Evaluación de cuatro métodos para detección de rotavirus en deposiciones en niños chilenos

Maribel Rivera M.¹; Pablo A. Vial C.¹; Marcela Potin S.¹;
Priscilla Prado D.¹; Patricia Amarales O.³; Miguel O'Ryan G.⁴;
Marcela Ferrés C.¹; Katia Abarca V.¹; Francisco Montiel A.²

Comparisson of four different tests for rapid diagnosis of rotavirus infection in infants

In order to compare different tests for the rapid diagnosis of rotavirus infection in infants, fifty-one stool specimens from Chilean children with acute gastrointestinal disease were tested for the presence of this virus by gel electrophoresis of viral RNA (Rotagel, ISP-Chile), latex agglutination assay (Rotavirus Antigen Latex Test (RALT), Meridian), ELISA (Pathfinder, Kalistad), and latex-based EIA (RV-Test Pack, Abbott). All samples were also analyzed by a blocking ELISA confirmation test which was considered as the gold standard. Sensitivity/specificity values for all tests were: ELISA: 100/90%; Test-Pack: 95/97%; Rotagel: 81/100%; RALT: 71/100%. Processing time ranged from 15 min (RV-Test Pack) to 120 min (Rotagel). Price per processed sample (in US\$) were: RV-Test Pack, 10.2; ELISA-Pathfinder, 6.7; RALT, 2.4; and Rotagel 0.5. RV-Test Pack seems to be the method of choice for diagnosis of rotavirus associated diarrhea because it is reliable and fastest, though its higher price may preclude its use in many clinical centers. ELISA shows similar diagnostic efficiency, it is less expensive but requires a longer processing time and higher technical skills.

Key words: rotavirus, diagnostic tests.)

El descubrimiento de rotavirus (RV) mediante inmuno-electromicroscopía permitió caracterizar la morfología del virus y, consecuentemente, utilizar la microscopía electrónica (ME) como método para su detección en deposiciones¹⁻⁴. Los estudios iniciales confirmaron la asociación de RV con gastroenteritis y definieron su comportamiento epidemiológico en la población general^{4, 5}. La caracterización estructural y genómica del virus condujo al desarrollo de métodos de diagnóstico basados en la identificación de sus antígenos o material genómico en deposiciones⁶⁻¹¹. La menor complejidad de

estas técnicas ha permitido disponer universalmente de métodos de diagnóstico de RV, estableciéndose que este agente constituye una de las causas más frecuentes de diarrea aguda en niños en diversas regiones del mundo^{8, 12-14}. Las técnicas de identificación de RV actualmente disponibles se basan en alguno de los siguientes métodos: observación directa (ME), detección de antígenos (inmunoensayos como ELISA y aglutinación partículas) o detección de ARN (electroforesis en gel, hibridación, amplificación genética). Estas técnicas requieren que el virus este presente en una concentración de 10^4 - 10^5 partículas virales por gramo de deposición en el caso de ME, ELISA, aglutinación de látex^{2, 3, 14-16} o de 10^7 a 10^{11} partículas virales por gramo en el caso de electroforesis de ARN⁷⁻⁹. Se ha establecido que durante la infección aguda el RV es excretado en una concentración de al menos 10^7 partículas virales por gramo de deposición^{9, 15, 17}, lo que teóricamente predice que la electroforesis de ARN podría tener una menor sensibilidad en algunas circunstancias. En el

1. Departamento de Pediatría, Facultad de Medicina, Universidad Católica de Chile.
2. Laboratorio de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Católica de Chile.
3. Hospital Regional de Punta Arenas.
4. Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Financiamiento del Proyecto de Child Health Foundation UCID92.

caso de los inmunoensayos las variaciones observadas en sensibilidad y especificidad se relacionan aparentemente con factores tales como manejo de la muestra (transporte, conservación, tiempo entre colección y procesamiento), calidad de los anticuerpos de captura, presencia en la muestra de enzimas que degradan proteínas o ácidos nucleicos. Estos factores hacen aconsejable que se evalúe la eficiencia diagnóstica de los diversos métodos en condiciones semejantes a las circunstancias en que se presentan los pacientes infectados^{11, 14, 18-20}. En la presente investigación se comparan los resultados obtenidos por cuatro métodos diagnósticos disponibles en Chile, a saber: ELISA, aglutinación de látex, ELISA acoplado a aglutinación de partículas (RV-Test Pack) y electroforesis de ARN (Rotagel®).

Material y métodos

Como parte de un estudio prospectivo de etiología de diarrea aguda en población pediátrica se seleccionó al azar una cohorte de pacientes para evaluación de cuatro métodos de diagnóstico de rotavirus. Las muestras de deposición fueron obtenidas al momento del diagnóstico de diarrea aguda y alícuotadas en cuatro tubos estériles. Una de las alícuotas fue analizada inmediatamente después de obtenida por electroforesis de ARN en el laboratorio del Hospital Parroquial de San Bernardo según las indicaciones del fabricante (Rotagel, Instituto de Salud Pública de Chile, Santiago); brevemente, se realiza extracción del ARN viral mediante exposición de la muestra a SDS, fenol y cloroformo; el material obtenido se separa electroforéticamente en un gel de poliacrilamida y se visualiza mediante tinción argéntica. De este modo esta técnica permite la identificación del ARN de RV que se caracteriza por su patrón de once segmentos de doble hebra.

Otra alícuota fue enviada al laboratorio de microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Católica de Chile y analizada dentro de 24 horas por aglutinación de látex (Rotavirus Antigen Latex Test, Meridian, U.S.A.) que utiliza partículas de látex recubiertas con antirotavirus policlonal (cepa SA-11), y por técnica de ELISA (Pathfinder Rotavirus Kallestad, BRD Pasteur Diagnóstica, Francia), que utiliza tubos recubiertos con antirotavirus policlonal contra la proteína VP6 (proteína de la cápside interna) como anticuerpos de captura. Para la identificación del antígeno utiliza anticuerpo monoclonal antirotavirus conjugado con peroxidasa.

Se almacenaron dos alícuotas a -20° C, una de las cuales fue utilizada para la prueba ELISA/aglutinación (Test Pack Rotavirus, Abbott Laboratories, IL, U.S.A.), que utiliza partículas de látex recubiertas con anticuerpo policlonal antirotavirus como fase sólida inmunoabsorbente; la aglutinación de estas partículas se amplifica mediante el uso de anticuerpos monoclonales y policlonales anti-

rotavirus conjugados a fosfatasa alcalina. La presencia de RV produce la formación de complejos antígeno-anticuerpo conjugado, los que son retenidos en un filtro y visualizados ante la exposición a un cromógeno. La alícuota restante se utilizó para prueba confirmatoria con anticuerpos bloqueadores por técnica de ELISA que se basa en la disminución del 50% o más en la densidad óptica después del tratamiento con suero hiperinmune^{4, 11}.

Las muestras positivas, por cualesquiera de las técnicas en evaluación, que resultaron discordantes con la prueba confirmatoria fueron procesadas para observación por inmunoelectromicroscopía; para esta última prueba se utilizó anticuerpos policlonales antirotavirus para facilitar la observación del virus (figura).

Los resultados fueron sometidos a prueba de comparación de proporciones dependientes (prueba de Cochran)²¹.

Resultados

Se incluyeron en el estudio muestras de deposición obtenidas de 51 pacientes, 21 de los cuales presentaban una diarrea aguda por rotavirus determinado por prueba confirmatoria. Los resultados de cada una de las pruebas diagnósticas evaluadas se muestran en la tabla 1.

La determinación de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para cada prueba evaluada, usando como estándar la prueba de ELISA confirmatoria, se muestran en la tabla 2. Los métodos de ELISA y RV-Test Pack no presentaron diferencias estadísticamente significativas de sensibilidad con la prueba confirmatoria. La sensibilidad

Tabla 1

Número de muestras positivas y negativas según método diagnóstico

Resultado prueba confirmatoria	Número muestras	Resultados Elisa	T. Pack	Otros métodos R. Gel	Látex
Positivo	15	+	+	+	+
	2	+	+	+	-
	3	+	+	-	-
	1	+	-	-	-
Negativo	25	-	-	-	-
	3	+	-	-	-
	1	-	-	+	-
	1	-	+	-	-

* Una de las muestras resultó positiva sólo por electroforesis de RNA, correspondiendo probablemente a un pararotavirus.

Figura: Observación directa (A) por microscopía electrónica de partículas de rotavirus en deposiciones de un lactante con diarrea aguda. Inmunoelectromicroscopía (B) de la misma muestra con anticuerpos antirotavirus. Barra: 100 nm.

Tabla 2

Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) según método diagnóstico

Método	Sensi- bilidad	Especi- ficidad	VPP	VPN
Elisa	100,0	90,0	87,5	100,0
Rotagel	81,0	100,0*	100,0*	87,7
Látex	71,4	100,0	100,0	83,0
Test Pack	95,2	96,6	95,2	97,0

* Una de las muestras resultó positiva sólo por electroforesis de RNA, lo que podría corresponder a un pararotavirus (no se confirma por microscopía electrónica).

de las técnicas Rotagel (81%) y aglutinación de látex (71,4%) fueron significativamente menores ($p = 0,032$ y $p = 0,0013$ respectivamente). La especificidad de los distintos métodos empleados no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,28$).

No se observaron partículas virales por microscopía electrónica en ninguna de las 5 muestras negativas por ELISA confirmatorio y positivas por algunos de los métodos evaluados. La muestra positiva por electroforesis de ARN fue negativa por microscopía electrónica.

Comentario

Rotavirus es el principal agente causal de diarrea en lactantes y al menos 3% de los lactantes infectados requiere hospitalización¹²; al mismo tiempo, RV produce altas tasas de infección intrahospitalaria en servicios de pediatría (12 a 25%)^{22, 23}. Debido a que no existe terapia específica, la acción médica esta orientada a prevenir o tratar la deshidratación, que es su principal complicación^{12, 13, 24}. La disponibilidad de métodos rápidos para el diagnóstico de RV tiene importancia clínica y epidemiológica, permitiendo racionalizar las decisiones de manejo médico y control de infecciones. Considerando la alta incidencia de esta infección y su presentación como cuadro agudo que generalmente motiva consulta en servicios de urgencia, es importante que estos métodos de diagnóstico sean rápidos, seguros, de bajo costo y que no requieran equipo especial ni personal altamente entrenado.

La evaluación presentada aquí fue realizada con un número de muestras que permite determinar diferencias de sensibilidad superiores al 15% (con un poder estadístico de 80% para $p = 0,05$). Los resultados indican que el método ELISA y el RV-Test Pack tienen la mejor sensibilidad (100% y 95% respectivamente), ofreciendo la ventaja de tener alta especificidad (90% y 97% respectivamente). Las técnicas de Rotagel y aglutinación de látex evaluadas aparecen con una sensibilidad significativamente menor, fallando en detectar la infección en 19 y 29% de los casos respectivamente. Esta menor sensibilidad no es compensada, como se podría esperar, por una especificidad significativamente mayor. El problema diagnóstico se concentra principalmente en la sensibilidad, la que se ve afectada por diferentes factores, según la técnica empleada. En la prueba de aglutinación de látex se ha descrito interferencia de anticuerpos antirotavirus en deposiciones; estos anticuerpos, de tipo IgA, están presentes tempranamente durante la infección y bloquearían los sitios de reacción¹⁶. La electroforesis de ARN viral requiere de un número mayor de partículas virales para obtener un resultado positivo^{7, 9} ($10^7 - 10^{11}$ partículas por ml de deposición versus 10^5 requeridas por ELISA o microscopía electrónica); por otro lado, el ARN viral es lábil y susceptible a degradación por ARN asas normalmente presentes en muestras biológicas. En relación al RV-Test Pack, se ha informado que la sensibilidad disminuye cuando la determinación se realiza con muestras que han sido sometidas a congelación¹¹.

Estudios publicados previamente, que comparan métodos de diagnóstico para RV, muestran cifras similares de sensibilidad a las informadas aquí^{7, 10, 16, 25}. La prueba de ELISA muestra mayor variabilidad con sensibilidad de 80% a 100%^{7, 10, 16, 25}. La sensibilidad del RV-Test Pack fluctúa entre 95 y 100%^{11, 25}, disminuyendo significativamente si se congela la muestra previo a su procesamiento¹¹. La sensibilidad de la electroforesis de ARN es significativamente más baja, alcanzando generalmente un 80%^{6, 7}. Esta técnica puede tener su principal indicación cuando se requiere monitorizar la diseminación del virus en un brote limitado, ya que permite comparar las cepas identificadas en los pacientes mediante el patrón de bandas de su ARN viral^{6, 24, 26-28}.

Aun cuando las diferencias en la especificidad no fueron significativas, se observaron algunos resultados falsos positivos. En el caso de Rotagel en una muestra se detectó material genómico similar al de rotavirus sin que la muestra fuera positiva por ningún otro método; esto podría representar la presencia de pararotavirus^{22, 24}, sin embargo esto no fue confirmado por microscopía electrónica. La prueba de ELISA presentó 3 falsos positivos (negativos por prueba confirmatoria y por microscopía electrónica) los que probablemente se deben a reacción cruzada con otros antígenos²⁹⁻³¹; el RV-Test Pack tuvo un falso positivo, de reacción débil, fenómeno que ha sido atribuido a la presencia de anticuerpos de tipo IgM u otras proteínas (proteínas de *S. aureus*, factor reumatoide, etc.)¹¹.

En la tabla 3 se presenta información global que podría ser considerada en la toma de decisiones de la técnica a utilizar en cada laboratorio local. Tal como se describe, es difícil conjugar los costos con la eficiencia diagnóstica. En base a la sensibilidad, especificidad y valores predictivos, el RV-Test Pack aparece como la prueba de elección para el diagnóstico de RV; adicionalmente es la prueba que tiene un menor tiempo de procesamiento y no requiere de equipamiento adicional; por otro lado su precio es el más elevado de las pruebas analizadas. La prueba de ELISA tiene una eficiencia similar a RV-Test Pack en el diagnóstico, pero requiere mayores habilidades técnicas y tiempo de procesamiento. El uso de Rotagel tiene limitaciones por su menor sensibilidad y por requerir mayor destreza técnica, pero al mismo tiempo representa la prueba de menor precio, es de fácil disponibilidad y desde el punto de vista clínico

eventualmente permite mantener un seguimiento epidemiológico de las cepas presentes en una comunidad o un hospital.

Resumen

Las pruebas disponibles para detección de rotavirus (RV) presentan diferente eficiencia en el diagnóstico. Se evaluaron aquí cuatro métodos de diagnóstico de RV en deposiciones. Con este objeto se analizaron 51 muestras de niños con diarrea aguda (21 RV positivos) por los métodos de electroforesis de ARN viral (Rotagel, ISP-Chile), aglutinación de látex (Rotavirus Antigen Látex Test, Meridian), ELISA (Pathfinder, Kallestad), e inmunoensayo ligado a aglutinación (RV-Test Pack, Abbott). Todas las muestras fueron corroboradas con un ensayo de ELISA confirmatorio y su resultado fue considerado el estándar para comparaciones. La sensibilidad y especificidad para ELISA fue 100 y 90%; RV-Test Pack: 95 y 97%; electroforesis de ARN 81 y 100%; aglutinación de látex 71 y 100%. El tiempo de procesamiento por muestra tuvo un rango entre 15 min (RV-Test Pack) a 120 min (Rotagel). El precio de costo por muestra (en US\$) fue: RV-Test Pack 10,2; ELISA-Pathfinder^{6, 7}; látex 2,4; y Rotagel 0,5. RV-Test Pack aparece como la prueba de elección para el diagnóstico de RV por su rapidez y confiabilidad, sin embargo su precio podría impedir su uso en numerosos centros clínicos. La prueba de ELISA mostró una eficiencia diagnóstica similar, su precio es más bajo, pero tiene mayores requerimientos técnicos y un tiempo de procesamiento más largo.

(Palabras clave: rotavirus, diagnóstico, métodos rápidos.)

Tabla 3

Costo, tiempo empleado en la determinación y sensibilidad de cada una de las pruebas de detección de antígeno para rotavirus evaluadas

Prueba (US\$)	Costo unitario (minutos)	Tiempo realización (minutos)	Sensibilidad
RV-Test Pack	10,2	15	95,2
Elisa	6,7	90	100,0
Agglut. látex	2,4	15	71,4
ARN Rotagel	0,5	120	81,0

Agradecimientos

Agradecemos la asistencia técnica de la Sra. Teresa Azócar y Srta. Mercedes Paredes, la colaboración del Sr. Luis Villaroel en el análisis estadístico y la colaboración del personal de los servicios de Pediatría en la toma de muestra y registro de datos.

Referencias

1. Kupikian AZ, Kim HW, Wyatt RG: Reovirus-like agent in stools: association with infantile diarrhea and

- development of serologic test. *Science* 1974; 185: 1049-1053.
2. Berthiaume L, Alain R, Mc Laughlin B, et al.: Rapid detection of human virus in faeces by a simple and routine immune electron microscopy technique. *J Gen Virol* 1981; 55: 223-227.
3. Flewett TH, F.R.C.P., F.R.C. Path: Electron microscopy in the diagnosis of infectious diarrhea. *JAVMA* 1978; 173: 538-543.
4. Rubenstein A. and Miller M: Comparison of an enzyme immunoassay with electron microscopic procedures for detecting rotavirus. *J Clin Microbiol* 1982; 15: 938-944.
5. Trépanier P, Alain R, Micusan V, et al.: Comparison of three electron microscopy techniques for detection of human rotaviruses. *Microb Immunol* 1981; 25: 1019-1024.
6. Espejo RT, Avendaño LF, Muñoz O, et al.: Comparison of human rotaviruses isolated in Mexico City and in Santiago, Chile by electrophoretic migration of their double - stranded ribonucleic acid genome segments. *Infection and Immunity* 1988; 30: 342-348.
7. Avendaño L, Dubinovsky S and James H: Comparison of viral RNA electrophoresis and indirect ELISA methods in the diagnosis of human rotavirus infection. *PAHO Bulletin* 1984; 18: 245-249.
8. Araya M, Spencer E, Brunser O, et al.: Estudio comparativo de dos métodos en el diagnóstico de rotavirus en lactantes con diarrea aguda y asintomáticos. *Rev Chil Pediatr* 1985; 56: 441-444.
9. Espejo R, Romero P, Calderón A, Gonzalez N: Diagnóstico de rotavirus por electroforesis de ARN viral. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1978; 35: 323.
10. Chernesky M, Castriciano S, Mahony J, et al.: Examination of the rotazyme II enzyme immunoassay for the diagnosis of rotavirus gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 1985; 22: 463-464.
11. Brooks R, Brown L, and Franklin R: Comparison of new rapid test (Test Pack Rotavirus) with standard enzyme immunoassay and electron microscopy for the detection of rotavirus in symptomatic hospitalized children. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 775-777.
12. Kapikian AZ, and Wyatt R: Viral gastrointestinal infections. In Feigin R.D. and Cherry J.D. (eds) *Textbook of Pediatric Infectious Diseases* 3rd Ed, WB Saunders Co. Philadelphia, 1992: 655-664.
13. Blacklow N. and Greenberg H.: Viral gastroenteritis. *New Engl J Med* 1991; 325: 252-264.
14. Browdre J: Viral gastroenteritis and laboratory detection of rotavirus. *Am J Medical Techn* 1983; 49: 665-668.
15. Ward RL, Knowlton DR, Pierce MJ: Efficiency of human rotavirus propagation in cell culture. *J Clin Micro* 1984; 19: 748-753.
16. Lipson S. and Zelinsky K: Comparison of four latex agglutination (LA) and three enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of rotavirus in fecal specimens. *Am J Clin Pathol* 1989; 92: 637-643.
17. Chrystie IL, Totterdell BM, Banatvala JE: Asymptomatic endemic rotavirus infection in the newborn. *Lancet* 1978; 1: 1176-1178.
18. Banatvala JE, Christie IL, Flower AJE: Rapid diagnosis of viral infections. *Lancet* 1975; 2: 79-80.
19. Flewett T, Arias C, Avendaño F, et al.: Comparative evaluation of the WHO and Dakopans enzyme-linked immunoassay kits for rotavirus detection. *WHO Bulletin OMS* 1989; 67: 369-374.
20. Gómez J, Esters M, Matson D, et al.: Serotyping of human rotavirus in Argentina by ELISA with monoclonal antibodies. *Arch Virol* 1990; 112: 249-259.
21. Conover W: *Practical nonparametric statistics*. 2d Ed. John Wiley and sons, New York, 1980: 199-206.
22. Burriza P, Avendaño L, Spencer E, et al.: Infección intrahospitalaria por rotavirus en lactantes, Santiago, Chile. *Bol Sanit Panam* 1986; 101: 328-337.
23. Cone R, Mohan K, Thouless M, et al.: Nosocomial transmission of rotavirus infection. *Pediatr Infect Dis J* 1988; 7: 103-108.
24. Cukor G. and Blacklow N. Human viral gastroenteritis. *Microbiological Reviews* 1984; 48: 157-179.
25. Marlewicz B, Spiewak M, Lampinen J: Evaluation of ABBOT Test Pack Rotavirus with clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1988; 36: 2456-2458.
26. Cortesia M, Vial P, Nataro J: Diagnóstico de la diarrea aguda. *Boletín Escuela de Medicina Pontificia Universidad Católica de Chile* 1988; 18: 38-44.
27. Dolan K, Twist EM, Horton-Slight P, et al.: Epidemiology of rotavirus electropherotypes determined by a simplified diagnostic technique with RNA analysis. *J Clin Microbiol* 1985; 21: 753 - 758.
28. Vial PA, Kotloff K, Losonsky G: Molecular epidemiology of rotavirus infection in a newborn convalescent room. *J Infect Dis* 1988; 157: 668 - 673.
29. Brandt C, Wha H, Rodriguez W, et al.: Comparison of direct electron microscopy, immune electron microscopy and rotavirus enzyme linked immunoassay for detection of gastroenteritis viruses in children. *J Clin Microbiol* 1981; 13: 976-981.
30. Hermann J, Blacklow N, Perron D, et al.: Enzyme immunoassay with monoclonal antibodies for the detection of rotavirus in stool specimens. *J Infect Dis* 1985; 152: 830 - 832.
31. Brandt C, Parrot RH, Kim HV, et al.: Diarrhea viruses: detection, specific identification and epidemiology in L.M. de la Maza and Peterson (ed) *Medical Virology III*. Elsevier Science Publishing Co., New York 1984: 35-65.