Rev. Chil. Pediatr. 56(6): 441-444, 1985

Estudio Comparativo de Dos Métodos en el Diagnóstico de Rotavirus en Lactantes con Diarrea Aguda y Asintomáticos

Dra. Magdalena Araya Q.; Sr. Eugenio Spencer O.; Dr. Oscar Brunser T.;
Dr. Julio Espinoza M.; Sra. Ana María Sandino G.¹

Elisa and Gel Electrophoresis of Viral RNA in The Diagnosis of Rotavirus Infection

Comparison of positive rates of rotavirus identification obtained with an ELISA technique and gel electrophoresis of viral RNA was carried out in 88 infants with diarrhoea and 63 age matched asymptomatic controls, surveyed during a field study. In patients with diarrhoea, 37.5% had at least one of the tests positive, but only 22.7% had positive gel electrophoresis together with ELISA 3 to 4+. Chi square analysis showed that the association between positive electrophoresis of viral RNA and ELISA 3 to 4+ was significant ($p < 0.05$), but this was not so when ELISA was 1 or 2+. Among asymptomatic subjects, 4 (6.3%) showed strands of rotavirus RNA at the electrophoresis, while their ELISA test was 1 or 2+. In other two children gel electrophoresis was negative and ELISA was 3 and 4+, respectively, suggesting that these infants were excreting incomplete viral particles, not identifiable as rotavirus by the electrophoresis method.

(Key words: Acute Diarrhoea. Rotavirus Infection. Elisa. Gel Electrophoresis. Viral RNA. Etiology).

Los rotavirus causan diarrea aguda en gran variedad de especies animales, incluyendo al hombre¹⁻². En países desarrollados³ y en algunas áreas en desarrollo⁴ es el agente más frecuentemente identificado en las heces de niños con diarrea aguda.

En Chile, se ha identificado el agente en 10 a 25% de pacientes hospitalizados y en alrededor de 15% de casos ambulatorios de diarrea⁵⁻⁸. Estos porcentajes representan promedios, pues la frecuencia de identificación del virus varía considerablemente según la estación, el año en que se efectúe el estudio y la edad del grupo evaluado.

Se ha argumentado que parte de las diferencias de frecuencia publicadas podrían deberse a distinto rendimiento de los métodos empleados para detectar rotavirus⁹⁻¹⁰. Esta investigación se realizó para comparar los resultados obtenidos con el método de electroforesis en gel (que identifica el RNA viral) y los de la técnica de ELISA (que reconoce la presencia de antígenos virales por métodos inmunológicos); establecer relaciones entre ambos procedimientos, cotejar resultados con las características clínicas del episodio de diarrea y, finalmente, comparar la

información que aportaban los dos métodos en pacientes con diarrea y controles asintomáticos.

MATERIAL Y METODO

Se siguió prospectivamente una cohorte de 104 lactantes menores de un año, destetados espontáneamente por lo menos 15 días antes del ingreso al protocolo, eutróficos o con grados leves de desnutrición, durante 12 meses. Sus madres fueron contactadas, recibieron explicaciones sobre el estudio y autorizaron la participación de cada niño, firmando un consentimiento escrito.

Cada familia fue visitada dos veces por semana en su casa; en cada ocasión se registró si el niño sufría de diarrea aguda, definiéndola como eliminación de deposiciones líquidas o aumento del número de evacuaciones intestinales en por lo menos dos, sobre el hábito normal de cada sujeto en un período de 24 horas. Se recolectó información acerca de las características clínicas de la diarrea y se tomó una muestra fecal de alrededor de 3 gramos que se depositó en un frasco sin fijador, manteniéndolo en hielo hasta entregarlo en el Laboratorio de Virología. Allí se congeló a menos 20°C hasta su procesamiento, que se efectuó en los próximos 7 días. Se obtuvieron

1. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos.

también muestras para estudios bacteriológicos y parasitarios cuyos resultados detallados serán publicados posteriormente.

Además de los controles domiciliarios, los niños fueron pesados y medidos una vez por mes en una consulta montada especialmente para los fines del proyecto, a la que tuvieron libre acceso para atención médica y de enfermería por otras afecciones. En estas ocasiones los datos pertinentes fueron registrados en cada caso.

Cada dos episodios de diarrea se tomó una muestra fecal, de iguales características a las descritas anteriormente, en un "control" asintomático, pareado por edad, sin antecedentes de diarrea en las últimas tres semanas y que se mantuvieran sin ella durante los 7 días siguientes a la obtención de la muestra.

La presencia de rotavirus en las heces se investigó mediante electroforesis en gel y una técnica de ELISA que emplea un equipo comercial.

La muestra fecal se diluyó en tampón 50mMTris-HCl pH 8,4 en proporción de 2:1. De esta manera se usaron 200 µl para el ensayo de ELISA y 1 µl para la electroforesis en gel.

Para el ensayo en geles de poliacrilamida se usó un procedimiento previamente descrito¹¹, diluyendo las muestras de deposiciones en un volumen de Freón TF, que se homogenizó y centrifugó a 3.000 rpm por 30 minutos. El sobrenadante fue precipitado con polietilenglicol por incubación a 0°C por 12 horas y luego recolectado por centrifugación a 5.000 rpm durante 30 minutos, descartándose el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 100 µl de tampón 200mMTris HCl pH 8,4, 50mM NaCl y 0,1% de sodio dodecilsulfato. La muestra fue extraída con un volumen de fenol saturado en el mismo tampón, con el fin de desproteínizar la muestra.

El resultado de la técnica de ELISA se consideró positivo cuando se desarrolló color. De acuerdo con las instrucciones de los fabricantes y según la intensidad del color producido los resultados positivos se expresaron en escala de 1 a 4+.

En presencia del genoma viral, la electroforesis permite visualizar en el gel 11 bandas típicas del RNA de rotavirus, lo que se definió como resultado positivo.

RESULTADOS

Se estudiaron 88 lactantes con diarrea, cuyas edades fluctuaban entre 3 y 10 meses (43 varones), y 63 niños asintomáticos entre 2 y 11 meses

Tabla 1.

Relación Peso/Edad en 88 lactantes con diarrea y 63 asintomáticos

% Estándar NCHS	Lactantes con Diarrea		Lactantes Asintomáticos	
	P/E	T/E	P/E	T/E
75 - 80	5	1	2	0
81 - 90	5	17	6	0
91 - 105	50	45	31	39
106 - 120	20	21	21	24
120	4	3	2	0
TOTAL	87*	87**	62*	63

* En un niño no se obtuvo las medidas antropométricas necesarias para el cálculo de P/E.

** En un niño la talla no estaba disponible para el cálculo de T/E.

Tabla 2.

Resultados positivos obtenidos por electroforesis en gel y método de ELISA en 88 lactantes con diarrea

ELISA	Electroforesis en gel		TOTAL
	(-)	(+)	
0	0	2	2
+	7	2	9
++	6	6	12
+++	0	8	8
++++	0	2	2
TOTAL	13	20	33 (37,5%)

(-) No se identificaron bandas de RNA viral en la electroforesis.

(+) Bandas de RNA viral identificables en la electroforesis

de edad (34 varones). El estado nutricional evaluado por la relación peso para la edad y talla para la edad se muestra en la Tabla 1. En el momento del estudio ningún niño recibía leche materna. Los episodios de diarrea se detectaron en las primeras 72 horas de evolución y tuvieron una duración promedio de 4,4 días (rango 1 a 10 días). Los síntomas fueron inespecíficos y la evolución sin complicaciones; los pacientes no requirieron hospitalización. La deshidratación se estimó de menos de 5% en todos los casos. En 13 lactantes se identificaron bacterias enteropatógenas, siete *E. coli* enteropatógenos serotipos clásicos, cuatro *Shigellas*, una *E. coli* enterotoxigénica y un *Campylobacter jejuni*; en 8 de los 13 se detectó además rotavirus. No hubo relación entre las características clínicas y los agentes patógenos observados.

Los resultados de ELISA y electroforesis en gel en pacientes con diarrea se muestran en la Tabla 2 y para los controles en la Tabla 3. El análisis por chi cuadrado con 4 grados de libertad

Tabla 3.

Resultados positivos obtenidos por electroforesis en gel y método de ELISA en muestras fecales de 63 lactantes asintomáticos

ELISA	Electroforesis en gel		TOTAL
	(-)	(+)	
0	0	1	1
+	2	2	4
++	2	1	3
+++	1	0	1
++++	1	0	1
TOTAL	6 (9,5%)	4* (6,3%)	10

(-) y (+) tienen el mismo significado que en la Tabla 2.

* Todos estos episodios fueron ELISA (-) si el criterio mínimo es 3 ó 4 +.

mostró que la asociación entre electroforesis positiva y ELISA 3 ó 4 + era estadísticamente significativa ($p < 0,05$), no así entre electroforesis positiva y ELISA 1 ó 2 +.

No se encontró correlación entre el resultado de los exámenes (por lo menos uno positivo o ambos positivos) y la edad, el estado nutricional del sujeto, la duración del episodio, y la asociación con otros enteropatógenos (bacterianos y parasitarios) detectados. En relación a las variables mencionadas, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los pacientes en que se detectó rotavirus y aquellos en que esto no ocurrió.

DISCUSION

En episodios de diarrea como los de esta investigación los resultados obtenidos con los métodos de ELISA y electroforesis en gel fueron variables. Si se toma como criterio para definir positividad del episodio que por lo menos uno de los dos métodos dé resultado positivo, 37,5% de ellos se podrían considerar relacionados con rotavirus. En cambio, si se exige que la electroforesis en gel sea positiva, sólo 22,7% de los casos parecerían asociados al virus. Esta proporción de identificación permanece igual si la exigencia es que la electroforesis sea positiva y ELISA sea positivo con 3 ó 4 +.

Se podría objetar el criterio de considerar la electroforesis en gel como punto de referencia para la identificación etiológica de un episodio, pues si bien el método es muy preciso (identifica las bandas típicas de RNA del rotavirus y no permite confusión con otros virus), se le ha criticado porque requiere la presencia de un número mínimo de partículas virales en las heces

(alrededor de 1×10^6 /cc) para que sea posible ver las 11 bandas de RNA. Conscientes de este problema obtuvimos muestras fecales de por lo menos 3 gramos, concentrándolas antes del análisis. Creemos que de esta manera se elimina el riesgo aludido. Por otro lado, la falta de precisión de los métodos de ELISA disponibles en el mercado ha sido reconocida en la literatura¹². Por estos motivos, creemos que la electroforesis en gel o la rotaforesis (método modificado de la electroforesis tradicional) son más apropiados como patrones de referencia. Si no se cuenta con estas técnicas y los estudios se realizan mediante ELISA, es necesario tener presente que ésta produce una proporción relativamente alta de falsos positivos, debiendo exigirse resultados 3 ó 4 + para considerar que el episodio se relaciona con rotavirus.

Las características clínicas de todos los sujetos con diarrea fueron parecidas. Esto no permitió comparar subgrupos para evaluar algunas variables que pudieran influir en la severidad del episodio y el rendimiento de los métodos.

Los resultados obtenidos en niños asintomáticos son difíciles de interpretar si aplicamos el criterio enunciado para analizar los episodios de diarrea, pues los 4 casos positivos en la electroforesis fueron negativos en la prueba de ELISA y por otro lado, en los dos con ELISA positivo 3 y 4 +, respectivamente, la electroforesis fue negativa.

Los estudios de rotavirus en individuos asintomáticos son escasos¹³⁻¹⁴, la mayoría en recién nacidos. Este período de la vida tiene características tan especiales que sería un error comparar los resultados obtenidos en él, con los de individuos de otras edades. Nuestros resultados se pueden explicar teniendo en cuenta que ELISA reacciona con antígenos de la cápside del virus, mientras que el gel detecta RNA viral. En este tipo de estudios no se sabe cuando el individuo entró en contacto con el virus y es posible que en el momento de efectuar la investigación, el organismo haya alcanzado cierto nivel de inmunidad, de manera que predomine la eliminación de partículas incompletas. De esta manera, algunas partículas que representan antígenos reconocibles por los anticuerpos contenidos en el ELISA producen resultados positivos con este examen al mismo tiempo que no se logra reconocer las bandas de RNA de rotavirus en la electroforesis.

Si se acepta esta línea de pensamiento, 10 (15,9%) niños asintomáticos estaban excretando componentes de rotavirus, en 4 de ellos (6,3%) se podía identificar el genómico viral de rotavirus y en 6 (9,5%) componentes de las cubiertas exter-

nas del virus.

El significado del hallazgo de rotavirus en las heces de niños asintomáticos sin antecedentes próximos de diarrea no está aclarado. Es un hecho demostrado que existen portadores de rotavirus⁷. No se sabe si esto significa mayor riesgo de enfermar por ese agente para estos sujetos. Información obtenida en portadores de agentes bacterianos sugiere que ser portador de una bacteria enteropatógena no constituye un riesgo mayor de desarrollar enfermedad diarreica producida por la misma bacteria (datos no publicados). Desde el punto de vista de Salud Pública no cabe duda que el fenómeno de portación es importante, pues los portadores asintomáticos constituyen un reservorio para el agente y una fuente potencial de infección para la comunidad.

RESUMEN

En 88 lactantes con diarrea y 63 coetáneos asintomáticos estudiados en terreno, se comparó el número de identificaciones de rotavirus obtenidos con una técnica de ELISA y electroforesis en gel. De los niños con diarrea, en 37,5% se obtuvo por lo menos un resultado positivo con alguno de los dos métodos. El resultado de ELISA se calificó en 1 a 4+. Sólo en 22,7% de las muestras coincidieron la electroforesis positiva con ELISA 3 ó 4+. El análisis por χ^2 con 4 grados de libertad mostró que esta asociación era estadísticamente significativa ($p < 0,05$), no así la asociación entre electroforesis positiva y ELISA 1 ó 2+. En cuatro niños asintomáticos (6,3%), se identificó RNA viral con la electroforesis en gel y ELISA fue 1 ó 2+. En otros dos niños, el ELISA fue positivo 3 y 4+, respectivamente, con electroforesis negativa, lo que sugiere que estos últimos excretaban partículas virales incompletas no reconocibles como RNA de rotavirus mediante la electroforesis en gel.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado por Nestlé Research.

Deseamos expresar nuestros agradecimientos al Director del Consultorio La Faena, Dra. Lucía Toro, a la Enfermera Jefe, Srta. Irma Riumalló y a todo el personal de dicho consultorio, sin cuyo apoyo este estudio no se habría podido realizar. Asimismo, agradecemos a nuestro personal de terreno y de laboratorio, especialmente a las Sras. Sara Labrín e Isolda Pacheco, por su excelente labor profesional.

REFERENCIAS

1. Mc Nulty M.S.: Rotaviruses. *J. Gen. Virol.* 40: 1, 1978.
2. Flewett T.H.: Clinical features of rotavirus infections. En: Tyrrell D.A.J., Kapikian A.Z., eds. *Virus infection of the gastrointestinal tract*. New York Decker, 125-145, 1982.
3. Kapikian A., Kim H., Wyatt R., Cline W., Arrobio J., Brandt C., Rodríguez W., Sack D., Chanock R., Parrot R.: Human reovirus-like agent as the major pathogen associates with "winter" gastroenteritis in hospitalized infants and young children. *N. Engl. J. Med.* 294: 965, 1976.
4. Black R.E., Brown K.H., Beckers, Abdul Alim ARM., Huq J.: Longitudinal studies of infectious diseases and physical growth of children in rural Bangladesh. *Am. J. Epidemiol.* 115: 315, 1982.
5. Spencer E., Avendaño F. and Araya M.: Characteristics and analysis of electrophoretotypes of human rotavirus isolated in Chile. *J. of Infect. Dis.* 148: 41, 1983.
6. Avendaño L.F., Spencer E., Calderón A. y Martínez A.: Infección por rotavirus en lactantes con diarrea aguda. *Rev. Med. Chile* 111: 240, 1983.
7. Araya M., Figueroa G., Espinoza J., Montesinos N., Spencer E., Brunser O.: Acute diarrhoea disease in children under 7 years of age in a periurban slum of Santiago, Chile. *J. Hyg.* 1985, en prensa.
8. Figueroa G., Araya M., Ibáñez S., Clerc N., Brunser O.: Enteropathogens associated to acute diarrhoea in hospitalized infants. *J. Ped. Gastroenterol. Nutr.*, 1985, en prensa.
9. Birch C.J., Lehmann N.I., Hawker A.J., Marshall J.A., Gust I.D.: Comparison of electron microscopy, enzyme-linked immunosorbent assay, solid-phase radioimmuno assay, and indirect immunofluorescence for detection of human rotavirus antigen in faeces. *J. Clin. Pathol.* 32: 700, 1979.
10. Hammond G.W., Ahluwalia G.S., Barker F.G., Horsman G., Hazelton P.R.: Comparison of direct and indirect enzyme immunoassays with direct ultracentrifugation before electron microscopy for detection of rotavirus. *J. Clin. Microbiol.* 16: 53, 1982.
11. Spencer E., Arias M.L.: In vitro transcript catalyzed by heat-treated human rotavirus. *J. of Virology* 40: 1, 1981.
12. Ghose L.H., Schnagl R., Holmes I.H.: Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay for quantification of rotavirus antibodies with complement fixation in an epidemiological survey. *J. Clin. Microbiol.* 8: 268, 1978.
13. Champsaur H., Henry-Amar M., Goldszmidt D., Prevot J., Bourjouane E., Questiaux E. and Bach A.: Rotavirus carriage, asymptomatic infection and disease in the first two years of life I virus shedding. II Serological Response. *J. Infect. Dis.* 149: 667, 675, 1984.
14. Holmer I.H.: Viral gastroenteritis. *Prog. Med. Virol.* 25: 1, 1979.