

ARTICULOS ORIGINALES

GASTROENTERITIS POR ROTAVIRUS ESTUDIO COMPARATIVO DE LA INMUNOELECTROMICROSCOPIA (IEM) Y EL ENSAYO INMUNOENZIMATICO (ELISA)

HENRY HANSEN.*

Se presenta una evaluación de las técnicas del Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) y de la Inmunolectromicroscopía (IEM) empleadas en la detección de rotavirus en extractos de materias fecales de 72 pacientes con gastroenteritis viral. Se discuten las ventajas y desventajas de la incorporación de la proteína A de *Staphylococcus aureus* en las pruebas de Inmunolectromicroscopía.

En los últimos años han aparecido en la literatura médica gran cantidad de artículos, indicadores de que diversos agentes virales, como calicivirus, astrovirus y rotavirus, pueden causar gastroenteritis infecciosa (1, 2, 3, 4). Aún más, estos últimos han demostrado ser los agentes etiológicos de casi el 20 por ciento de las gastroenteritis infecciosas agudas en niños menores de 5 años de edad. Asimismo, en países que tienen muy notables cambios estacionales, se ha encontrado que el porcentaje de gastroenteritis por rotavirus puede aumentar hasta un 50 por ciento en los meses fríos. (2, 3). La gran mayoría de los cuadros diarréicos causados por rotavirus no son graves, pero en algunos niños puede haber un desequilibrio hidroelectrolítico notable, que de no tratarse a tiempo, puede ocasionar la muerte. La gastroenteritis en los países en vía de desarrollo es un grave problema, por su alta frecuencia y por el hecho de ser una de las principales causas de mortalidad.

Dada la dificultad de aislar los rotavirus humanos en cultivos celulares, la detección de estos agentes infecciosos se ha basado

fundamentalmente en los procedimientos de Microscopía Electrónica (ME) e Inmunolectromicroscopía (IEM) y más recientemente en las técnicas de ensayo inmunoenzimático (ELISA).

Es objetivo principal del presente estudio el realizar un análisis evaluativo y comparativo entre la técnica de ELISA la de IEM, modificada mediante la incorporación de la proteína A de *Staphylococcus aureus*, en la detección de rotavirus en extractos de materias fecales de pacientes con gastroenteritis presumiblemente de origen viral.

MATERIALES Y METODOS

Pacientes

Se estudió un total de 72 pacientes, del Hospital Infantil del Centro Médico de Houston, todos los cuales habían sido remitidos de clínicas ambulatorias de la ciudad. El motivo de consulta había sido gastroenteritis. Todos los niños del presente estudio eran menores de 5 años y el 83% de ellos era menor de 2 años. El nivel socioeconómico de

* Actualmente en entrenamiento: Department of Virology and Epidemiology Baylor College of Medicine, Texas Medical Center, Houston, Texas 77030.

la mayoría de ellos era bajo y su origen esencialmente Méjico-Americano. El estudio se llevó a cabo entre los meses de septiembre de 1979 y febrero de 1980, comprendiendo esencialmente las estaciones de otoño e invierno, consecutivamente.

Preparación del antisuero antirotavirus y conjugación de la fracción de IgG

El antisuero antirotavirus se obtuvo mediante la inoculación de cobayos con el rotavirus de simio SA-11, previamente purificado de acuerdo con el procedimiento descrito por Hanssen *et al* (5). La fracción de inmunoglobulina G del antisuero de cobayo fue aislada por cromatografía en columna de Sephadex G-200 y fue posteriormente conjugada con fosfatasa alcalina (Calbiochem-Berhing, Corp. Ca. U.S.A.), usando el método de Avrameas (6), de unión de la enzima-anticuerpo por estrechamiento con glutaraldehído.

Ensayo Inmunoenzimático (ELISA)

El procedimiento se realizó esencialmente de acuerdo con la metodología de Voller (7), usando una fracción específica de anticuerpos de cobayo, con especificidad para los rotavirus simianos SA-11, como anticuerpos "capturadores" o anticuerpos adsorbidos a los microplatos de poliestireno. La fracción de inmunoglobulina G (IgG) de los mismos anticuerpos, conjugada a fosfatasa alcalina, se empleó como anticuerpos "detectores". Una representación esquemática del procedimiento se ilustra en la Figura 1. En resumen, los platos de poliestireno (NUNC-Roskilde, Denmark, code 2-62162) fueron cubiertos en sus pozos, con anticuerpos antirotavirus SA-11 en una dilución 1:800, en solución amortiguadora de carbonato (0,05M:pH. 9,6). Las placas se lavaron con solución salina de fosfatos (P.B.S.) con una concentración final de Tween-20 del 0,01%. Enseguida se añadieron los especímenes a examinar, los cuales consistían esencialmente en una suspensión de materias fecales de cada paciente, obtenida de la fase acuosa resultante de la extracción de los presuntos virus con freón-113. Cada muestra de materia fecal se examinó por

FIGURA 1
ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO O PRUEBA DE ELISA PARA LA DETECCIÓN DE ANTÍGENOS DE ROTAVIRUS EN ESPECÍMENES DE MATERIAS FECALES



duplicado y se incubó por un período de 4 horas a 37°C. Los platos se lavaron nuevamente y a cada pozo se le agregó el conjugado de IgG y la fosfatasa alcalina en una dilución 1:250. El conjugado se incubó por 1 hora a 37°C. Como substrato enzimático se utilizó dietanolamina (Calbiochem-Berhing, Corp., Ca. U.S.A.). La reacción se detuvo con una solución de hidróxido de sodio 1N. De cada muestra se hicieron lecturas de su absorbancia a 492nm en un espectrofotómetro Spectronic 21; Bauch and Lomb; Germany. Se consideraron como positivas para rotavirus las muestras de materia fecal que presentaron un valor de absorbancia a E-492, tres veces superior al control negativo (Pozos cubiertos con IgG normal de Cobayo). Durante todos los períodos de incubación, los platos fueron protegidos de la luz.

Inmunolectromicroscopía (IEM)

Se utilizó el método de Derrick, (8), modificado por Shukla y Gough (9), el cual esencialmente consiste en cubrir las rejillas para microscopía electrónica con una película de proteína A de *Staphylococcus aureus*, (Pharmacia, Ma. U.S.A.) en una concentración de 0,5 mg/ml.

Las rejillas fueron tratadas posteriormente con 5 microlitros de antisuero antirotavirus SA-11 en una dilución 1:100 durante 10 minutos. Las rejillas se lavaron con 30 gotas de agua destilada estéril. A continuación se colocaron sobre ellas, los especímenes a examinar (5 microlitros), los cuales se incubaron con el anticuerpo adsorbido a la rejilla, por 10 minutos a temperatura ambiente. Las rejillas se lavaron con agua destilada y finalmente se tiñeron con acetato de uranilo pH. 4,5 y se observaron en un microscopio electrónico Hitachi Hs8. En cada experimento se incluyeron controles de rejillas no tratadas con proteína A y otras sin anticuerpo. El promedio de partículas fue calculado sobre 12 microfotografías tomadas al azar en tres cuadriláteros de cada una de las 4 rejillas por tratamiento. La Figura 2 ilustra esquemáticamente el procedimiento utilizado.

F I G U R A 2



Análisis Estadístico

El estudio comparativo de la detección de rotavirus mediante los procedimientos de ELISA y el atrapamiento de partículas por el uso combinado de Proteína A de *S. aureus* e inmunolectromicroscopía, se analizó estadísticamente mediante pruebas estandarizadas de X^2 .

RESULTADOS

El número de pacientes por mes y el porcentaje representativo sobre el total de casos, se presentan en la Tabla 1. Como puede observarse, el mayor número de casos se presentó en los meses de noviembre y

diciembre, coincidiendo con los meses de más bajas temperaturas registradas para la ciudad. La precipitación pluvial para estos meses no excedió el promedio anual. El menor número de casos fue observado en el mes de septiembre/79. La detección de rotavirus en todos los casos fue realizada mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA).

En todos los casos, identificados por ELISA como positivos para rotavirus, se realizó el estudio de microscopía electrónica, utilizando rejillas no tratadas (microscopía electrónica simple) tratadas con suero antirotavirus (Inmunolectromicroscopía) y tratadas con proteína A de *S. aureus* y anticuerpo adsorbido (inmunolectromicroscopía combinada). La Tabla 2 presenta los resultados correspondientes a dos muestras seleccionadas del total de muestras examinadas; nótese cómo el procedimiento combinado detecta un mayor número de partículas, en el orden de 10 a 100 veces más, que para los casos de microscopía electrónica e Inmunolectromicroscopía respectivamente, evidenciando un considerable aumento de la sensibilidad del procedimiento.

La inmunolectromicroscopía combinada siempre detectó mayor número de casos que la microscopía electrónica o la inmunolect-

TABLA N° 1

infecciones por Rotavirus: Hospital Infantil de Texas, Houston, Texas. Septiembre 1979-Febrero 1980

MES / AÑO	Nº DE CASOS	PORCENTAJE
Septiembre / 79	3	4,1
Octubre / 79	8	11,1
Noviembre / 79	23	32,0
Diciembre / 79	16	22,2
Enero / 80	12	16,8
Febrero / 80	10	13,8
TOTAL	72	100,0

* Diagnóstico realizado por prueba de Ensayo Inmunoenzimático (ELISA).

tromicroscopía, en todos los meses durante los cuales se realizó el estudio, como puede apreciarse en la Tabla 3. Asimismo, el procedimiento combinado mejoró considerablemente la habilidad para detectar los rotavirus por microscopía electrónica, haciéndola similar en su sensibilidad al procedimiento del ensayo inmunoenzimático (ELISA).

TABLA Nº 2

Número relativo de partículas de Rotavirus humano detectadas por diferentes tratamientos de la rejilla para Microscopía Electrónica

VIRUS	TRATAMIENTO	Nº de partículas	
		Rango	Promedio*
TC-23	No tratadas	0-13	4,2
	Antisuero Antirotavirus	11-32	21,0
	Proteína A ≠ Antisuero	1152-1845	1418,0
TC-52	No tratadas	198-733	316,0
	Antisuero Antirotavirus	918-3126	2275,0
	Proteína A ≠ Antisuero	13860-18105	16039,0

* El promedio fué calculado sobre 12 microfotografías tomadas al azar, en tres cuadriláteros de cada una de 4 rejillas por tratamiento.

TABLA Nº 3

Estudio comparativo de la detección de Rotavirus mediante los procedimientos de ensayo inmunoenzimático y atrapamiento de partículas por el uso combinado de proteína A de *Staphylococcus aureus* e Inmunolectromicroscopía (ELISA VERSUS IEM)

MES / AÑO	ELISA		M.E. *		I.E.M. *		I.E.M. ≠ PROTEÍNA A*	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Septiembre/79	3	4,1	0	0	1	1,3	3	4,1
Octubre /79	8	11,1	2	2,7	3	4,1	6	8,3
Noviembre/79	23	32,0	17	23,6	18	25,0	21	29,1
Diciembre /79	16	22,2	12	16,8	14	19,4	16	22,2
Enero /80	12	16,8	10	13,8	10	13,8	11	15,2
Febrero /80	10	13,8	6	8,3	6	8,3	10	13,8
TOTALES	72	100	47	65,2	52	71,9	67	94,3

* El uso combinado de proteína A de *S. aureus* e Inmunolectromicroscopía detectó 29,1% y 22,4% más casos que la Microscopía Electrónica y la Inmunolectromicroscopía respectivamente.

* Diferencias estadísticamente significativas en prueba de χ^2 con P menor o igual a 0,001 y 0,01.

El uso combinado de proteína A de *S. aureus* e inmunolectromicroscopía detectó 29,1% y 22,4% más casos que la microscopía electrónica y la inmunolectromicroscopía, respectivamente. En la Figura 3, parte A, se observan algunas partículas de rotavirus humanos detectadas por el procedimiento de microscopía electrónica simple. En la parte B de la misma figura aparece un agregado de partículas de rotavirus humano, que fueron captadas por el procedimiento de microscopía electrónica combinada (Proteína A - Microscopía electrónica).

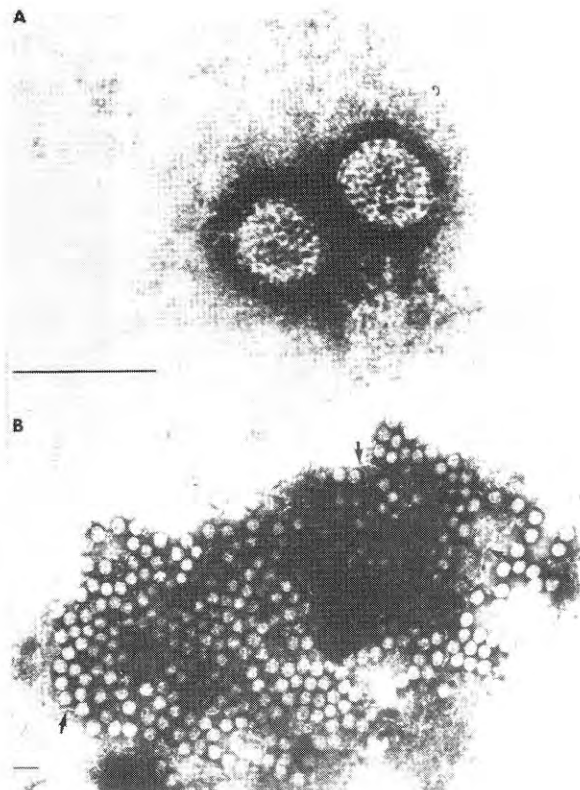


Figura 3. La parte A de la figura, ilustra dos partículas de rotavirus, detectadas por Microscopía Electrónica simple 95.000X.

La parte B de la figura, ilustra un grupo de partículas de rotavirus "captadas", por cedimiento de Microscopía Electrónica combinada (antisuero antirotavirus ≠ Proteína A de *S. aureus* 22.000X).

DISCUSION

La proteína A es uno de los principales componentes de la pared celular de las cepas de *Staphylococcus aureus*. Esta proteína fue inicialmente descrita por Verwey (10); actualmente cerca del 99% de las cepas de *S. aureus* posee proteínas A en su superficie. La proteína A se encuentra ligada covalentemente a la porción de péptido glican de la pared celular. Algunas cepas secretan del 8 al 30% de la proteína durante su crecimiento exponencial (11). Una de las mejores cepas productoras de proteínas A es la cepa Cowan I (American Type Collection - 12598).

La principal característica de la proteína, desde el punto de vista inmunológico, es su extraordinaria habilidad para unirse a las inmunoglobulinas, particularmente a la inmunoglobulina G. La proteína A es una cadena polipeptídica simple, de peso molecular 42.000 y no contiene carbohidrato (12). La molécula contiene 4 residuos de tirosina y no contiene triptofano. Se puede marcar fácilmente con yodo radio-activo (¹²⁵I) y posee tres regiones homólogas, con alta afinidad de unión a la porción Fc de las moléculas de inmunoglobulina.(13). La proteína A es estable al calor y a la presencia de detergentes no iónicos. La unión de la proteína A a las moléculas de inmunoglobulina G permite activar el complemento. (14).

El procedimiento de captación serológica de partículas de rotavirus humano, descrito en el presente informe, es un inmunoensayo en fase sólida, en el cuál los anticuerpos son unidos por intermedio de su porción Fc a la película de proteína A presente en las rejillas (15). La presencia de proteína A en el sistema incrementa considerablemente la eficiencia de la captación de las partículas virales por intermedio de los anticuerpos adsorbidos, ya que los sitios de enlace de las inmunoglobulinas con el antígeno quedan preferencialmente expuestos.

Cuando se desea aplicar este procedimiento combinado de inmuno-electromicroscopía es preciso determinar de antemano los parámetros que produzcan óptimos resultados, tales como dilución del

suero, tiempo de adsorción, concentración de proteína A y tipo de colorante utilizado. Cuando se establece una comparación entre el procedimiento corriente de microscopía electrónica y el procedimiento de captación serológica, las mayores ventajas que se revelan en este último son la simplicidad y la rapidez. El tiempo promedio que se requirió para examinar un espécimen fue de 2 minutos. El método también puede obviar la necesidad de concentrar especímenes de extractos crudos y adicionalmente, la especificidad del enlace antígeno-anticuerpo aumenta la confiabilidad del procedimiento. La capa de proteína presente en la rejilla previene la adsorción de contaminantes y permite preparaciones claras, aún cuando los extractos crudos se hayan dejado reaccionar por largo tiempo (18 horas). Todo esto resulta en la posibilidad de visualizar más fácilmente un menor número de partículas virales.

Cuando se utiliza el procedimiento corriente de microscopía electrónica se evidencia la presencia de algunas partículas de adenovirus y en otras ocasiones coronavirus. Sin embargo, este tipo de partículas no son observadas por el método de captación, sugiriendo por lo tanto, que éste es altamente específico. El presente y otros estudios, demuestran que el procedimiento de captación serológica permite detectar concentraciones de virus tan bajas como 10 ng/ml (16, 17, 18), lo cual hace que el método sea tan sensible como otros procedimientos de diagnóstico virológico, tales como el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). Los resultados del presente estudio, permiten concluir que el método de captación serológica alcanza los umbrales de detección del inmunoensayo enzimático (ELISA). Del total de 72 muestras examinadas y positivas por ELISA solamente en 4 especímenes no se pudo observar la presencia de partículas de rotavirus por el procedimiento de captación serológica. Pudiera ser que el inmunoensayo estuviese revelando estos 4 especímenes como falsos positivos por ELISA. Para descartar esta posibilidad se incluyeron en el método de ELISA, extractos fecales positivos y negativos previamente conocidos. Las 4 muestras negativas por inmuno-electromicroscopía combi-

nada y positivas por el método inmuno-enzimático fueron adicionadas y posteriormente incubadas independientemente con controles positivos y controles negativos; en seguida se añadió el substrato enzimático. Para cada uno de los 4 casos se observó un incremento cuantificable de la positividad del inmunoensayo enzimático realizado en estas condiciones, un incremento de la positividad en los controles positivos y una conversión del control negativo en positivo, revelando la presencia de antígenos cruzados en las 4 muestras.

Las principales ventajas del procedimiento combinado de inmuno-electromicroscopía y proteína A, son:

1. Simplicidad y rapidéz similares a ELISA y M. E.
2. Evita la concentración de especímenes.
3. Sensibilidad similar a ELISA o R.I.A.
4. Permite la detección de varios serotipos.
5. Previene la captación de otros tipos de virus.

El uso de esta metodología se ha venido extendiendo al diagnóstico de muchas otras infecciones virales de humanos y de animales, permitiendo una ampliación de su utilidad.

SUMMARY

A comparative study of the immunoenzymatic assay (ELISA) and immunoelectromicroscopy (IEM) in the detection of rotaviruses in the stools of 72 patients from the Texas Children Hospital at Houston is evaluated in this paper. A discussions of the advantages and disadvantages of the use of *Staphylococcus aureus* protein A in immunoelectromicroscopy diagnostic test is presented.

BIBLIOGRAFIA

1. Middleton P J, ET AL. Viruses associated with acute gastroenteritis in young children. *Am. J. Dis. Child.* 1969; 131: 733.
2. Hieber J P, et al. Comparison of human rotavirus disease in tropical and temperate settings. *Am. J. Dis. Child.* 1978; 131: 853.
3. Davidson G P, et al. Importance of new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lancet* 1975; 1: 242.
4. Rodriguez W J, et al. Clinical features of acute gastroenteritis associated with human like reovirus agent in infants and young children. *J. Pediat* 1977; 91: 188.
5. Hansen H, Escovar G. Detección de las infecciones de rotavirus por el método inmunocitoquímico de peroxidasa antiperoxidasa. *Acta Med. Col.* 1980; 4: 465.
6. Avrameas S, Ternynck and Peroxidase labeling antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. *Immunochimistry.* 1971; 17: 1175.
7. Voller A, et al. The enzyme linked Immunosorbent Assay. (ELISA). Flow line Publications. Guernsey, England, 1977.
8. Shukla D D and Gough. The use of protein A, from *Staphylococcus aureus*, in the immune-electron-microscopy for detecting plant virus particles. *J. Gen. Virol.* 1979; 45: 533.
9. Derrick K S. Quantitative assay for plant viruses using serologically specific electron microscopy. *Virology.* 1976; 56: 652.
10. Verwey E. A Type Specific antigenic protein derived from the *Staphylococcus*. *J. Exp. Med.* 1940; 71: 635.
11. Movitz J. Formation of extracellular protein of *S. aureus*. *Europ. J. of Biochem.* 1976; 68: 291.
12. Bjork L, et al. Some physicochemical properties of protein A of *S. aureus*. *Europ. J. of Biochem.* 1972; 29: 579.
13. Sjoedal J. Repetitive sequences in protein A from *S. Aureus*. Thre highly homologous Fc binding regions. *FEBS Lett.* 1976; 67: 62.
14. Sjoquist J et al. Protein A from *Staphylococcus aureus*. IX Complement Fixation Activity gamma globulin-protein A. *J. Immunol.* 1969; 103: 467
15. Fosgren A and J Sjoquist. Protein A from *Staphylococcus aureus*. Pseudo-immunoreaction with human globulin. *J. Immunol.* 1966; 97: 822.
16. Beier H and J Sherherd. Serological specific electron microscopy in the quantitative measurement of two isometric viruses. *Phytopathology.* 1978; 68: 533.
17. Askaa J and B Bloch. Detection of porcine rotavirus by EM, ELISA, and CIET. *Acta Vet. Scand.* 1981; 22: 32.
18. Poliwal Y C. Rapid diagnosis of barley yellow dwarfvirus in plants using serologically specific electron microscopy. *Phytopathology Z.* 1977; 89: 25