

MÉTODO RÁPIDO DE DIAGNÓSTICO DE ROTAVIRUS EN HECES

MARÍA Z. SULBARÁN¹, ANTONIO J. MALDONADO² Y JESÚS W. BASTARDO²

¹*Departamento de Bioanálisis, Escuela de Ciencias,* ²*Postgrado en Biología Aplicada. Núcleo de Sucre. Cumaná, Universidad de Oriente, Estado Sucre, Venezuela.*

RESUMEN

Los rotavirus humanos (RVH) poseen un genoma de RNA bicatenario, formado por 11 segmentos que presentan una migración electroforética característica para cada cepa. La visualización de los patrones de migración de RNA viral en geles de poliacrilamida (PAGE) se ha vuelto un procedimiento común para la caracterización de las cepas de rotavirus y también como un método diagnóstico de infección viral. El objetivo de este trabajo fue buscar un método rápido de diagnóstico de rotavirus en heces de niños con diarrea aguda, utilizando las técnicas de extracción, separación y tinción descritos por otros autores. El mayor número de muestras positivas a rotavirus se obtuvo con el procedimiento de extracción descrito por Herring *et al.* (1982), la concentración del RNA viral con etanol absoluto (Sambrook *et al.*, 1989) y la tinción con plata (Herring *et al.*, 1982). La utilización de geles de poliacrilamida al 5% (Chudzio *et al.*, 1989), produjo resultados en menor tiempo. El método descrito resultó de gran especificidad y menor costo que los ensayos inmunoenzimáticos comerciales usados para el diagnóstico de RVH. La sensibilidad del método se probó con especímenes fecales provenientes de niños diarreicos recluidos en la sala de rehidratación del Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá" de Cumaná, Venezuela.

PALABRAS CLAVES: Rotavirus, Diagnóstico, Electro-foresis.

ABSTRACT

Human rotaviruses (HRV) possess a double-stranded RNA genome, formed by 11 segments that display a characteristic electrophoretic migrating pattern for each strain. The visualization of these viral RNA migration patterns in polyacrylamide gels (PAGE) has become a common procedure in order to characterize HRV strains, and also a method to diagnose viral infections. The purpose of this work was to look for a rapid method to diagnose rotaviruses in the feces of children with acute diarrhea by using extracting, separating and staining techniques described by other authors. The highest number of rotavirus positive samples was obtained with the extracting procedure described by Herring *et al.* (1982), the concentration of viral RNA with absolute ethanol (Sambrook *et al.*, 1989), and silver staining (Herring *et al.*, 1982). The use of 5% polyacrylamide gels (Chudzio *et al.*, 1989) produced results in the shortest time. The method described in this paper turned out to be of high specificity and of lower cost than the commercial immunoenzymatic tests used for the diagnosis of HRV. The sensitivity of the method was tested with stools from diarrheic children recluded in the rehydration room of the "Antonio Patricio de Alcalá" University Hospital in Cumaná, Venezuela.

KEY WORDS: Rotavirus, Diagnosis, Electrophoresis.

INTRODUCCIÓN

Los rotavirus humanos son los principales agentes etiológicos de gastroenteritis aguda infantil en países desarrollados y en vías de desarrollo (Blacklow and Greenberg, 1991, Richards and Crotty, 1995). Las partículas virales completas están formadas por tres capas proteicas que rodean al genoma viral (Estes, 1996). Entre las proteínas que destacan por su importancia antigénica están la VP6, que se encuentra en la capa intermedia, y la VP4 y VP7, ubicadas en la capa externa. La VP6 tiene dos

especificidades antigénicas: grupo y subgrupo (Saif y Jiang, 1994). A través de métodos serológicos y genéticos se ha logrado identificar siete grupos virales (de A a G) que infectan tanto a animales como a humanos. Entre ellos, el grupo A es considerado el más importante clínicamente por ser el más frecuente como causa de diarrea aguda en infantes y niños jóvenes (Bastardo, 1993). Esta misma proteína viral determina al menos dos diferentes subgrupos: subgrupo I y subgrupo II.

Los antígenos VP4 y VP7 determinan los serotipos, encontrándose hasta ahora en humanos ocho serotipos diferentes para VP4 (serotipo P) y diez para VP7 (serotipo

G), de los cuales del G1 al G4 son los más importantes en la epidemiología de las diarreas (Hoshino *et al.*, 1988, Taniguchi *et al.*, 1991, Woods *et al.*, 1992).

Muchas técnicas han sido empleadas para la detección e identificación de los rotavirus humanos: microscopía electrónica (Flewett *et al.*, 1974), inmunoensayo enzimático ELISA (Yolken *et al.*, 1977), neutralización (Thouless *et al.*, 1977), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Gouvea *et al.*, 1990) y la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) (Espejo *et al.*, 1977). Esta última técnica permite separar el genoma de RNA de los RVH en sus once segmentos, formando así patrones de migración (electroferotipos) característicos para cada cepa de rotavirus. PAGE también es importante en la detección y clasificación de los rotavirus atípicos (que no son del grupo A). A pesar de la diversidad de los electroferotipos existentes, se han diferenciado dos patrones de migración distintos: un patrón corto y un patrón largo, que se distinguen por la migración electroforética del segmento 11 del genoma viral. La técnica de PAGE se utiliza como herramienta epidemiológica y de diagnóstico en distintas partes del mundo (McCrae, 1987).

Debido a que los métodos de detección de los rotavirus (ELISA, Látex, RIA, Microscopía Electrónica, PCR) son costosos, se consideró necesario buscar alternativas diagnósticas más económicas basadas en los procedimientos de electroforesis en geles de poliacrilamida o agarosa. Para esto se combinaron los métodos de extracción y separación del RNA rotaviral descritos por Herring *et al.* (1982), Dolan *et al.* (1985) y Chudzio *et al.* (1989), de tal manera de buscar la combinación que por sus características de especificidad, tiempo y costo sea la más adecuada para la detección de rotavirus en cualquier Laboratorio Clínico que cuente con los equipos mínimos necesarios para llevarla a cabo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales:

I. SOLUCIONES, RECREATIVOS Y EQUIPOS:

1. *Buffer de acetato de sodio 0.1M (pH 5,0) que contiene sulfato de sodio dodecyl (SDS) al 1%.* 1,15g de acetato de sodio anhidro disuelto en 140ml de agua destilada (solución 0.1M), luego se añaden 60ml de ácido acético y 2g de SDS. Se ajusta a pH 5,0.

2. *Mezcla fenol-cloroformo (3:2).*

♦ *Preparación del fenol equilibrado*

En 20ml de agua bidestilada derretir 250g de fenol en baño de María a 65°C, añadir 250mg de 8-hidroxiquinolina y 200ml de buffer Tris-HCl 0.5M (pH 8,0), mezclar con agitador magnético por 15 a 20 minutos. Dejar en reposo hasta que se formen dos fases y luego descartar la fase superior por aspiración. Añadir 250ml de Tris-HCl 0.1M (pH 8,0), agitar por 15 a 20 minutos y descartar la fase superior. Realizar este último paso 2 veces más, al descartar por tercera vez la fase superior se le agrega 25ml de Tris-HCl 0.1M (pH 8,0) con b-mercaptoetanol al 0.2%.

♦ *Preparación del cloroformo*

El cloroformo consiste de 24 partes de cloroformo y 1 parte de alcohol isoamílico.

3. *Acrilamida 30% y Metabisacrilamida 0.8%.*

Acrilamida.....30g
Metabisacrilamida (MBA).....0.8g
Disolver la MBA en 20ml de agua destilada y la acrilamida en 40ml de agua destilada. Luego mezclar y enrasar a 100ml con agua destilada. Guardar a 4°C en frasco protegido de la luz.

4. *Lower Tris 1.5M, pH 8,8 (4X).*

Trisbase.....18.17g
Agua destilada.....80ml
Mezclar y ajustar a pH 8,8 con HCl 12N. Enrasar a 100ml con agua destilada.

5. *Upper Tris 0.5M, pH 6,8 (4X).*

Trisbase.....6.06g
Agua destilada.....80ml

Mezclar y ajustar a pH 6,8 con HCl 12N. Enrasar a 100ml con agua destilada.

6. *Buffer de corrida.*

Trisbase.....7.5g
Glicina.....36.0g
Mezclar todo y enrasar a 1 litro con agua destilada.

7. **Mezcla de disociación para RNA.**

Tris-HCl 0.5M, pH 6.8.....8ml
 Glicerina.....5ml
 SDS.....1g
 Azul de bromofenol.....10mg
 La mezcla se reparte en alícuotas y se almacena a -20°C.

8. **Persulfato de amonio 2%.**

Persulfato de amonio.....100mg
 Agua destilada.....5ml
 Preparar al momento de usar.

9. **Solución de nitrato de plata 12mM.**

AgNO₃.....0.82g
 Agua destilada.....400ml
 Preparar al momento de usar.

10. **Solución reveladora.** Solución de hidróxido de sodio 0.75M que contiene formaldehído 0.76%.
 NaOH.....7.5g
 Formaldehído 0.76%.....1.9ml
 Agua destilada.....250ml
 Disolver el NaOH en el agua destilada, después agregar el formaldehído. Se debe preparar al momento de usar.

11. **Buffer TN-Calcio (TN).**

Tris base.....6.06g
 NaCl.....5.08g
 CaCl₂.....1.47g
 Agua bidestilada.....1 L
 Ajustar el pH a 7,4 con HCl 1N. Conservar a 4 °C.

12. **N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina.**

13. **Ácido acético 1%.**

14. **Etanol 10% - ácido acético 5%.**

15. **Ácido acético 5%**

16. **Buffer de reducción.** Contiene Sulfato de sodio dodecyl 2%, urea 5M, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 4% en buffer Tris glicina.

◆ **Preparación del buffer Tris glicina.**

Tris base.....0.12g
 Glicina.....0.58g
 Mezclar y enrrasar a 10ml.

◆ **Preparación del buffer de reducción.**

SDS.....0.2g
 Urea.....3.003g
 Glicerol.....0.2ml
 2-Mercaptoetanol.....0.4ml
 Buffer Tris glicina.....6ml
 Mezclar todo y enrrasar a 10ml con buffer Tris glicina.

17. **Ácido nítrico 3.4mM**

HNO₃.....0.35ml
 Agua destilada.....200ml

18. **Carbonato de sodio 0.2M en formaldehído 2.2%.**

◆ **Preparación del formaldehído 2.2%**

Formaldehido.....2.2ml
 Agua destilada.....180ml
 Mezclar y enrrasar a 200ml con agua destilada.

◆ **Preparación de la solución de carbonato de sodio en formaldehído.**

Na₂CO₃.....4.24g
 Formaldehído 2.2%.....180ml
 Mezclar y enrrasar a 200ml con formaldehído 2.2%.

19. **Buffer de extracción.** Contiene Tris hidrocloreuro 0.02M (pH 7,4), NaCl 0.3M, MgCl₂ 0.01M, sulfato de sodio dodecyl 0.1%, EDTA 0.005M, sacarosa 4%, azul de bromofenol 0.04%) para una concentración final de 20%.

Tris hidrocloreuro.....0.03g
 NaCl.....0.17g
 MgCl₂.....0.02g
 SDS.....0.01g
 EDTA.....0.014g
 Sacarosa.....0.4g
 Azul de bromofenol.....0.004g
 Agua destilada.....7ml
 Mezclar y enrrasar a 10ml con agua destilada.

20. **Buffer TBE (Tris-borate 0.09M, EDTA 0.002M)**

Tris base.....54.5g
 Ácido bórico.....27.5g
 EDTA 0.5M (pH 8,0).....20ml

21. **Agarosa 1%.**
 Agarosa.....1g
 Buffer TBE.....100ml
22. **Bromuro de etidio (1µg/ml)**
23. Cámara de electroforesis para geles planos verticales. (Modelo PROTEAN II xi Cell, Bio. Rap, USA).
24. Cámara de electroforesis para geles planos horizontales. (Modelo 63178, SIGMA Chemical Company, USA).
25. Fuente de poder (Modelo 1000/500, Bio-Rad, USA).
26. Baño de María, Precisión Scientific Co. (PS), Modelo 66648, Chicago, USA.
27. Centrífuga Eppendorf (Brinkmann Instruments, Inc. Westbury, N.Y., USA).
28. Transiluminador U.V. (Modelo T1201, SIGMA Chemical Company, USA).
29. **Transiluminador de luz blanca.**

II. MUESTRAS FECALES

Para la comparación de los métodos se utilizaron cuatro (4) muestras controles positivas a rotavirus por ELISA, PAGE y Microscopía Electrónica (ME). Dos de ellas con baja concentración de RVH (A,C) y dos muestras con alta concentración de rotavirus (B,D), como se determinó por ME.

Para probar el método seleccionado, se utilizaron quince (15) muestras fecales provenientes de niños con diarrea aguda reclusos en la sala de rehidratación del hospital "Antonio Patricio de Alcalá" de Cumaná, Estado Sucre, Venezuela.

MÉTODOS

A. EXTRACCIÓN DEL RNA

A.1 Método de Herring *et al.*, 1982 (MEH): todas las muestras de heces fueron tratadas con una solución de acetato de sodio 0.1M que contenía sulfato de sodio dodecyl (SDS) al 1%. Luego se le añadió un volumen igual de una mezcla de

fenol-cloroformo y se agitó vigorosamente por 3 minutos. La emulsión resultante se centrifugó a 10.000 rpm por 20 minutos y del sobrenadante se separó 0.5µl. El RNA encontrado en el sobrenadante se concentró por el método de Sambrook *et al.* (1989), añadiendo etanol frío absoluto al sobrenadante en una relación aproximada de 2:1, se agitó y dejó toda la noche a 4°C. Luego se centrifugó, y el RNA precipitado se resuspendió en 50µl de la mezcla de disociación, que consiste en tris-HCl 0.5M, pH 6,8, glicerina al 0.76%, SDS 20% y azul de bromofenol.

A.2 Método de Dolan *et al.*, 1985 (MED): la muestra fecal se resuspendió en PBS y luego se le añadió el buffer de reducción que contiene SDS al 2%, urea 5M, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 4% en buffer Tris glicina. Esta mezcla se agitó vigorosamente y calentó a 68°C por 5 minutos, agitándose nuevamente.

A.3 Método de Chudzio *et al.*, 1989 (MECh): las muestras fecales fueron suspendidas en 500µl del buffer de extracción (tris hidrocloreuro 0.02M, pH 7,4, NaCl 0.3M, MgCl₂ 0.01M, SDS al 0.1%, EDTA 0.005M, sacarosa 4%, azul de bromofenol para una concentración final de 20%). Luego se añadió 500µl de fenol-cloroformo y se agitó por 30 a 60 segundos para homogeneizar la suspensión. Se centrifugó a 10.000 rpm por 10 minutos y se separó el sobrenadante, que contiene el RNA.

B SEPARACIÓN DE LOS SEGMENTOS DE RNA POR ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACILAMIDA Y DE AGAROSA

B.1 Geles de poliacrilamida 12% (Herring *et al.*, 1982). Se realizó una electroforesis vertical en geles planos de poliacrilamida 12%, durante toda la noche (entre 14 y 16 horas) a temperatura ambiente con una corriente constante de 30mA.

B.2 Geles de poliacrilamida 5% (Chudzio *et al.*, 1989). El gel plano se preparó a una concentración de 5% y la electroforesis vertical se dejó correr de 5 a 7 horas a temperatura ambiente con una corriente constante de 30mA.

B.3 Geles de agarosa 1% (Chudzio *et al.*, 1989). Se realizó una electroforesis horizontal en geles planos de agarosa 1% y la corrida se llevó a cabo a temperatura ambiente a 100V por 2 horas.

C TINCIÓN DE LOS GELES

C.1 Tinción con plata Herring *et al.*, 1982 (TPH).

Finalizada la corrida, los geles fueron lavados con agua bidestilada por 30 minutos, agitándose constantemente. Seguidamente se reemplazó por una solución de nitrato de plata 12mM por 30 minutos y luego se enjuagó dos veces con agua bidestilada. La etapa de reducción se llevó a cabo, por un máximo de 6 minutos, con una solución de hidróxido de sodio 0.75M que contiene formaldehído 076%, hasta que las bandas fueron claramente visibles. Para detener el revelado los geles se colocaron en ácido acético al 5%. Finalmente se fotografió el gel por luz transmitida usando una película Kodak TMX 135mm (asa 100).

C.2 Tinción con plata Dolan *et al.*, 1985 (TPD).

Después de la corrida los geles se lavaron con agua bidestilada, seguidamente se realizaron tres lavados con 200ml de etanol 10%-ácido acético 5% por 10 minutos. Luego se reemplazó por ácido nítrico 3,4mM por 5 a 10 minutos. Se descartó la solución anterior y se añadió nitrato de plata 12mM y se dejó por 30 minutos y luego se enjuagó dos veces, con carbonato de sodio 0,28M en formaldehído 2,2%. Después del segundo enjuague se dejó en esta solución hasta que aparecieron bandas discretas del RNA rotaviral. Esta solución fue removida y se le añadió ácido acético al 1%. Finalmente se fotografió el gel por luz transmitida usando una película Kodak TMX 135mm (asa 100).

C.3 Tinción con bromuro de etidio Chudzio *et al.*, 1989 (TBEChe). Los geles de agarosa se sumergieron en la solución de bromuro de etidio (1µg/ml) por 5 minutos, luego las bandas se visualizaron sobre un trasiluminador UV.

Buscando la combinación más idónea que permita la detección del RNA rotaviral en el menor tiempo posible y con la mayor sensibilidad, estos métodos de extracción, separación y tinción se combinaron de la siguiente manera:

- I. Se corrieron tres geles de poliacrilamida al 12% con cuatro muestras positivas preparadas con los métodos de extracción de Herring (MEH), Dolan (MED) y Chudzio (MECh). Cada gel, se coloreó con uno de los diferentes métodos de tinción: TPH, TPD y BECh.
- II. De igual manera se procedió al utilizar gel de poliacrilamida al 5%.
- III. En el gel de agarosa 1% se corrieron las mismas cuatro muestras utilizadas en la sección I y II y sólo se coloreó con TBEChe.

Después de realizar estas combinaciones se escogieron los procedimientos que dieron resultados más satisfactorios, para la conformación de un método rápido de detección de rotavirus en heces..

RESULTADOS

Al usar geles de poliacrilamida de diferentes concentraciones (5% y 12%) se obtuvieron los mismos resultados en la visualización de las bandas del genoma rotaviral.

Los distintos métodos de extracción del RNA viral comparados en este estudio, no mostraron la misma sensibilidad, notándose que los cuatro (4) controles positivos a RVH, revelaron su positividad por el MEH, mientras que por el MECh y el MED sólo tres (3) y dos (2) muestras respectivamente, resultaron positivas (TABLA D).

TABLA I. Comparación de los tres métodos diferentes de extracción de RNA: MEH, MED y MECh, con los distintos métodos de tinción (TPH, TPD y TBEChe) sobre cuatro muestras (A,B,C y D) positivas a rotavirus humanos. Las muestras fueron corridas en geles de poliacrilamida (5% y12%) y agarosa 1%.

GELES % (Tinción)	PAGE 12% y 5% (TPH)			PAGE 12% y 5% (TPD)			PAGE 12% y 5% (TBEChe)			AGAROSA 1% (TBEChe)		
	MEH	MED	MECh	MEH	MED	MECh	MEH	MED	MECh	MEH	MED	MECh
EXTRACCIÓN DE RNA ROTAVIRAL												
(Muestras)												
A	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-
B	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
C	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
D	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-

No hubo diferencia en la positividad debida a la concentración del gel de poliacrilamida

En cuanto a la tinción de los geles de poliacrilamida con nitrato de plata, el método descrito por Herring *et al.* (1982) fue el seleccionado debido a que las bandas se observaron en forma nítida y oscura sobre un fondo claro, sin manchas. Por el contrario, el método descrito por Dolan *et al.* (1985), produjo un fondo obscuro y manchado, que impidió la buena visualización de las bandas de RNA (Fig. 1).

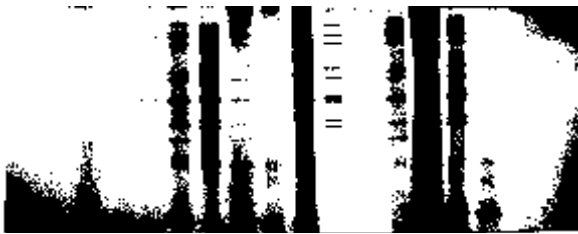


Figura 1. Electroferograma de RNA rotaviral de 15 muestras extraídas por el método de Herring *et al.*, 1982; provenientes de niños (0-5 años de edad) con diarrea aguda reclusos en el Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá". Gel de poliacrilamida 5%, teñido con nitrato de plata descrito por Herring *et al.*, 1982. La migración electroforética fue de arriba hacia abajo a corriente constante (30mA), temperatura ambiente durante 6 horas.

En geles de poliacrilamida teñidos con bromuro de etidio, todas las muestras fueron positivas a RVH por el MEH, dos fueron positivas por el MECh y ninguna resultó positiva por el MED. Resultados similares se obtuvieron en el gel de agarosa 1% teñido con TBECh (TABLA I).

Después de escogido la combinación más idónea de medio de soporte y tinción (gel de poliacrilamida al 5% descrito por Chudzio *et al.* 1989, tinción con plata descrita por Herring *et al.* 1982), se realizó corridas electroforéticas para probar los tres métodos de extracción de RNA rotaviral.

Los tres métodos de extracción del RNA rotaviral, probados en quince muestras de heces provenientes de niños con diarrea aguda mostraron una positividad similar, Herring (10), Dolan (9) y Chudzio (10). (Fig. 1, 2 y 3). Se podría decir que en términos de detectar presencia o no, los tres métodos serían de utilidad en el diagnóstico de infección rotaviral. Sin embargo, podemos observar que por el método de Herring *et al.* 1982 se obtienen bandas intensas y bien definidas del genoma rotaviral con excepción de aquellas muestras débilmente positivas. Son este tipo de muestras las de mayor interés, ya que un método poco eficiente de extracción no proporcionaría suficiente RNA rotaviral para ser detectado por PAGE, dando como resultado final un diagnóstico incorrecto y por lo tanto un paciente pediátrico mal tratado. El método

de extracción de Chudzio *et al.* (1989) y en especial el método de Dolan *et al.* (1985) extraen menor cantidad de RNA ya que producen bandas más claras que por el método de Herring *et al.* (1982).

Figura 3. Electroferograma de RNA rotaviral de 15 muestras extraídas por el método de Chudzio *et al.*, 1989; provenientes de niños (0-5 años de edad) con diarrea aguda reclusos en el Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá". Gel de poliacrilamida 5%, teñido con plata descrito por Herring *et al.*, 1982. La migración electroforética fue de arriba hacia abajo a corriente constante (30mA), temperatura ambiente durante 6 horas.

Figura 2. Electroferograma de RNA rotaviral de 15 muestras extraídas por el método de Dolan *et al.*, 1985; provenientes de niños (0-5 años de edad) con diarrea aguda reclusos en el Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá". Gel de poliacrilamida 5%, teñido con plata descrito por Herring *et al.*, 1982. La migración electroforética fue de arriba hacia abajo a corriente constante (30mA), temperatura ambiente durante 6 horas.

Finalmente, se encontró un método rápido y muy sensible basado en el procedimiento de extracción de Herring *et al.* (1982), concentración del RNA viral con etanol descrito por Sambrook *et al.* (1989), electroforesis vertical en geles planos de poliacrilamida al 5% según Chudzio *et al.* (1989) y tinción con nitrato de plata de acuerdo al procedimiento de Herring *et al.* (1982).

DISCUSIÓN

Para fines diagnósticos se podría utilizar el gel de poliacrilamida de menor concentración (5%) ya que produce resultados en menor tiempo (5h) y abarata los costos considerablemente.

El MEH mostró mayor sensibilidad al permitir la detección de rotavirus humanos de las cuatro muestras positivas utilizadas. Los otros métodos de extracción presentaron problemas para detectar las muestras de baja concentración rotaviral (A y C), en especial, el MED. Este hecho hace pensar que la extracción con fenol-cloroformo pudiera ser esencial para la extracción de suficiente cantidad de RNA rotaviral y así obtener mayor positividad a rotavirus (Kasempimolporn *et al.*, 1989).

La poca sensibilidad de detección del RNA viral en las muestras con baja concentración de RVH, por el método de Dolan *et al.* (1985) y Chudzio *et al.* (1989), puede deberse también a que estos procedimientos no incluyen la concentración del RNA con etanol absoluto frío durante toda la noche, propuesta por Sambrook *et al.* (1989).

La tinción de los geles de poliacrilamida con nitrato de plata descrita por Herring (TPH) ofreció mejores resultados que el TPD, sin embargo, Dolan *et al.* (1985) usó esta coloración y no reportó los inconvenientes encontrados en la presente investigación.

A pesar de las diferencias que presentaron los geles de poliacrilamida teñidos con plata y los teñidos con bromuro de etidio, es conveniente mencionar que el MEH permitió clara positividad en ambos geles, esto lleva a pensar que se podría utilizar la coloración de bromuro de etidio en geles de poliacrilamida y así se reduciría a un máximo el tiempo de tinción (de aproximadamente 1,5 horas a 5 minutos). Sin embargo, el bromuro de etidio es un poderoso mutágeno, es tóxico y requiere de una descontaminación después de usarse. Además, usando esta tinción es indispensable el uso de una lámpara de luz ultravioleta y la exposición a la misma es peligrosa, en particular a los ojos. No obstante, si se tienen las debidas precauciones y se cuenta con todos los equipos necesarios para una protección integral del individuo, es recomendable el uso de bromuro de etidio y luz UV, por tratarse de una técnica valiosa para el diagnóstico de infección rotaviral en un tiempo mucho menor.

Aún cuando los métodos simplificados de extracción MED y MECh serían una salida al problema del factor tiempo para el diagnóstico rotaviral, se correría el riesgo que aquellas muestras con poca cantidad del genoma viral no sean diagnosticadas.

La ventaja de PAGE y electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, es su sensibilidad y también por el hecho de que provee información acerca de las cepas de rotavirus que circulan en una comunidad y de las mezclas electroforéticas, que no pueden ser detectadas por ensayos comerciales.

En términos de adaptabilidad al laboratorio clínico, la técnica basada en la extracción del RNA rotaviral descrita por Herring *et al.* (1982), concentración del RNA con etanol frío descrito por Sambrook *et al.* (1989), separación del RNA por electroforesis en geles de poliacrilamida al 5% descrito por Chudzio *et al.* (1989) y la tinción con nitrato de plata descrita por Herring *et al.* (1982) es el método recomendado en este estudio por ser útil, confiable y sensible para el diagnóstico rotaviral y además ofrece una alternativa para el diagnóstico rápido de la infección por rotavirus, lo cual es indispensable para la orientación del tratamiento.

BIBLIOGRAFÍA

- BASTARDO, J. (1993). *Rotavirus y Gastroenteritis: Una Re-seña con Énfasis en la Epidemiología, Inmunidad y Tratamiento de la Enfermedad*. Editado por la Coordinación de Publicaciones del Rectorado de la Universidad de Oriente, Cumaná, Estado Sucre, Venezuela, pp 210.
- BLACKLOW, N. AND GREENBERG, H. (1991). Viral gastroenteritis, Review Article. *New. Engl. J. Med.*, 325:252-264.
- CHUDZIO, T., KASATIYA, S., IRVINE, N. AND SANKAR-MISTRY, P. (1989). Rapid screening test for the diagnosis of rotavirus infection. *J. Clin. Microbiol.*, 21:753-758.
- DOLAN, K., TWIST, E., HORTON-SLIGHT, P., FORRER, C., BELL, L., PLOTKIN AND CLARK, H. (1985). Epidemiology of rotavirus electropherotypes determined by a simplified diagnostic technique with RNA analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 21:753-758.
- ESPEJO, R., CALDERON, E. AND GONZALEZ, N. (1977). Distinct reovirus-like agents associated with acute infantile gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.*, 6:502-506.
- ESTES, M. (1996). *Rotaviruses and their replication*. Fields Virology. Third Edition edited by B.N Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, et al. 1625-1655.
- FLEWETT, T., BRYDEN, A., DAVIES, H., WOODE, G.,-BRIDGER, J. AND DERRICK, J. (1974). Relationship between virus from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *LANCET.*, 2:61-63.
- GOUVEA, V., DE CASTRO, L., DE CARMO TIMENETSKY, M., GREENBERG, H. AND N. SANTOS. (1994). Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J. Clin Microbiol.*, 28:276-282.

- HERRING, A., INGLIS, N., OJEH, C., SNODGRASS, D. AND MERIZIES, J. (1982). Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Clin. Microbiol.*, 16:473-477.
- HOSHINO, Y., SAIF, L., SERENO, M., CHANOCK, R., AND KAPIKIAN, Z. (1988). Infection immunity of piglets to either VP3 or VP7 outer capsid protein confers resistance to challenge with a virulent rotavirus bearing the corresponding antigen. *J. Virol.*, 62:744-748.
- KASEMPIMOLPORN, S., LOUISRIROTCHANAKUL, S., SINARACHATANANT, P., AND WASI, C. (1988). Polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining for detection of rotavirus in stools from diarrheic patients in Thailand. *J. Clin. Microbiol.*, 26(1):158-160.
- MCCRAE, M. (1987). Nucleic acid-based analyses of nongroup A rotaviruses. *CIBA. Found. Symp.*, 128:24-48.
- RICHARDS, M. AND CROTTY, B. (1995). Infectious diarrhoea revisited. *Med. J. Australia.*, 162:314-317.
- SAIF, L. AND JIANG, B. (1994). Nongroup A rotaviruses of humans and animals. In: R. F. Ramig. Ed. Rotaviruses. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 185:339-371.
- SAMBROOK, J., FRIESTCH, E. AND MANIATIS, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- TANIGUCHI, K, URASAWA, T., KOBAYASHI, N., AHMED, M., ADACHI, N., CHIBA, S., AND URASAWA, S. (1991). Antibody response to serotype-specific and cross-reactive neutralization epitopes on VP4 and VP7 after rotavirus infection or vaccination. *J. Clin. Microbiol.*, 29:483-487.
- THOULESS, M. BRYDEN, A., FLEWETT, T., WOODE G, BRIDGER, J. SNODGRASS, D. AND HERRING, J. (1977). Serological relationships between rotaviruses from different species as study by complement-fixation and neutralization. *Archs. Virol.*, 53:287-294.
- WOODS, P. A., GENTSCH, J., GOUVEA, V. ET AL. (1992). Distribution of serotypes of human rotavirus in different populations. *J. Clin. Microbiol.*, 30:781-785.
- YOLKEN, R., KIM, H., CLEM, T., WYATT, G., KALICA, A., CHANOCK, R. AND KAPIKIAN, A. (1977). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. *Lancet.*, 2:236-266.