

**Título del trabajo:** “Ensayo de inmunocromatografía: una opción para el diagnóstico rápido y certero de rotavirus en materia fecal.”

**Autores:** Macedo R, Barril PA, Giordano MO, Nates SV.

**Lugar:** Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella”. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.

**Dirección postal:** Enfermera Gordillo Gómez s/n. Ciudad Universitaria. (5000) Córdoba. Tel. (0351) 4334022.

**Dirección electrónica:** [ricmacedo@hotmail.com](mailto:ricmacedo@hotmail.com)

**Teléfono:** Ricardo Macedo 0351 153516575

## **RESUMEN**

El objetivo del estudio consistió en evaluar la eficiencia de la técnica de inmunocromatografía (ICT, BioMeriéux) para la detección de rotavirus grupo A (RV-A), respecto a la técnica de referencia de electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE). Un total de 68 muestras de materia fecal fueron recolectadas de niños menores de 5 años que requirieron de atención médica en el Hospital Privado de Córdoba por un cuadro severo de gastroenteritis aguda, entre diciembre 2008 y septiembre 2009. Los resultados obtenidos por ambos métodos mostraron una concordancia del 91%. Se determinó para la prueba de inmunocromatografía una reproducibilidad del 100%, una sensibilidad y especificidad del 92% (84-99%, IC 95%) y 91% (78-100%, IC 95%), respectivamente y un valor predictivo positivo y negativo del 96% (90-100%) y 83% (67-98%), respectivamente.

Los resultados obtenidos indican que la ICT es una técnica rápida, sencilla y confiable que permite el diagnóstico de RV-A en laboratorios de baja complejidad y en situaciones que requieren la toma de decisiones médicas inmediatas como guardias y atención ambulatoria.

**Palabras claves:** Rotavirus, diarrea, inmunocromatografía, diagnóstico, materia fecal.

## **INTRODUCCION**

La infección por rotavirus del grupo A es la principal causa de diarrea severa infantil. Se estima que cada año se registran en el mundo 111 millones de episodios de gastroenteritis por rotavirus en niños menores de 3 años, derivando esto en 25 millones de consultas médicas, 2 millones de hospitalizaciones y alrededor de 600 000 muertes por deshidratación (1,2,3). Diferentes estudios han demostrado que la incidencia de la infección por rotavirus es similar en países desarrollados y en vías de desarrollo; sin embargo la enfermedad grave y muerte por rotavirus registra tasas significativamente más altas en países en desarrollo (2). Este hecho está ligado a las condiciones socio-económicas-culturales del niño infectado y de su entorno familiar, que determinan por un lado las condiciones sanitarias y el estado nutricional del hospedador y en consecuencia su capacidad de generar una respuesta inmune que limite la infección en curso, y por otro, la determinación y posibilidad de su entorno familiar de acceder a la consulta médica. Desde el año 2006 están disponibles en nuestro medio dos vacunas anti-rotavirus: una monovalente y otra multivalente (4,5). Los estudios de eficacia de vacuna llevados a cabo en diferentes partes del mundo han demostrado que ambas previenen la enfermedad grave por rotavirus (1,6,7,8). En nuestro medio la vacuna anti-rotavirus no está incorporada al calendario oficial de vacunación y por lo tanto su uso es muy limitado. Ante esta situación, cada año las cohortes de nacidos vivos quedan expuestas a la enfermedad por rotavirus. Así planteada nuestra realidad, la prevención de la enfermedad grave y muerte por rotavirus está sostenida por la consulta médica oportuna, un diagnóstico rápido y acertado de la infección y el tratamiento a tiempo con sales de rehidratación oral y/o parenteral del individuo infectado.

Existen técnicas rápidas y de muy baja complejidad para detectar rotavirus en materia fecal; una es la prueba de aglutinación de partículas de látex, cuya comercialización está discontinuada en nuestro medio y la otra es la prueba de inmunocromatografía (ICT). La prueba de ICT tiene la ventaja de ser un ensayo de baja complejidad, rápido y no requerir instrumental especial para su realización (9,10), pero existen datos contradictorios acerca de su comportamiento, principalmente referidos a su especificidad (11,12,13).

El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficiencia de la prueba de ICT (VIKIA Rota-Adeno bioMerièux) para la detección de rotavirus en muestras de materia fecal de niños menores de 5 años de edad con gastroenteritis aguda (GEA) que concurrieron a un centro privado de atención médica de la ciudad de Córdoba, Argentina. Como método de referencia se utilizó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE).

## **MATERIALES Y METODOS**

**Muestras clínicas:** Se recolectaron un total de 68 muestras de materia fecal de niños menores de 5 años con gastroenteritis aguda que requirieron atención en el Hospital Privado Centro Médico de la ciudad de Córdoba, Argentina, entre diciembre de 2008 y septiembre de 2009. Las muestras fueron conservadas a -20°C hasta su procesamiento.

**Inmunocromatografía (ICT-VIKIA):** La técnica se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante (BioMerièux).

Breve descripción del equipo diagnóstico: El soporte de reacción consiste en un dispositivo que posee una membrana de cromatografía que contiene, en una zona delimitada, un anticuerpo monoclonal anti-rotavirus (zona R) y un anticuerpo monoclonal anti-adenovirus (zona A); y en la zona de control, un anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón (zona C). El soporte en su totalidad está impregnado con un conjugado constituido por una mezcla de un anticuerpo monoclonal anti-rotavirus sobre microesferas de poliestireno de color azul y de un anticuerpo anti-adenovirus sobre microesferas de poliestireno de color rojo.

Procesamiento de la muestra: La materia fecal, previamente diluida en una solución tampón (provista en el equipo diagnóstico), se coloca en el pocillo “de muestra” (S) y migra por capilaridad a lo largo de la membrana. Si el/los antígenos virales están presentes en la muestra, se forma el complejo antígeno-anticuerpo-microesferas que migra y se fija a los anticuerpos anti-rotavirus y/o anticuerpos anti-adenovirus, según corresponda al antígeno detectado, visualizándose una banda azul en la zona R (muestra positiva para rotavirus) y/o roja en la zona A (muestra positiva para adenovirus) o en ambas zonas (R y A) si es una co-infección rota-adenovirus.

**Técnica de Referencia:** Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), revelado por tinción argéntica.

Extracción de RNA viral: Se prepararon suspensiones al 10% en 0.02 M Tris-HCl (pH 7.2) de cada materia fecal y el genoma de rotavirus (RNA de doble cadena) fue extraído por el método fenol-cloroformo y posterior precipitación con alcohol etílico (14).

**PAGE:** El RNA viral extraído se diluyó con 15 ul de buffer Phydria (0.02 M Tris-HCl pH 7.4, 0.3 M NaCl, 0.01 M MgCl<sub>2</sub>, 0.1% SDS, 5 mM EDTA, 4% sucrosa, 0.04% azul de bromofenol) y se sembró en una matriz de poliacrilamida al 10% preparada en un soporte vertical (cuba Mini-protean Tetra, BioRad Laboratories). Se realizó la corrida electroforética utilizando un buffer de corrida pH 8.9 (0.3% Tris, 1.44% Glicina, 0.1% SDS) durante 1 h a 60 mA. Los fragmentos de RNA fueron visualizados por tinción argéntica siguiendo el procedimiento de Herring y col (15). En esta matriz, el genoma segmentado de los rotavirus revela un perfil electroforético particular, caracterizado por la distribución de las 11 porciones génicas en cuatro grupos: el primero agrupa los 4 de mayor peso molecular, el segundo agrupa 2, el tercero 3 y el cuarto 2 porciones génicas. Este patrón electroforético es “la huella digital” de los rotavirus grupo A.

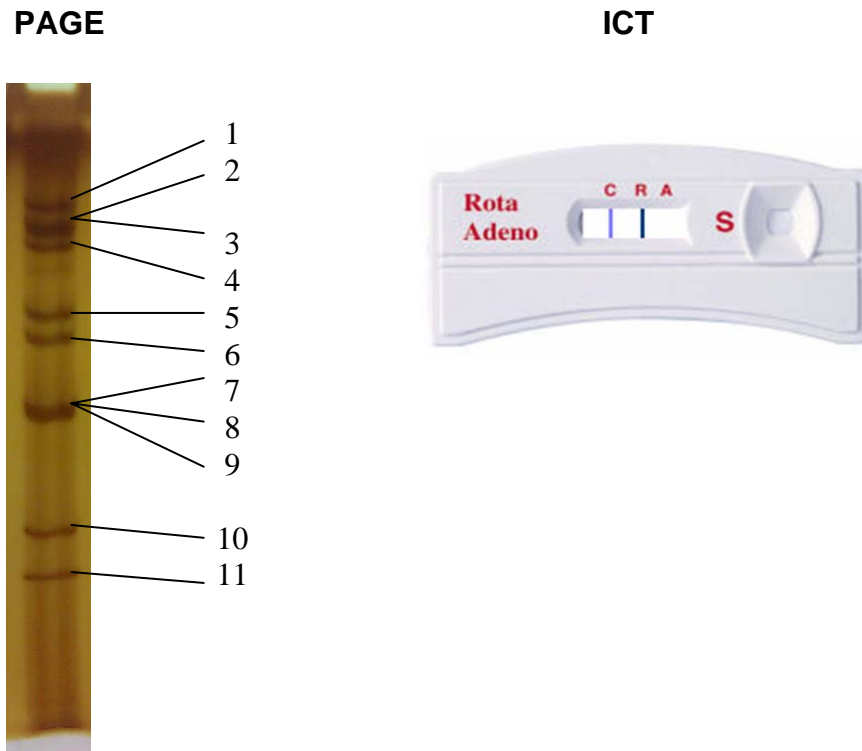
## **RESULTADOS**

En la Fig. 1 se muestra el patrón genómico característico de rotavirus revelado por la técnica de PAGE y la imagen de una reacción de ICT positiva para rotavirus. Del total de muestras ensayadas (n=68), 47 (66.2%) resultaron positivas para rotavirus por PAGE y 45 (63.2%) por ICT; 6 muestras revelaron resultados discordantes: 4 positivas por PAGE y negativas por ICT (falsos negativos), y 2 muestras negativas por PAGE y positivas por ICT (falsos positivos) (Tabla 1).

La concordancia de resultados entre ambas técnicas diagnósticas fue del 91% (62/68) y la reproducibilidad de resultados por ICT fue del 100%.

En base a los resultados se estimó para la técnica de ICT una sensibilidad y especificidad del 92% y 91%, respectivamente y valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN) del 96% y 83%, respectivamente (Tabla 2)

**Figura 1.** Detección de rotavirus grupo A mediante las técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) e inmunocromatografía (ICT).



PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida. Se observa el patrón electroforético característico de rotavirus: 11 segmentos génicos, distribuidos en 4 grupos de bandas.

ICT: Inmunocromatografía. Se observa una banda nítida color azul oscuro que denota la reacción positiva para rotavirus.

**Tabla 1.** Detección de rotavirus en materia fecal por las técnicas de Inmunocromatografía (ICT) y Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

		PAGE		
		POSITIVOS	NEGATIVOS	Total
ICT	POSITIVOS	43	2	45
	NEGATIVOS	4	19	23
	Total	47	21	68

**Tabla 2.** Características diagnósticas de la prueba de ICT VIKIA-bioMérieux

% Sensibilidad (95% IC)	92 (84-99)
% Especificidad (95% IC)	91 (78-100)
VPP (95% IC)	96 (90-100)
VPN (95% IC)	83 (67-98)

La técnica de ICT permitió también detectar la presencia de adenovirus en las muestras analizadas (4/68, 5.9%).



## **DISCUSION**

Los rotavirus son los agentes etiológicos no bacterianos más importantes de gastroenteritis aguda infantil y un alto porcentaje de los pacientes con GEA provocada por rotavirus requieren internación (16,17,19). En un estudio realizado en la ciudad de Córdoba en el año 1998 se estimó que las infecciones por rotavirus son responsables de un tercio de las diarreas que requieren hospitalización y del 84% de los casos de diarrea viral (18).

Frente a la magnitud del impacto que genera la infección por rotavirus en la atención médica hospitalaria, la implementación del diagnóstico para este virus es una herramienta de suma utilidad.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la ICT VIKIA (bioMeriéux) es un método confiable para el diagnóstico de rotavirus, en coincidencia con resultados de estudios realizados en Francia por otros grupos de trabajo (11,12). Es interesante analizar que 2 de los 4 resultados falsos negativos obtenidos por ICT correspondieron a muestras fecales recolectadas al quinto día del inicio del episodio de diarrea, tiempo en el que la excreción viral es baja. Esto destaca la importancia de obtener la muestra dentro de los primeros días del inicio de la enfermedad diarreica, cuando la excreción viral es máxima. Respecto a los resultados falsos positivos por ICT (n=2), no se pudo determinar alguna causa asociada. No obstante, según instrucciones del fabricante, es importante puntualizar que el tiempo de lectura extendido a más de 15 min. de iniciada la reacción de ICT, y la cantidad excesiva de heces, podrían generar resultados falsos positivos.

Es de destacar que el equipo diagnóstico evaluado también está configurado para la identificación de antígeno de grupo de adenovirus. Sin embargo hay que ser cautos

en la interpretación de estos resultados. Los adenovirus conforman un grupo viral con 55 serotipos, correspondiendo los serotipos 40 y 41 a adenovirus productores de diarrea (también denominados adenovirus entéricos). Así, un resultado positivo por ICT solo indica detección de adenovirus y no serotipos. Este resultado positivo requiere ser interpretado en el contexto clínico-epidemiológico del paciente. Esto cobra especial importancia en individuos inmunocomprometidos, en los cuales es frecuente la reactivación de adenovirus respiratorios, que se excretan con alta carga viral en materia fecal (20). La eficiencia de la técnica de ICT para la detección de adenovirus no fue evaluada debido al bajo número de muestras que resultaron positivas.

La posibilidad de realizar un diagnóstico etiológico rápido, certero y simple de rotavirus posibilita el tratamiento oportuno y adecuado del paciente (21), evitando así la administración innecesaria de antibióticos y alerta a los contactos, de la infección en curso.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. **Glass R.** New hope for defeating rotavirus. *Scientific American*. 2006; 294(4): 46-51, 54-55
2. **Parashar, U., Gibson, Ch., Bresee, J., and Glass, R.** Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerging Infectious Diseases*. 2006; (12): 304-306.
3. **Ramig, R.** Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *Journal of Virology*. 2004; 78 (19): 10213-10220.
4. **Dennehy P.** Rotavirus Vaccines: an Overview. *Clinical Microbiology Reviews*. 2008; 21(1): 198-208
5. **Dinleyici EC, Kurugol Z.** 6th World Congress of the World Society for Pediatric Infectious Diseases (WSPID). *Expert Rev Vaccines*. 2010; 9(3):261-272.
6. **Malek MA, Curns AT, Holman RC, Fischer TK, Bresee JS, Glass RI, Steiner CA, Parashar UD.** Diarrhea- and rotavirus-associated hospitalizations

among children less than 5 years of age: United States, 1997 and 2000. *Pediatrics*. 2006; 117(6):1887-1892.

**7. Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI.** Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis*. 2003; 9(5):565-72.

**8. Steele AD, Patel M, Parashar UD, Victor JC, Aguado T, Neuzil KM.** Rotavirus vaccines for infants in developing countries in Africa and Asia: considerations from a world health organization-sponsored consultation. *J Infect Dis*. 2009; 200 (1): 63-69.

**9. Lee SY, Hong JH, Lee SW, Lee M.** Comparisons of latex agglutination, immunochromatography and enzyme immunoassay methods for the detection of rotavirus antigen. *Korean J Lab Med*. 2007; 27(6):437-41.

**10. Weitzel, T., Reither, K., Mockenhaupt, F., Stark, K., Ignatius, R., Saad, E., Seidu-Korkor, A., Bienzle, U., and Schreier, E.** Field evaluation of a rota- and adenovirus immunochromatographic assay using stool samples from children with acute diarrhea in Ghana. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007; 45 (8):2695-2697.

**11. Bon F, Kaplon J, Metzger MH, Pothier P.** Evaluation of seven immunochromatographic assays for the rapid detection of human rotaviruses in fecal specimens. *Pathol. Biol*. 2007; 55 (3-4): 149-153.

**12. De Rougemont A, Kaplon J, Billaud G, Lina B, Pinchinat S, Derrough T, Caulin E, Pothier P, Floret D.** Sensitivity and specificity of the VIKIA Rota-Adeno immuno-cromatographic test (bioMérieux) and the ELISA IDEIA Rotavirus kit (Dako) compared to genotyping. *Pathol. Biol*. 2009; 57 (1): 86-89.

**13. Téllez, C., Montava, R., Ribes, J., Tirado, M., Buesa, J.** Evaluación de dos equipos inmunocromatográficos comerciales para el diagnóstico rápido de la infección por rotavirus. *Revista Argentina de Microbiología*. 2008. 40: 167-170.

**14. Perry R, La Torre J, Kelly D, Greenberg J.** On the lability of poly (A) sequences during extraction of messenger RNA from polyribosomes. *Biophys. Acta*. 1972; 262: 220-226.

**15. Herring, A., Inglis, N., Ojeh, C., Snodgrass, D., and Menzies, J.** Rapid Diagnosis of Rotavirus Infection by Direct Detection of Viral Nucleic Acid in Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Journal of Clinical Microbiology*. 1982, 16 (3): 473-477.

**16. Carneiro N, Diniz-Santos D, Fagundes S, Neves L, Reges R, Lima E, Oliva Quadros V, de Jesus Soares L, Silva F, Schneiter H, Figueiredo I, Silva L.** Clinical and epidemiological aspects of children hospitalized with severe rotavirus associated gastroenteritis in Salvador, BA, Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2005; 9(6):525-528

**17. Parada Ricart E, Inoriza Belurze JM, Plaja Roman P.** Acute gastroenteritis: the cost of an ambulatory care sensitive condition]. *An Pediatr (Barc)*. 2007; 67(4):368-373.

- 18. Giordano M, Ferreira L, Isa MB, Martínez LC, Yudowsky SI, Nates SV.** The epidemiology of acute viral gastroenteritis in hospitalized children in Córdoba city, Argentina: an insight of disease burden. *Revista del Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo.* 2001; 43(4): 193-197.
- 19. López-de-Andrés A, Jiménez-García R, Carrasco-Garrido P, Alvaro-Meca A, Galarza PG, de Miguel AG.** Hospitalizations associated with rotavirus gastroenteritis in Spain, 2001-2005. *BMC Public Health.* 2008; (8): 109.
- 20. Dewar J, de Beer M, Elliott E, Monaisa P, Semanya D, Steele A.** Rapid detection of rotaviruses: are laboratories underestimating infection in infants?. *S. Afr. Med. J.* 2005; 95(7):494-5.
- 21. Echavarría M.** Adenoviruses in Immunocompromised Hosts. *Clin Microbiol Rev.* 2008; 21(4): 704-715.