

DIAGNOSTICO DE ROTAVIRUS POR MICROSCOPIA ELECTRONICA Y EL ENSAYO INMUNOSORBENTE ENZIMA CONJUGADA (ELISA)

Alberto Simhon,¹ Salvador Amato,² Francisco Hernández,² Robert H. Yolken,³ y Leonardo Mata¹

Este trabajo tiene por objeto demostrar la eficiencia del ensayo inmuno-sorbente enzima conjugada (ELISA) como método para el diagnóstico de rotavirus. Para ello se analizaron muestras provenientes, de 247 niños con diarrea admitidos en el Hospital Nacional de Niños de Costa Rica. El método de comparación utilizado fue el de microscopia electrónica de transmisión (MET) y la evaluación, que se refiere a la sensibilidad en el diagnóstico, costo, tiempo y otros detalles operativos, demuestra que el ELISA es el método óptimo para el estudio de grandes cantidades de muestras.

Introducción

La enfermedad diarreica persiste como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en sociedades tradicionales y preindustriales (1). Durante tiempo considerable los investigadores se han abocado a explicar la etiología del mayor número de gastroenteritis infantiles en las que no se lograba demostrar agentes parasitarios o bacterianos usuales. El hallazgo de enterobacteriáceas capaces de producir exotoxinas (2, 3) y de agentes víricos de 70 nm de diámetro (rotavirus) (4, 5), ha permitido esclarecer la etiología de muchas diarreas antes llamadas "inespecíficas". Mientras el diagnóstico de enterobacteriáceas toxigénicas todavía encuentra dificultades metodológicas, el de los rotavirus ha superado la mayoría de los obstáculos.

Para demostrar la presencia de rotavirus se han empleado diversas técnicas. La mi-

croscopia electrónica (6) es ya clásica, y si bien la visualización de los viriones es relativamente exacta y sencilla, el alto costo del equipo y la tecnología que demanda el método limitan su uso general. Otras técnicas como la fijación del complemento (7), la contrainmuno-electroosmoforesis (8), y la inmunofluorescencia (9), son menos sensibles o presentan dificultades de índole técnica. El radioinmunoensayo en fase sólida (10) tiene una alta sensibilidad, pero su ejecución requiere reactivos costosos de una vida media corta y un contador de centelleo, que es un aparato costoso y generalmente no disponible en muchos centros asistenciales y laboratorios de diagnóstico. Recientemente se ha desarrollado el ensayo inmuno-sorbente enzima conjugada (ELISA) (11) para el diagnóstico de rotavirus (12), cuyo fundamento es el siguiente: las proteínas en condiciones apropiadas de pH se adhieren a la superficie de polivinilo. Sobre la proteína adsorbida se lleva a cabo una reacción antígeno-anticuerpo y a este complejo se le añade un reactivo consistente en un conjugado de inmunoglobulina-nafosfatasa alcalina. **El conjugado tiene una gran**

¹ Instituto de Investigaciones en Salud (IN ISA), Universidad de Costa Rica y Ministerio de Salud, San Jose, Costa Rica.

² Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

³ Laboratory of Infectious Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland, E.U.A.

así como una gran actividad enzimática. Una vez que el conjugado ha reaccionado con su antígeno, se adiciona un substrato apropiado cuya hidrólisis por la fosfatasa alcalina genera un color fácil de distinguir visualmente y cuantificable espectrofotométricamente. La sensibilidad de la técnica es equivalente a la del radioinmunoensayo y tiene la ventaja de que no requiere reactivos o aparatos costosos para su ejecución.

El propósito de este trabajo es el de evaluar el ELISA en una investigación epidemiológica en la cual se analizan muestras fecales. El método de comparación es la microscopia electrónica, y la evaluación abarca tanto la sensibilidad en el diagnóstico del agente vírico, como costo, tiempo y otros detalles operativos de ambos métodos.

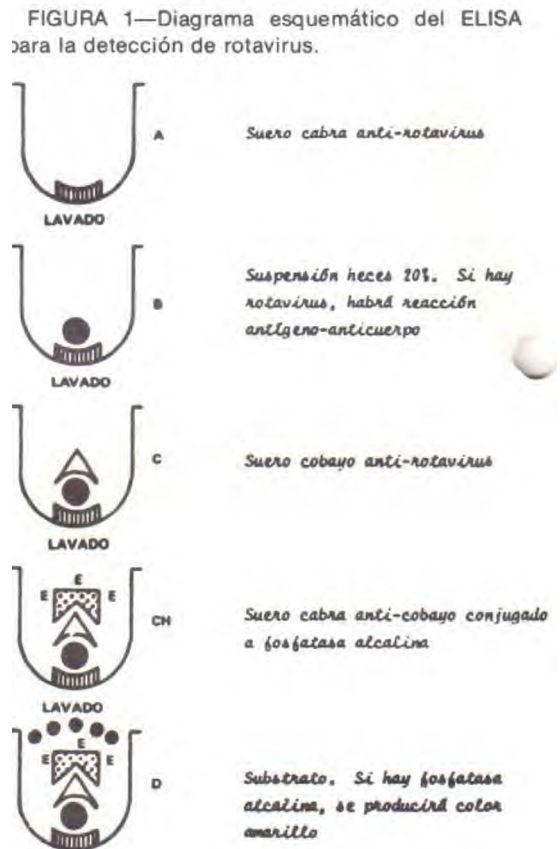
Materiales y métodos

Se estudiaron 247 niños con diarrea atendidos en los Servicios de "Lactantes 2", "Lactantes B" y "Emergencias" del Hospital Nacional de Niños de Costa Rica, entre enero de 1976 y febrero de 1977. La edad de los niños estuvo comprendida entre 0 y 24 meses. Las características de la población y otros detalles del estudio han sido previamente descritos (13). Con las muestras se prepararon sendas suspensiones al 20% en caldo de infusión de cerebro y corazón adicionado con albúmina sérica bovina al 0.5%, las que fueron almacenadas a -70°C hasta el momento de su diagnóstico.

Microscopia electrónica. La técnica para la identificación de partículas víricas con microscopio electrónico, descrita por Flewett *et al.* (6), fue modificada en nuestro laboratorio (13). Básicamente las suspensiones de heces se trataron con partes iguales de fluorocarbón (Genesolv) y se centrifugaron a 4,000 rpm (2,000 x G) en frío durante 30 minutos. Se separaron los sobrenadantes y con ellos se impregnaron rejillas de 200 mallas recubiertas previamente con una

membrana soporte de formvar; las rejillas se tiñeron luego con ácido fosfotúngstico al 2% a pH 5.5. Las preparaciones se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión (Hitachi HU-12A) por un tiempo promedio de 10 minutos y máximo de 40 minutos. La mayor parte de las muestras se habían tratado y examinado con microscopio electrónico con anterioridad a la ejecución del ELISA en el laboratorio. Los diagnósticos por ambos métodos se hicieron en forma independiente y ciega sin que el examinador conociera ni el estado de salud del niño ni el resultado obtenido con el método de comparación.

ELISA. Se realizó un ELISA de "doble sandwich" según modificación de uno de los autores (Yolken); la técnica fue la siguiente (figura 1):



a) En cada una de las 72 cavidades en "U" de bandejas microtiter descartables de polivinilo flexible (cooke), se depositaron 100 N.l de suero hiperinmune caprino antirotavirus diluido 1:100, 000 en solución amortiguadora de carbonato de pH 9.6. Se incubaron las bandejas a 4°C durante toda la noche. Luego de esta incubación y de cada una de las subsiguientes las bandejas se lavaron tres veces con solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.4, adicionada de 0.5 ml de Tween 20 por litro de solución (PBS-Tween).

b) Seguidamente se añadieron a cada una de las 72 cavidades 50 µl de PBS-Tween que contenía suero fetal bovino y suero normal de cabra, ibos al 1% (PBS-Tween-SFB-1%-SNC-1%) y luego se agregaron por duplicado 50 µl de suspensiones de heces al 20%. En cada bandeja se colocaron 33 muestras, un testigo positivo, un testigo negativo y un control salino. (Ver anexo). Las bandejas se incubaron a 4°C durante toda la noche.

c) Se adicionaron a cada cavidad 100 p.l de suero hiperinmune de cobayo antirotavirus para formar así el "primer sandwich"; este suero se diluyó 1:800 en PBS-Tween que contenía suero fetal bovino al 1% y suero normal de cabra al 0.5% (PBS-Tween-SFB-1%-SNC-0.5%). Las bandejas se incubaron a 37°C durante una hora.

ch) Se añadieron a cada cavidad 100 µ.l de suero hiperinmune de cabra anticovayo conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma) para producir el "doble sandwich". El conjugado se diluyó 1:400 en PBS-Tween-SFB-1%-SNC-0.5%. Las bandejas se incubaron a 37°C durante una hora.

d) Por último, se agregaron a cada cavidad 100 µl de p-nitrofenil fosfato (Sigma) en solución amortiguadora de dietanolamina a pH 9.8.

e) Transcurridos 30 minutos a 37°C se dejó "Yuvo la reacción adicionando 50pI de NaOH 3N a cada cavidad, y se comparó visualmente el color de las cavidades con los controles positivo y negativo. Las muestras rotavirus-positivas produjeron un color amarillo intenso distinguible a simple vista.

Bloqueo del ELISA. Algunas muestras que produjeron un color intermedio entre los controles positivo y negativo se clasificaron como dudosas y requirieron una prueba de bloqueo para su diagnóstico definitivo. El bloqueo se hizo tratando tales muestras con a) suero convaleciente de ternero experimentalmente infectado con rotavirus mano y b) suero fetal bovino. Si la muestra

fuese rotavirus-positiva los anticuerpos an-

tirrotavirus del suero convaleciente se ligarían al antígeno y la reacción de color en el ELISA quedaría bloqueada. Por otro lado, el suero fetal bovino, por estar exento de concentraciones medibles de anticuerpos, no tendría efecto sobre la muestra positiva y al final de la reacción se generaría el color amarillo (no hay bloqueo).

Por el contrario, si la muestra fuese rotavirus-negativa, ni el suero convaleciente ni el suero fetal bovino tendrían efecto alguno, y en ninguno de los dos casos se produciría color. Otra posibilidad es que una muestra desarrolle color luego de ser tratada con ambos sueros, lo que podría deberse a una alta concentración de partículas víricas que no fueren neutralizadas por anticuerpos antirotavirus del suero convaleciente. Diluciones apropiadas de dicha muestra confirmarían el hecho. En el cuadro 1 se ilustran las tres posibilidades.

CUADRO 1—Prueba de bloqueo del ELISA en muestras dudosas por rotavirus en niños con diarrea del Hospital Nacional de Niños de Costa Rica, 1976-1977.

Muestra No.	Prueba de bloqueo			
	ELISA (preliminar)	Suero fetal bovino	Suero convaleciente	ELISA (definitivo)
090	± ^a	- ^a	-	-
271	±	+ ^a	-	+
413	±	-	-	-
565	±	+	-	+
576	±	-	-	-
622	±	+	-	+
643	±	-	-	-
657	±	+	-	+
659	±	+	-	+
662	±	+	-	+
541b	-	-	-	-
653 (20%) ^c	+	+	+	+
653 (2%) ^c	+	+	-	+
653 (0.2%) ^d	-	-	-	-

^a + = positivo; ± = dudoso; - = negativo.

^b Testigo negativo; esta y todas las muestras precedentes, concentración al 20%.

^c Testigo positivo; concentración entre paréntesis.

^d El mismo testigo anterior, pero diluido 10 veces.

Los siguientes fueron los pasos seguidos en la prueba de bloqueo:

- Ciento veinticinco microlitros de la muestra dudosa se depositaron en cada uno de dos tubos que contenían, el primero 125 μ l de suero convaleciente, y el segundo, 125 μ l de suero fetal bovino, ambos diluidos 1:5 en PBS-Tween-SFB-1%-SNC-1%.
- Después de dos horas de incubación a 37°C, se transfirieron de cada tubo 100 p.l por duplicado en cavidades de bandejas microtiter previamente recubiertas con anticuerpo caprino antirrotavirus. A partir de este paso se continuó el ELISA como ya se describió.

Resultados

De 247 muestras de niños con diarrea, 59 fueron positivas por rotavirus según el ELISA y 10 resultaron dudosas. A estas se les hizo la prueba de bloqueo y resultaron seis positivas y cuatro negativas.

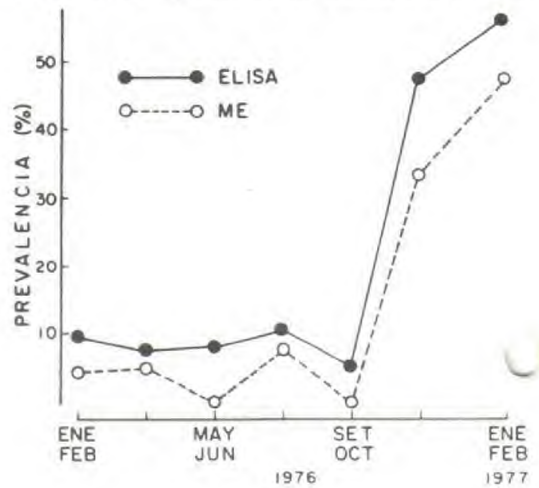
El cuadro 2 compara los resultados obtenidos por microscopía electrónica y ELISA. Por microscopía electrónica, el 20.6% de los casos fue rotavirus-positivo y por ELISA, el 26.3%. Así, en 14 de 247 casos (5.7%) no se detectaron rotavirus por microscopía electrónica. Los extractos fecales de una submuestra de estos 14 casos se sometieron a ultracentrifugación a 39,000 x G durante 30 minutos volviendo a suspenderse el material centrifugado en 100 μ l de PBS para

CUADRO 2—Diagnóstico de rotavirus en niños con diarrea según Microscopía Electrónica (ME) y ELISA.

	ME positiva		ME negativa		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%
ELISA positivo	51	20.6	14	5.7	65	26.3
ELISA negativo	0	0	182	73.7	182	73.7
Total	51	20.6	196	79.4	247	100.0

$$\chi^2 = 179.9; p < 0.001$$

FIGURA 2—Prevalencia bimestral de rotavirus según microscopía electrónica y ELISA, 1976-1977.



observar con microscopio electrónico. En ninguna preparación se visualizaron rotavirus. Paralelamente, a las 14 muestras se les practicó la prueba de bloqueo del ELISA, y todas ellas se confirmaron como rotavirus-positivas.

En la figura 2 se ha dibujado la prevalencia bimestral de rotavirus según microscopía electrónica y ELISA. Puede apreciarse que la demostración de los virus por el ELISA fue mayor que por la microscopía electrónica tanto en los meses endémicos como en los epidémicos. Si se le asigna a la microscopía electrónica una sensibilidad^d igual a la unidad, el ELISA demuestra tener una sensibilidad de 1.27.

Conclusiones

En esta investigación el ELISA detectó 14 (5.7%) infecciones por rotavirus que no se diagnosticaron por la microscopía electrónica, aún después de concentración ulterior por ultracentrifugación. Para visualizar los viriones con el microscopio electrónico se requiere una concentración de partículas del orden de 10^7 o más por gramo de heces, que deben estar relativamente intactas

para que sean reconocibles. Por el contrario, en una reacción antígeno-anticuerpo, el número mínimo de rotavirus requerido para evidenciar el agente parece ser menor; aparentemente la inmunoglobulina específica puede reaccionar con fragmentos o componentes antigénicos, además de partículas completas. La diferencia apuntada probablemente explique la mayor sensibilidad del ELISA frente a la microscopia electrónica para detectar rotavirus.

Otras ventajas del ELISA son los bajos costos de operación, ya que se calculó que cada muestra por duplicado costaba aproximadamente EUA\$0.30 en 1977. A los sueros antirrotavirus que todavía no existen en forma comercial se les asignó un valor nominal de EUA\$40.00 por ml. Por el contrario, la inversión económica en equipo para la microscopia electrónica y para el radioinmunoensayo es muy alta.

El tiempo de ejecución favorece claramente al ELISA ya que el estudio de 250 muestras requirió aproximadamente 40 horas de trabajo de un técnico de laboratorio subprofesional supervisado por un profesional universitario, esto es, 10 minutos por muestra. Por el contrario, cada suspensión de heces al 20%, requirió que se clarificara, se colocara sobre una rejilla recubierta de formvar y se tiñera para finalmente, observarla al microscopio electrónico por un período promedio de 10 minutos. Así, procesar 250 muestras ocupó 125 horas de trabajo de dos técnicos subprofesionales y de un profesional universitario. El tiempo promedio por muestra fue de 30 minutos. Cabe hacer notar que experiencias posteriores han demostrado que es posible aumentar la eficiencia en el tiempo de ejecución del ELISA. Así, se ha comprobado que se pueden procesar alrededor de mil muestras por semana, disminuyendo aún más los costos del método.

La microscopía electrónica era hasta hace poco el único medio diagnóstico de rotavirus y se utilizó como método de referencia en la evaluación de opciones. El uso

del microscopio electrónico queda limitado a laboratorios especializados, mientras que el radioinmunoensayo, importante por su alta sensibilidad y posibilidad de masificación, tiene un alto costo y es relativamente lento. El ELISA está destinado a desplazar totalmente al radioinmunoensayo en el estudio de rotavirus y otros agentes infecciosos, así como de sus anticuerpos. Para el ELISA no se requieren aparatos costosos y se evitan los inconvenientes de trabajar con material radioactivo. La sensibilidad del ELISA (equivalente a la del radioinmunoensayo) y su sencillez de ejecución lo hacen el método de elección para estudios epidemiológicos en el momento actual. Así, la técnica es ideal para determinar la correlación que guardan los rotavirus con otros agentes bacterianos y parasitarios y su papel relativo en la etiología de la diarrea.

Resumen

Se estudiaron muestras de heces de 247 niños con diarrea admitidos en el Hospital Nacional de Niños de Costa Rica. Se investigó la presencia de rotavirus por medio de microscopia electrónica de transmisión (MET) y del ensayo inmunosorbente enzima-conjugada (ELISA). La sensibilidad al ELISA fue mayor que MET ($X^2 = 179.9$, $p < 0.001$); en 5.7% de los casos se encontró antígeno de rotavirus sin que se visualizaran partículas viricas por MET. El ELISA es de ejecución más simple y más barato que MET, por lo que parece ser el método óptimo para el estudio de grandes cantidades de muestras. O

Agradecimiento

Esta investigación se financio en parte con fondos de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT). Los autores agradecen la coopera-

cion de los Dres. Edgar Mohs y Cecilia Lizano y de la enfermera Julieta León, del Hospital Nacional de Niños, Costa Rica. Asimismo expresan su reconocimiento a los Sres. Francisco Gamboa y Roberto Padilla, del INISA, Universidad de Costa Rica.

REFERENCIAS

- (1) Puffer, R.R. y C. Serrano. *Características de la mortalidad en la niñez. Informe de la Investigación Interamericana de la Mortalidad en la Niñez*. Organización Panamericana de la Salud. Publicación Científica 262, Washington, D.C., 1973. 492 págs.
- (2) Sack, R.B., S.L. Gorbach, J.G. Banwell, B. Jacobs, B.D. Chatterjee y R.C. Mitra. Enteroto-xigenic *Escherichia coli* isolated from patients with severe cholera-like disease. *J Infect Dis* 123:378-385, 1971.
- (3) Gorbach, S.L., J.G. Banwell, B.D. Chatterjee, B. Jacobs y R.B. Sack. Acute undifferentiated human diarrhea in the tropics. 1. Alterations in intestinal microflora. *J Clin Invest* 50:881-889, 1971.
- (4) Bishop, R.F., G.P. Davidson, I.H. Holmes y B.J. Ruck. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* 2:1281-1283, 1973.
- (5) Flewett, T.H., A.S. Bryden y H.A. Davies. Virus particles in gastroenteritis. *Lancet* 2:1497, 1973.
- (6) Flewett, T.H., A.S. Bryden y H.A. Davies. Diagnostic electron microscopy of the faeces. I. The viral flora of the faeces as seen by the electron microscope. *f Clin Pathol* 27:603-608, 1974.
- (7) Kapikian, A.Z., W.L. Cline, C.A. Mebus, R.G. Wyatt, A.R. Kalika, H.D. James, D. VanKirk, R.M. Chanock y H.W. Kim. New complement-fixation test for the human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. *Lancet* 1:1056-1061, 1975.
- (8) Middleton, P.J., M. Petric, C.M. Hewitt, M. T. Szymanski y J.S. Tam. Counterimmuno-electro-osmophoresis for detection of infantile gastroenteritis virus (orbi-group) antigen and antibody. *f Clin Pathol* 29:191-197, 1976.
- (9) Yolken, R.H., R.G. Wyatt, A.R. Kalica, H. W. Kim, C.D. Brandt, R.H. Parrott, A.Z. Kapikian y R.M. Chanock. Use of a free viral immunofluorescence assay to detect human reovirus-like agent in human stools. *Infect Immun* 16:467-470, 1977.
- (10) Kalica, A.R., R.H. Purcell, M.M. Sereno, R.G. Wyatt, H.W. Kim, R.M. Chanock y A.Z. Kapikian. A microtiter solid phase radioimmunoassay for detection of human reovirus-like agent in stools. *J Immunol* 118: 1275-1279, 1977.
- (11) Engvall, E. y P. Perlmann. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. *f Immuno*, 109:129-135, 1972.
- (12) Yolken, R.H., H.W. Kim, T. Clem, R.G. Wyatt, A.R. Kalica, R.M. Chanock y A.Z. Kapikian. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. *Lancet* 2:263-267, 1977.
- (13) Mata, L., C. Lizano, F. Hernández, E. Mohs, L. Herrero, M.E. Peñaranda, F. Gamboa y J. León. Agentes infecciosos en la diarrea del niño hospitalizado en Costa Rica. *Bol Med.-Hosp Infant Mex* 34:955-969, 1977.
- (14) Voller, A., D. Bidwel y A. Bartlett. Microplate enzyme immunoassays for the immunodiagnosis of virus infections. En: *Manual of Clinical Immunology*. Rose N. y H. Friedman (Eds.). American Society of

ANEXO 1

Conjugado de inmunoglobulina-fosfatasa alcalina, sueros, controles y otros reactivos

- *Conjugado inmunoglobulina-fosfatasa alcalina:* Su preparación se basó esencialmente en el método de Voller et al. (14).
- *Suero fetal bovino (SFB):* Rehatuin, Reheis Chem. Co., Kankakee, Illinois.
- *Suero de cabra anti-cobayo:* Antibodies, Inc., Davis, California.
- *Suero de cabra antirrotavirus y suero de cobayo antirrotavirus:* Preparado por R.H. Yolken, NIADID, NIH, Bethesda, Maryland, E.U.A.
- *Testigo positivo:* "Pool" de 15 extractos fecales rotavirus-positivo por microscopía electrónica y ELISA. Se determinó una dilución de trabajo apropiada diluyendo al 2% en caldo infusión cerebro y corazón adicionado con albú

mina bovina al 0.5%.

- *Testigo negativo:* "Pool" de 15 extractos fecales negativos tanto por ELISA como por microscopía electrónica. Se hizo una dilución en igual forma que para el control positivo.
- *Solución amortiguadora de carbonato, pH 9.6:* Disolver 1.59 g de Na_2CO_3 , 2.93 g de NaHCO_3 y 0.2 g de azida sódica; ajustar a pH 9.6 y llevar a un litro con agua destilada.
- *Solución amortiguadora de dietanolamina al 10%, pH 9.8:* Mezclar 97 ml de dietanolamina, 100 mg de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 0.2 g de azida sódica; ajustar pH a 9.8 y llevar a un litro con agua destilada. La solución debe estar a temperatura ambiente para ser utilizada.

Diagnosis of rotavirus by electronic microscopy and by enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) (Summary)

A study was made of feces of 247 children with diarrhea admitted to the National Children's Hospital of Costa Rica. Tests were made to determine the presence of rotavirus using transmission electronic microscopy (TEM) and the enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA). Sensitivity of ELISA was greater than

that of TEM ($X^2 = 179.9$, $p < 0.001$); in 5.7% of the cases rotavirus antigen was found where TEM had not shown any visible viral particles. ELISA is far simpler to perform and cheaper than TEM, and would therefore appear to be the best method for the study of large numbers of samples.

Diagnóstico de rotavirus por microscopia electrónica e o ensaio imunosorvente enzima-conjugada (ELISA) (Resumo)

Estudaram-se amostras de fezes de 247 crianças com diarreia que tinham sido baixadas ao "Hospital Nacional de Niños" na Costa Rica. Pesquisou-se a presença de rotavirus através da microscopia electrónica de transmissão (MET) e também do ensaio imunosorvente enzima-conjugada (ELISA). A sensibilidade ao ELISA foi

superior à MET ($X^2 = 179.9$, $p < 0.001$); encontrou-se em 5,7% dos casos antígeno de rotavirus mesmo sem que se visualizassem partículas víricas pela MET. O ELISA é de execução mais simples e é mais barato que a MET, razões pelas quais parece ser o método ótimo para o estudo de uma grande quantidade de amostras.

Diagnostic de rotavirus par microscopie électronique et le titrage avec immuno-adsorbant lié a une enzyme (ELISA) (Résumé)

On a étudié des échantillons de matières fécales de 247 enfants atteints de diarrhée et admis à l'Hôpital National Infantile de Costa-Rica. On a recherché la présence de rotavirus par microscopie électronique de transmission (MET) et par titrage avec immuno-adsorbant lié à une enzyme (ELISA). La sensibilité à ELISA a été

supérieure à MET ($X^2 = 179.9$, $p < 0.001$); dans 5,7% des cas on a trouvé l'antigène de rotavirus sans avoir vu de particules virales par MET. Avec ELISA l'utilisation est plus simple et meilleur marché et c'est pourquoi elle semble être la méthode optimum pour l'étude de grandes quantités de prélèvements.

