

ARTICULO ORIGINAL

Sensibilidad y especificidad del método inmunocromatográfico utilizado para el diagnóstico de rotavirus

Sensibility and specificity of the immunochromatographic method used for rotavirus diagnosis

***Fariña N^{I,III}, Galeano ME^I, Martínez M^{II}, Ferreira R^{III}, Vega M^{III}, Espínola E^I, Parra GI^{II}, Figueredo L^{III}, Russomando G^I**

^IDepartamento de Análisis Clínicos y Microbiología, ^{II}Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción. ^{III}Laboratorio San Roque, Asunción-Paraguay

RESUMEN

El rotavirus (RV) es el principal agente viral causante de diarrea aguda en niños menores de 5 años y es responsable de aproximadamente el 6% de las muertes en este grupo etáreo, lo que conlleva la necesidad de utilizar métodos de diagnósticos rápidos y confiables.

El objetivo del estudio es evaluar la sensibilidad y especificidad del método inmunocromatográfico (ICG), en el que se basan muchos kits comerciales utilizados para el diagnóstico de rotavirus grupo A, tomando como referencia el método de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). Se seleccionaron muestras de heces de 317 pacientes con diarrea aguda que concurren a un laboratorio privado de mayo a noviembre del 2006, con pedido de análisis de rotavirus y todos los datos de los pacientes fueron manejados de manera confidencial. Se utilizaron kits de las marcas comerciales Operón simple (n=154) o SD Boline rotavirus (n=163), siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron conservadas en frío y remitidas al IICS para la realización de los estudios moleculares. La sensibilidad obtenida por el método ICG fue de 97,8% y la especificidad de 84%. La concordancia absoluta fue del 90%. Las muestras que dieron resultados discrepantes entre ICG y PAGE, fueron confirmadas por nRT-PCR, resultados que coincidieron con los obtenidos por PAGE. La sensibilidad del método ICG es muy buena, si bien la especificidad es moderada el método puede ser utilizado como screening para el diagnóstico rápido de rotavirus y sería aconsejable utilizar métodos más específicos como los moleculares para estudios epidemiológicos.

Palabras claves: rotavirus, inmunocromatografía, sensibilidad, especificidad.

ABSTRACT

The rotavirus (RV) is the major causative agent of acute viral diarrhea in children under 5 years old and is responsible for approximately 6% of the deaths in this age group making necessary the use of quick and reliable diagnosis methods. The aim of this study is to evaluate the sensibility and specificity of the immunochromatographic method (ICG) on which many commercial kits used for the diagnosis of A rotavirus group are based taking as a reference the polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Feces samples were collected from 317 patients with acute that attended a private laboratory from May to November, 2006 for rotavirus analysis. All the information of the patients was managed confidentially. Kits of the commercial brands simple Operón (n=154) or SD Boline rotavirus (n=163) were used strictly following the instructions of the manufacturers.

*Autor Correspondiente: **Dra. Norma Fariña**
Email: microbiologia@iics.una.py

Samples were maintained in cold and sent to the IICS for the performance of the molecular studies. The sensibility obtained by the method ICG was 97.8%, the specificity was 84% and the absolute concordance was 90 %. The samples that gave discrepant results between ICG and PAGE were confirmed by nRT-PCR that provided results similar to those obtained by PAGE. The sensibility of the ICG method is very good and though the specificity is moderated it can be used as screening for the quick diagnosis of rotavirus and it would be advisable to use more specific methods, as the molecular ones, for epidemiological studies.

Keywords: rotavirus, immunochromatography, sensitivity, specificity.

INTRODUCCIÓN

El rotavirus (RV) es considerado a nivel mundial el principal agente viral causante de diarrea aguda en niños menores de 5 años, siendo responsable del 10 al 60% de los casos (1,2). En el 2004, se estimó que la infección por rotavirus causó aproximadamente 527.000 muertes, predominantemente en países en desarrollo (2).

Los rotavirus pertenecen a uno de los nueve géneros de la familia Reoviridae. Su genoma está constituido de 11 segmentos de RNA de cadena doble (3). La partícula viral se compone de tres capas proteicas concéntricas, la interna compuesta de VP1, VP2 y VP3, la intermedia de VP6 y la externa de VP7 y VP4 (3,4).

Los rotavirus poseen tres especificidades antigénicas importantes, lo que permite su clasificación en grupos, subgrupos y serotipos (5). La especificidad de los grupos A, B, C, D, E, está determinada por la proteína VP6, los grupos A, B y C pueden infectar humanos, pero la gran mayoría de las infecciones son producidas por rotavirus del grupo A. Los rotavirus son excretados en concentraciones muy altas (>10¹² partículas/gramo), durante varios días en heces y vómitos de los individuos infectados (2,5).

La detección del rotavirus puede realizarse mediante numerosas técnicas entre ellas microscopía electrónica, inmunomicroscopía electrónica, electroforesis en gel de poliacrilamida para ARN genómico viral (PAGE), técnicas que permiten la detección de todos los grupos y pueden ser utilizadas para diagnóstico y estudios epidemiológicos, presentando alta especificidad y buena sensibilidad (6). En los laboratorios clínicos los métodos rápidos como pruebas de aglutinación de látex, enzoinmunoensayo e inmunocromatografía, son los más utilizados. Estos se basan en la identificación del antígeno viral VP6, (debido a que es el más abundante del virión) (3), presentando la limitación de detectar exclusivamente rotavirus del grupo A (7).

La literatura refiere valores muy variables de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo cuando se evalúan los diversos métodos diagnósticos de rotavirus, como aglutinación de látex, ELISA e inmunocromatografía de diversas marcas comerciales (8-11). Las más recomendadas para el diagnóstico son las basadas en inmunocromatografía, porque precisan menor cantidad de muestras, requiere menor entrenamiento previo del personal que la realiza y son más rápidas (12). La RT-PCR, se ha convertido en un instrumento diagnóstico utilizado principalmente en los estudios epidemiológicos (9).

Considerando la alta incidencia de esta infección y siendo causantes de aproximadamente 6% de las muertes en niños menores de 5 años (1,2), surge la necesidad de utilizar métodos rápidos y confiables para su diagnóstico, a fin de asegurar una terapia adecuada, por lo que el objetivo de este estudio es conocer la utilidad de uno de los métodos diagnósticos más utilizados actualmente en nuestro país, evaluando la sensibilidad y especificidad de dos kits comerciales que detectan rotavirus de grupo A; operon simple Rotavirus y SD Biotline rotavirus, basados en el método inmunocromatográfico y utilizando como referencia la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) de alta especificidad y como control para el gold standard la nested RT-PCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes. Se incluyeron en el estudio a todos los pacientes menores de 5 años y mayores de 20 años con diarrea aguda, ambulatorios o internados, que acudieron en forma consecutiva al Laboratorio San Roque de Asunción, con pedido de análisis de rotavirus en heces, de mayo a noviembre del 2006.

Detección de rotavirus en heces. Para la detección del antígeno de rotavirus en heces se utilizó el método inmunocromatográfico. En 154 muestras se utilizó el kit comercial de la marca Operón simple (Zaragoza, España) y en 163 de la marca SD Bioline rotavirus (Korea), siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante. En ambos casos las muestras de heces fueron tratadas primeramente con un diluyente para la extracción del antígeno de rotavirus y posteriormente colocadas en el dispositivo de la reacción. El método se basa en la utilización de anticuerpos monoclonales contra el antígeno VP6 del grupo A de rotavirus, unidos a partículas coloreadas y que durante su migración a través de la membrana son capturados por anticuerpos monoclonales específicos para rotavirus presentes en la misma. Los resultados fueron leídos a los 5 min. de incubación a temperatura ambiente, y en los casos positivos se observaron líneas coloreadas de diferente intensidad, según la concentración del antígeno

Métodos moleculares. Para la realización de los estudios moleculares, las muestras fueron conservadas en frío y remitidas al Laboratorio de Biología Molecular del IICS, donde fueron codificadas y almacenadas a -20°C hasta su procesamiento. Todas las muestras fueron analizadas para detectar la presencia del genoma de rotavirus mediante la extracción del RNA a partir de una suspensión fecal del 10% al 20% en 400 ul de PBS pH 7 tratada con SDS (dodecil sulfato de sodio) a una concentración final del 1%; subsiguientemente desproteinizada con un volumen equivalente de fenol-cloroformo (1:1), vortex y centrifugación a 12000 x g por 10 min. El RNA de la fase acuosa fue precipitado agregando 3 volúmenes de etanol absoluto en presencia de cloruro de sodio toda la noche a -20%. Luego de una centrifugación a 12000 x g por 10 minutos, el pellet fue disuelto en 50 ul de agua doble destilada estéril.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE): se agregaron 5 ul de buffer de corrida (0.0625M Tris-HCl pH 6.8, 5M urea, 5% 2-mercaptoetanol, 3% SDS 0,01% azul de bromophenol) a 10 ul de muestra. La separación electroforética de los segmentos de RNA doble cadena fue realizada en geles de poliacrilamida al 7.5% con un gel concentrador al 4.5% según lo descrito por Laemmli(13). Luego de 2 horas de electroforesis a 10W, el gel fue teñido con el método de tinción con plata de Sanguinetti (14).

Nested RT-PCR. Las muestras que mostraron resultados discordantes entre el método inmunocromatográfico y PAGE, fueron confirmadas por el método nested RT-PCR. Se extrajo el RNA viral con TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El gen codificante de la proteína VP4 fue retrotranscrito y amplificado utilizando un par de cebadores genéricos (Con2/Con3) (15) Luego, una segunda vuelta de PCR fue realizada con una mezcla de cebadores internos (P1A [8], P1B [4] y P2A [6] (16) Los amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 2%, teñidos con bromuro de etidio y observados bajo luz UV.

Análisis estadístico

Con el programa de análisis estadístico Epidat 2.0, se calculó la sensibilidad, especificidad y concordancia del método inmunocromatográfico con respecto al PAGE, considerado como estándar de oro.

RESULTADOS

Fueron incluidas en el estudio 317 muestras de heces provenientes de 124 pacientes pediátricos y 193 adultos. De las 317 muestras analizadas, 136 (42,9%) resultaron positivas para rotavirus por el método de PAGE (Tabla 1).

Sensibilidad del método inmunocromatográfico. Para determinar la sensibilidad, las 136 muestras positivas por PAGE, fueron evaluadas por el método inmunocromatográfico, de las cuales 133 muestras fueron positivas, dando una sensibilidad de 97,8%. En las tablas 2 y 3 se encuentran los valores de sensibilidad obtenidos para el método ICG, considerando separadamente cada marca comercial.

Especificidad del método inmunocromatográfico: Para determinar la especificidad las 181 muestras negativas por PAGE fueron evaluadas por el método inmunocromatográfico, de las cuales 152 muestras resultaron negativas, dando una especificidad de 84,0%. Los valores de especificidad obtenidos para el método ICG, teniendo en cuenta cada marca comercial se encuentran en las tablas 2 y 3.

Concordancia: El índice Kappa indicó que los resultados de detección de rotavirus por ICG y PAGE fueron concordantes en el 80% (IC 95%; 0.733-0.863) de los casos (Epidat 2.0). Se encontraron 29 falsos positivos y 3 muestras rotavirus positivas no fueron detectadas por ICG. Las mismas fueron examinadas por nested RT-PCR, la prueba de mayor sensibilidad, (15,16) homologando los resultados obtenidos por PAGE.

Tabla 1. Comparación de resultados obtenidos por el método inmunocromatográfico respecto a la Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (PAGE)

Método inmunocromatográfico	PAGE		
	Positivo	Negativo	
Positivo	133	29	162
Negativo	3	152	155
	136	181	317
	Sensibilidad	97,8%	
	Especificidad	84,0%	
	Concordancia bruta	90 %	

Tabla 2. Comparación de resultados obtenidos por el kit inmunocromatográfico marca OPERON respecto a la Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (PAGE)

OPERON	PAGE		
	Positivo	Negativo	
Positivo	79	13	92
Negativo	1	61	62
	80	74	154
	Sensibilidad	98,8%	
	Especificidad	82,4%	
	Concordancia bruta	90,9%	

Tabla 3. Comparación de resultados obtenidos por el kit inmunocromatográfico marca BIOLINE respecto a la Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (PAGE).

BIOLINE	PAGE		
	Positivo	Negativo	
Positivo	54	16	70
Negativo	2	91	93
	56	107	163
	Sensibilidad	96,4%	
	Especificidad	85,0%	
	Concordancia bruta	89,0%	

DISCUSIÓN

La sensibilidad del método ICG que obtuvimos, de 97,8% es muy buena y comparable con los valores obtenidos por Wilmelli et al que encontraron una sensibilidad de 99%, en cambio la especificidad obtenida, de 84% resulta baja cuando se la compara con lo reportado por el mismo autor (11). Sook Young et al evaluaron el método inmunocromatográfico de tres marcas comerciales Dipstick Rota, SAS Rota y ASAN Rota strip y han obtenido sensibilidades de 100%, 100% y 86,7% respectivamente y en cuanto a la especificidad valores de 95%, 95% y 87,5% respectivamente. La especificidad hallada en nuestro estudio es comparable a lo reportado en este trabajo, para la marca ASAN rota strip (12).

Cuando se analizaron separadamente los valores de especificidad, sensibilidad, obtenidas por las dos marcas comerciales utilizadas en nuestro estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

El valor del índice Kappa de 80% a 90% es considerado bueno cuando se compara la concordancia con un estándar de oro (17). El índice Kappa obtenido en nuestro estudio es de 80%, por lo que la concordancia entre el método ICG y el PAGE fue buena.

Las variaciones en sensibilidad y especificidad observadas en los diferentes trabajos en los que se evalúan los distintos métodos, aparentemente están relacionadas con factores tales como transporte y conservación de la muestra, tiempo entre colección y procesamiento, calidad de los anticuerpos de captura, presencia en la muestra de enzimas que degradan proteínas o ácidos nucleicos (8-12). Además la falta de un verdadero estándar de oro de excelente sensibilidad y especificidad hace que sean utilizados diferentes gold Standard en los diversos trabajos, que también podrían explicar la gran variabilidad de valores reportados.

El valor de una prueba diagnóstica depende no sólo de su sensibilidad y especificidad sino también de la prevalencia de la enfermedad en la población en la que se realiza la prueba (17).

De estudios previos sobre prevalencia de rotavirus en América Latina (6,18) y de la incidencia reportada en 8 años de estudio en nuestro país (19-22), se deduce una prevalencia previa del 30% para rotavirus. En este estudio la incidencia encontrada de 42,9%, fue bastante alta, debida probablemente a que fue realizada en el pico estacional.

Para que una prueba diagnóstica sea considerada buena prueba, debe permitir distinguir a los individuos enfermos de los que no presentan enfermedad, y al mismo tiempo debe ser segura, rápida, simple y no dolorosa (17). Teniendo en cuenta que para el diagnóstico individual se buscan pruebas sensibles(17), podemos concluir que el método de ICG puede ser utilizado como "screening" en el diagnóstico de rotavirus, ya que posee muy buena sensibilidad, es simple, rápido, no requiere de personal entrenado ni requiere de equipos especiales, posibilitando un diagnóstico en los servicios de urgencias, permitiendo la hidratación inmediata de los pacientes, el aislamiento de los infectados o portadores, evitando el uso innecesario de antibiótico.

Si bien la especificidad encontrada en nuestro estudio es moderada, los falsos positivos no constituyen un riesgo para el paciente, dado que el tratamiento convencional de la gastroenteritis por rotavirus es la rehidratación y el restablecimiento del equilibrio hidroelectrolítico. Para asegurar que una diarrea de origen bacteriano, que se dé concomitantemente con un falso positivo no quede sin cobertura antibiótica siempre que fuere necesaria, sería aconsejable realizar además coprocultivos en los casos en que la clínica del paciente así lo amerite.

Coincidimos con Sook Young Lee et al, en recomendar la utilización del método ICG en lugar de la aglutinación de látex para el diagnóstico rápido de rotavirus en los laboratorios clínicos, por ser un método que presenta mayor sensibilidad según lo refieren numerosas publicaciones(8,10-12). En el tamizaje epidemiológico se buscan pruebas específicas (17)

por lo que deberán emplearse pruebas de alta especificidad como PAGE y PCR (15, 16,23).

AGRADECIMIENTOS: *Agradecemos a la Dra. Margarita Samudio y a la Dra. María Eugenia Acosta por la colaboración en los análisis estadísticos.*

BIBLIOGRAFÍA

1. 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: 565-72.
2. Organization WH. Rotavirus vaccines. *Weekly epidemiological record* 2007; 32(82):285-96.
3. Estes ME. Rotaviruses and their replication. 4th ed. *Fields Virology*, ed. L.W. Wilkinson. 2001, Philadelphia. 1747-87.
4. Fischer T.K, Gentsch JR. Rotavirus typing methods and algorithms. *Rev Med Virol* 2004; 14(2):71-82.
5. Prasad BV. Structural studies on gastroenteritis viruses. *Novartis Found Symp* 2001;238: 26-37
6. Kane EM. The epidemiology of rotavirus diarrhea in Latin America. Anticipating rotavirus vaccines. *Rev Panam Salud Publica* 2004; 16(6):371-7.
7. Dormitzer PR. Rotavirus Enfermedades infecciosas. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R., Ed. 2006.
8. Ferreira TL, Becho MC, Bernardo AR, Branco Chavez TC, Ribeiro RS, Lima de JS et al. Performance of a latex agglutination test in the diagnosis of acute gastroenteritis by rotavirus. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2006;37:587-9.
9. Eing BR, May G, Baumeister HG, Kuhn JE. Evaluation of Two Enzyme Immunoassays for Detection of Human Rotaviruses in Fecal Specimens. *J. Clin. Microbiol.*2001; 39(12) 4532-34.
10. Rivera M, Vial P, Potin M, Parado P, Amarales P, Ryan M et al. Evaluación de cuatro métodos para detección de rotavirus en deposiciones en niños chilenos. *Rev. Chil. Pediatr.* 1995; 66(3); 150-5.
11. Wilhelmi I, Colomina J, Martín-Rodrigo D, Roman E, Sánchez-Fauquier A. New immunochromatographic method for rapid detection of rotaviruses in stool samples compared with standard enzyme immunoassay and latex agglutination techniques. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20(10):741-3.
12. 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;27:437-41.
13. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
14. Sanguinetti CJ, Dias Neo E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamida gels. *Biotechniques* 1994;17, 914-21.
15. Gouvea V, GlassRI, Woods P. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* 1990; 28(2): 276-82.
16. Gentsch JR, Glass RI, Woods P. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30(6): 1365-73.
17. Hulley SC. Diseño de un nuevo estudio: III. Pruebas diagnósticas. Edición española *Diseño de la Investigación Clínica*, ed. Doyma. 1993, Barcelona.
18. Gómez JA. Anticipating rotavirus vaccines: review of epidemiologic studies of rotavirus diarrhea in Argentina. *Rev Panam Salud Publica*, 1998. 3(2): 69-78.
19. Candia N, Parra GI, Chirico M, Velázquez G, Fariña N, Laspina F. Acute diarrhea in Paraguayan children population: detection of rotavirus electropherotypes. *Acta Virol*, 2003. 47; 137-40.
20. Parra GI, Martínez M, Amarilla A, Zunini M, Achucarro C, Martínez V et al. Incidence of rotaviral infection in Central and East Paraguay between 2002 and 2003: a single electropherotype detected. *Virus Reviews and Research* 2004; 9(1):73-6.
21. Amarilla A, Espinola E, Galeano ME, Fariña N, Russomando G, Parra GI., Rotavirus infection in the Paraguayan population from 2004 to 2005:high incidence of rotavirus strains with short electropherotype in children and adults. *Med Sci Monit* 2007; 13(7): 333-7.
22. Parra GI, Espinola E, Amarilla A, Stupka J, Martinez M, Zunini M et al. Diversity of group A rotavirus strains circulating in Paraguay from 2002 to 2005: detection of an atypical G1 in South America. *J Clin Virol* 2007; 40(2): 135-41.
23. Hammami S, Castro AE, Osburn BI. Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis, an enzyme-linked-immunosorbent assay, and an agglutination test for the direct identification of bovine rotavirus from feces and coelectrophoresis of viral RNA's. *J Vet Diagn Invest* 1990; 2:184-90.