rotavirus in infant diarrhea and the need for a diagnostic technique that can be incorporated into the routines of medical center laboratories in developing countries, there is good reason to conclude that v RNA EPH is a useful tool for studying rotavirus diarrhea.

Comparação da eletroforese do ARN vírico com o método ELISA indireto para o diagnóstico de infecção por rotavírus humano (Resumo)

Estudaram-se um total de 177 amostras fecais de doentes chilenos menores de dois anos de idade que estavam com diarreia para detectar a presença de rotavírus mediante dois métodos: o ensaio imunossorvente enzima-conjugada indireto (ELISA indireto) e a eletroforese do ARN vírico em ágar, gelose. Do total, 50

amostras provinham de doentes com diarreia aguda e 127 de doentes com diarreia prolongada. Com o método de eletroforese detectou-se rotavírus em 36% das amostras de doentes com diarreia aguda e 25% das amostras de doentes com diarreia prolongada, enquanto que com o método ELISA indireto detectou-se

rotavírus numa percentagem mais alta: 46 e 38%, respectivamente. Esses resultados apoiam a conclusão que a eletroforese do ARN viroso é um método menos sensível para detectar rotavírus que o método ELISA indireto; contudo, a grande especificidade, facilidade de aplicação e o custo mais baixo do primeiro método fazem dele uma alternativa de grande valor vis-à-vis o método ELISA indireto. Por tanto se se leva em consideração a função tão

importante do rotavírus na diarreia infantil e a necessidade de contar com uma técnica de diagnóstico que se possa incluir como procedimento normal nos laboratórios de centros médicos de assistência nos países em desenvolvimento, há muito boas razões para afirmar que a eletroforese do ARN viroso constitui um instrumento útil para estudar a diarreia causada por rotavírus.

Étude comparative entre l'électrophorèse d'ARN viral et la technique d'ELISA pour la détection de rotavirus humain (Résumé)

L'efficacité diagnostique de deux techniques pour la détection de rotavirus titrage avec immuno-adsorbant lié à une enzyme (ELISA) et électrophorèse sur gel d'agarose du ARN viral a été comparée à partir de 177 échantillons de fèces d'enfants chiliens atteints de diarrhée et ayant moins de deux ans. Cinquante de ces malades avaient une diarrhée aigue, tandis que les autres 127 presentaient un cadre plus chronique. La méthode d'électrophorèse sur gel d'agarose permet d'identifier les rotavirus dans 36% des cas de diarrhée aigue et dans seulement 25% des cas de diarrhée chronique. Par contre, la méthode d'ELISA est plus sensible et permet l'identification de rotavirus dans 46 et 38% des cas respectivement. Ces

résultats viennent confirmer que l'électrophorèse du ARN viral est une technique moins sensible pour la détection de rotavirus que l'ELISA indirect. Cependant, la grande spécificité, la simplicité et un prix de revient relativement bas constituent autant d'atouts en faveur de l'électrophorèse de ARN viral. De plus, tenant compte de l'importance des rotavirus dans les diarrhées infantiles et de la nécessité de disposer d'une technique de diagnostic qui puisse être incorporée au travail de routine des laboratoires des centres médicaux des pays en voie de développement, l'électrophorèse du ARN viral demeure un instrument de grande utilité pour l'étude des diarrhées provoquées par les rotavirus.