

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

SENSIBILIDAD DE TRES DISTINTOS METODOS PARA DETERMINAR ROTAVIRUS EN HECES

T E S I S
Que Para Obtener el Título de:
Q U I M I C O
P r e s e n t a

REBECA ELSA G. GARCIA ESCARTIN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

M t. 1877



Agradezco al Dr. Romilio Espejo T.
su asesoría y ayuda en este trabajo;
así mismo al Dr. Jaime Martuscelli
por haberme permitido trabajar en -
su laboratorio.

Por mis padres:

Quienes me dieron la vida y la
manera de disfrutarla.

A mi Mani y Frank.

Por su existencia que hace
bella la mia.

Mamá to
Tilli y Pipo

Que con su cariño y comprensión
me han ayudado a llegar hasta aquí.

Por el cariño que me han dado.

A mis Tios Amado e Ines.

Con una gran admiración y un gran
afecto a la familia Pintado de Wit, -
especialmente Carlos y Anita.

A Chema:

Por todo lo que me ha enseñado
Por unas alas.

PRESIDENTE,	PROF.	OSCAR AMOR DODERO
VOCAL	"	CONSUELO HIDALGO MONDRAGON
SECRETARIO	"	GERARDO KONO Y
1er. SUPLENTE	"	SALVADOR MARTIN SOSA
2 SUPLENTE	"	MARISOL LOPEZ LOPEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

NOMBRE DEL SUSTENTANTE

REBECA ELSA GUADALUPE GARCIA ESCARTIN

NOMBRE DEL ASESOR DEL TEMA

B. GERARDO KONO Y

NOMBRE DEL SUPERVISOR TECNICO

Dr. ROMILIO ESPEJO T

OBJETIVOS.

La gastroenteritis, ha ocupado desde hace mucho tiempo uno de los primeros lugares en las causas de mortalidad en niños.

En el año 1974 (1) esta enfermedad fue responsable del 24% de la mortalidad en niños menores de cuatro años, uno de cuatro fallecimientos ocurre por la diarrea.

Esto es favorecido por la pobreza, la falta de higiene ambiental, la mala nutrición etc.

Por esta razón ha sido de gran importancia el determinar las causas que la producen. Hasta hace poco tiempo la única causa determinada de esta enfermedad eran las bacterias, pero en recientes descubrimientos (2, 3, 4, 5, 6, 7) se ha visto que otro agente etiológico importante de esta enfermedad son los rotavirus.

En la detección de estos virus se han empleado varias técnicas (3, 8, 9, 10, 11, 12) pero hasta hoy existen confusiones acerca de cual es el método más sensible para detectarlos. En este trabajo se determino la sensibilidad de tres distintas técnicas ya descritas pero aún no utilizadas en México, estas están basadas en la detección de los virus en las heces, ya que uno puede encontrar con facilidad los virus en las heces de niños diarreicos entre el tercero y septimo día de enfermedad, pero en los primeros y ultimos días estos son excretados en cantidades mucho

menores.

Por lo tanto la sensibilidad de la técnica empleada es muy importante.

INTRODUCCION.

En México y en los países subdesarrollados una de las causas más importantes de mortalidad, principalmente en niños menores de un año es la gastroenteritis. (1)

Los agentes patógenos conocidos más comúnmente son de origen bacteriano (*Salmonella*, *Shigella*, *E. Coli*, etc.) Como estos solo se aislan en un 50 - 60% de los casos, se ha estudiado la posible existencia de agentes virales causantes de esta enfermedad.

Algunos investigadores (2) haciendo biopsias duodenales encontraron partículas virales en las células epiteliales. La presencia de estas partículas coincidió con cambios histopatológicos y cuadros diarréicos.

Posteriormente (13, 14, 15) fueron encontradas las mismas partículas virales, en heces de niños con diarrea, y se vio que estas eran morfológicamente semejantes a las productoras de diarrea en animales mamíferos: cerdos, ratones, terneros potros, y quizá muchos otros.

Estas partículas son semejantes a los reovirus y a los orbivirus (grupo con ARN de doble cadena) prevalentes en infecciones de animales mamíferos (7).

Por causa de su identidad morfológica y propiedades serológicas -

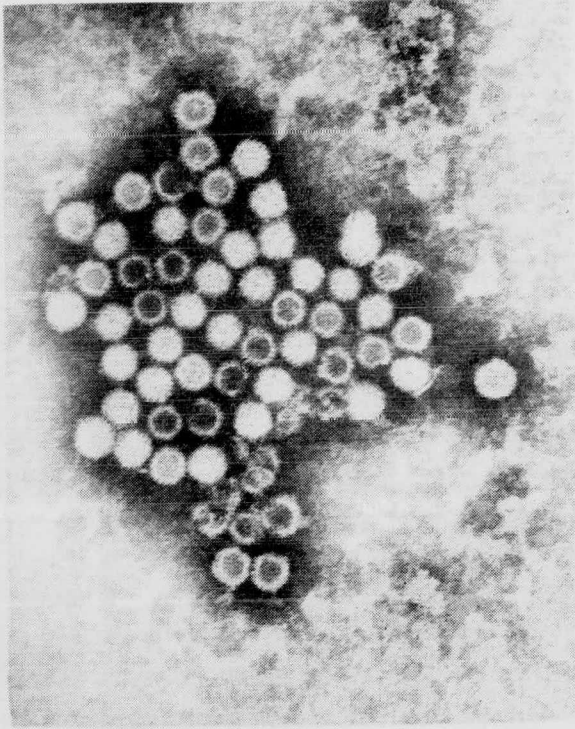
(antígeno de grupo), estos virus causantes de diarrea se han agrupado bajo el nombre de rotavirus, que es el más usado, pero también son conocidos como duovirus, "rheolike" etc.

Estos virus se encuentran principalmente en las gastroenteritis que ocurren en los meses de invierno (16). Se desconoce el mecanismo de transmisión, se supone que el periodo de incubación va de aproximadamente 48 horas a algunos días, la duración de la enfermedad es variable, esta infección raramente se presenta en niños mayores de seis años, los portadores pueden ser niños o adultos asintomáticos; no se conoce la protección de IgG materna, se especula el paso de IgA secretora en calostro y leche materna.

En un estudio estadístico se reportaron los siguientes datos (17) de 827 niños con gastroenteritis el 48% presentaron partículas virales morfológicamente iguales a los rotavirus, en cambio de 357 casos controles, únicamente en el 0.28% de los casos se encontraron partículas virales. De aquí la importancia de estudiar estos virus.

BIOLOGIA MOLECULAR. - Los rotavirus pertenecen a la familia reoviridae junto con los reovirus, orbivirus y algunos otros virus de plantas e insectos, todos tienen una morfología muy similar y contienen ARN de doble hebra.

Vistos al microscopio electrónico aparecen como esferas de aproximadamente 70 nm de diámetro formadas por una parte central de



ROTAVIRUS (MICROSCOPIA ELECTRONICA)

35 nm (el core) rodeado por capsómeros, distribuidos como rayos en una rueda. Después de esta capa formada de capsómeros viene otra formada por unidades más pequeñas llamadas peplómeros. (18)

Los capsómeros miden aproximadamente 12.5 nm de largo. La superficie capsomérica es de forma icosaédrica (T=9) esta compuesta por 540 unidades estructurales arregladas en 180 subunidades triméricas acomodadas a su vez en forma triangular, estas subunidades están unidas formando 32 capsómeros. (19)

QUIMICA. - Los rotavirus no contienen lípidos pero probablemente poseen carbohidratos unidos a algunas proteínas (20).

Se ha demostrado que contienen al menos 8 proteínas y ARN de doble hebra, cuando este ARN es purificado puede resolver en 8 bandas fácilmente distinguibles, como algunas de estas bandas están formadas por dos o más segmentos, el genoma del virus está constituido por 11 fragmentos. (21)

El peso molecular de estos segmentos fue calculado comparando la movilidad de estos ARNs con los de reovirus, encontrándose que las bandas más claras dan pesos moleculares en un rango de 2.2×10^6 a 0.2×10^6 . (Tabla I).

PESOS MOLECULARES DE LOS DIFERENTES SEGMENTOS DE
ARN

NUMERO DE BANDA	P.M x 10 ⁶
VISIBLE	
1	2.30
2	1.66
3	1.50
4	0.85
5	0.76
6	0.50
7	0.30
8	0.20

TABLA I

PESOS MOLECULARES DE LAS PROTEINAS DE ROTAVIRUS Y SU LOCALIZACION EN EL VIRION DE DOBLE CAPA

CAPA INTERNA	CAPA EXTERNA
127,000	
103,000	
97,000	
88,000	
	58,000
32,000	
	26,000
	21,000

TABLA II

Hasta el presente no se tienen evidencias que sugiera que cada una de las especies contribuya con información genética diferente.

Se ha encontrado que los rotavirus tienen al menos 8 proteínas de las cuales 5 están en la capa interna y tres en la capa externa (20).

Los polipéptidos de los rotavirus de terneros y de simios (SA-11) muestran una división básica, similar a la de rotavirus humanos.

En la tabla II se dan los diferentes pesos moleculares y su localización en el virión de doble capa.

REPLICACION. - La replicación de los rotavirus no está estudiada aún por lo que haremos una comparación con la de reovirus.

La replicación de los reovirus se presenta de una manera poco usual, para virus que tienen ARN, ya que su ácido nucleico de doble hebra no puede sintetizar proteínas. Este ARN no puede funcionar como mensajero, por lo tanto lo primero que ocurre es la transcripción a ARNm. El virus posee una ARN transferasa (22) que es la que inicia la transcripción dando como resultado las copias exactas de todos los segmentos del ARN del genoma, el mecanismo de transcripción es semejante al de ADN.

GENERALIDADES DE LAS TECNICAS USADAS.

MICROSCOPIA ELECTRONICA. - Con la aparición del microscopio electrónico ha sido posible un mejor estudio de los virus.

Las bases físicas del microscopio electrónico son: Cuando un rayo de electrones que viaja a gran velocidad choca contra algún objeto, estos se esparcen, el grado de esparcimiento depende del número atómico del cuerpo contra el que chocan.

La desviación de los electrones es utilizada para formar una imagen en un plato fotográfico y esta puede ser vista directamente en una pantalla fluorescente.

La imagen puede ser enfocada con ayuda de campos magnéticos.

Una de las principales limitaciones de la microscopía electrónica es la siguiente: No es posible ver material vivo ya que la muestra tiene que ser deshidratada, pero una ventaja es su gran poder de resolución.

La técnica usada en este trabajo fue la tinción negativa, las partículas virales son mezcladas con una solución de una sal muy opaca a los electrones, generalmente fosfotungstato de sodio o de potasio, la mezcla es dispersada (formando una capa muy delgada) en una membrana de carbón o de algún plástico, dejando después que se seque.

Las partes de las partículas que no son penetradas por la sal se

ven como áreas luminosas en un fondo opaco, este método es útil porque -
aumenta el contraste de los virus.

INMUNOQUIMICA. - Algunas otras técnicas que también han sido -
muy importantes en el estudio de los rotavirus han sido aquellas en las - -
cuales intervienen reacciones antígeno anticuerpo, las más frecuentemen -
te usadas han sido las siguientes: Inmunofluorescencia (23) Inmunoelec - -
tron microscopia (23, 24) Técnicas antígeno anticuerpo fluorescente (25) -
Contrainmunolectroforesis (30) Fijación de complemento (9, 10 etc.)

En este trabajo se prefirió utilizar la contra-inmunolectro-osmo -
foresis ya que tiene una sensibilidad bastante buena y es fácil de utilizar -
en lugares en donde no se tenga mucho material.

La técnica escogida tiene la ventaja de poder comparar directa - -
mente diversos antígenos y antisueros. Dado un antígeno conocido permite
su identificación directa en una mezcla desconocida. Las sustancias se co
locan en pocillos que pueden hacerse con un taladrataponés, en una capa -
de agar solidificado. En el agar, al efectuarse la electroforesis, antígeno
y anticuerpo migran en direcciones opuestas, y al encontrarse entre el -
pocillo que contenga al antígeno y el que contenga al antisuero se formara -
una banda en caso que estén en proporciones óptimas. La banda se forma -
ra primero en el punto más cercano a uno de los pocillos para extenderse -
luego por ambos extremos.

La posición de la banda entre los pocillos del antígeno y del anti - -

suero dependerá de la concentración relativa de las moléculas interactivas. Cuando el antígeno o bien el anticuerpo están en marcado exceso no puede formarse ninguna banda en el agar, pero puede aparecer un precipitado en el pocillo que contiene el componente a más baja dilución. La titulación del antígeno o del antisuero puede efectuarse colocando uno de los componentes, en diluciones seriadas, en una serie de pocillos.

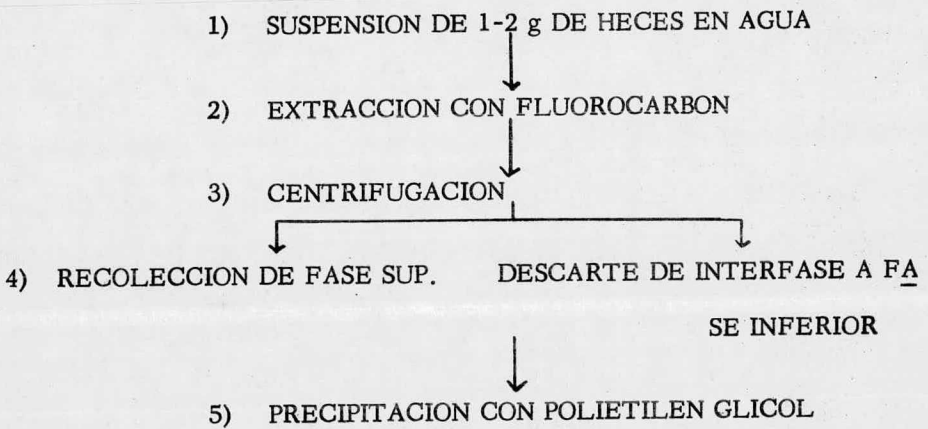
ELECTROFORESIS DE ARN. - La observación fundamental de que las partículas cargadas migran en un campo eléctrico, ha llevado al desarrollo de uno de los métodos más eficientes para caracterizar proteínas, ácidos nucleicos, etc.

Esto se ha logrado basándose en sus diferentes velocidades de migración en un campo, a un pH determinado, y usando una matriz sólida, tal como papel filtro, agarosa, poli acrilamida etc. Cuando se usa agarosa o poliacrilamida se tiene la ventaja de la transparencia de estos materiales, ya que así es posible usar la densitometría.

También se puede usar la electroforesis basándose no en sus cargas relativas sino en los diferentes pesos moleculares de las mezclas, los diferentes componentes se separan de acuerdo a su peso molecular por la menor o mayor facilidad con que viajan a través de los poros del gel.

MATERIALES Y METODOS.

ELECTROFORESIS DE ARN VIRAL. - A continuación se muestra un esquema de la purificación de los virus y después se explica con detalle cada punto.

**PROCEDIMIENTO:**

- 1) Suspensión de heces:
 - a) Pesar en un matraz de 20 a 50 ml provisto de un depresor (abatelenguas)
 - b) Agregar de 1 a 2 g. de heces
 - c) Resuspender en 1 ml de agua destilada
 - d) Agregar 9 ml de agua y homogenizar agitando fuertemente por 10 minutos.
- 2) Tratamiento con fluorocarbón:

a) Añadir 10 ml de fluorocarbón y agitar fuertemente, mezclando ambas fases, por 10 minutos.

3) Centrifugación:

a) Centrifugar a 10,000 g por 30 minutos (la centrifugación a menor velocidad no cambia los resultados).

4) Extracción de fase superior:

a) Extraer la fase superior acuosa con una pipeta de 10 ml - provista de una propipeta, evitando tomar el material denaturado en la interfase o en la fase inferior de fluorocarbón.

5) Precipitación con polietilén glicol:

a) Al extraer la fase acuosa mida el volumen extraído y agregue 0.10 ml por mililitro de sobrenadante, de polietilén glicol.

b) Agitar bien hasta mezclar ambas soluciones y guardar la muestra a 4°C.

ELECTROFORESIS DE ARN PROPIAMENTE DICHA.

1) Centrifugar a 4,000 g por 30 minutos, decantar el sobrenadante.

2) Resuspender la pastilla en 0.3 ml de agua destilada (1-2 gotas).

3) Disrupción del virus.

a) En un tubo pequeño (1 o 2 ml), colocar 0.05 ml del precipitado resuspendido y agregar 0.02 ml de solución de SDS-ME.

b) Incubar la muestra por 1 hora a 55°C con el tubo cerrado para evitar la evaporación.

c) Una vez incubado, añadir 0.02 ml de solución de bromo fenol.

4) Preparación de los geles:

a) Pesar 0.4 g de agarosa (mientras se incuban las muestras) y colocarla en un matraz de 50 ml, agregar 2 ml de amortiguador Loening x 10 y 18 ml de agua destilada.

b) Calentar la suspensión de agarosa en un baño maría hasta que se disuelva completamente (aproximadamente 10 minutos).

c) Con una pipeta Pasteur provista de un bulbo de hule, colocar la agarosa disuelta, evitando que se enfríe, en los tubos de vidrio con un extremo cerrado con parafilm. Los tubos deben de estar verticales y con una marca en el extremo inferior. Llenar los tubos hasta cerca de 0.5 cm del extremo superior.

d) Una vez solidificada la agarosa, colocar el tubo en posición horizontal, quitar el parafilm y deslizar el gel hacia afuera hasta que su extremo inferior coincida con la marca. Cortar la parte extraída cuidando de lograr un corte vertical con una superficie plana.

e) Cubrir el extremo más lejano a la marca con una gasa.

f) Colocar los tubos en el aparato de electroforesis y llenar el recipiente inferior con amortiguador Loening.

g) Conectar la fuente de poder (polo positivo al reservorio inferior). Aplicar 40 volts, cerciorarse que se logre una corriente de aproximadamente 4 mA por gel y enseguida disminuir el voltaje a 10 volts.

5) Electroforesis:

a) Colocar ahora todas las muestras con una jeringa Hamilton o tuberculina provista de un tubo delgado Tygon en lugar de la guja. Dejar caer suavemente la muestra sobre el gel (la muestra es más densa que el buffer por el glicerol).

b) Una vez colocadas todas las muestras, aumentar el voltaje a 40 volts.

c) Después de aproximadamente 4 horas, cuando todo el bromofenol haya salido del gel, apagar la fuente de poder, decantar el buffer del reservorio superior y dejar escurrir los geles (quitando la gasa) en tubos que contengan la solución de "bromuro de etidio".

d) Guardar los geles en la solución a 4°C por tres horas o más, y posteriormente observarlos sobre una lampara de luz ultravioleta larga.

MICROSCOPIA ELECTRONICA.

1) Después de haber purificado los virus en la forma indicada para electroforesis de ARN, el precipitado de polietilenglicol es centrifugado.

2) Centrifugación:

a) Añadir 3.9 ml de agua al precipitado de polietilenglicol suspendido en 0.3 ml de agua.

b) En un tubo de 5 ml para rotor "swing out" de la ultracentrif-

fuga, colocar 1 ml de sacarosa y sobre éste depositar suavemente la suspensión viral cuidando que ambas soluciones permanezcan sin mezclarse.

c) Centrifugar 75 minutos a 31,000 rpm a 5-10°C.

3) Decantar, descartar el sobrenadante, y resuspender la pastilla en una gota de agua destilada.

4) Tinción negativa:

a) Neutralizar (pH 6 a 6.8) la solución de ácido fosfotúngstico con hidróxido de potasio (aproximadamente 0.4 ml de KOH por 1 ml de ácido fosfotúngstico).

b) Con una pipeta Pasteur provista de un bulbo, colocar una gota de la muestra sobre la rejilla sostenida por una pinza, (de preferencia la rejilla debe ser ionizada para hacerla hidrofílica).

c) Después de 1-2 minutos retirar la gota, tocando el borde de la rejilla con un papel filtro.

d) Colocar inmediatamente una gota del ácido fosfotúngstico neutralizado. Retirarla después de 1-2 minutos.

e) Esperar 1 ó 2 minutos hasta que la rejilla se haya secado y observela al microscopio electrónico.

CONTRA-INMUNOELECTRO-OSMOFORESIS.

1) Pesar 0.2 g de agarosa y colocarlos en un matraz de 50 ml - -
agregar 20 ml de amortiguador tris-barbital.

- 2) Calentar la suspensión de agarosa en un baño maría por 10 minutos hasta que la agarosa se disuelva completamente.
- 3) Con una pipeta Pasteur, provista de un bulbo de hule, coloque la agarosa disuelta, evitando que se enfríe, sobre la placa de vidrio.
- 4) Una vez solidificada la agarosa hacer pozos de 0.5 cm de diámetro, con la parte posterior de una pipeta Pasteur, los pozos se distribuyen uno frente a otro con una separación de 1.5 cm.
- 5) De un lado de la placa poner el antígeno (15 μ l) con una micro pipeta y del lado contrario el antisuero en la misma cantidad y del mismo modo.
- 6) Llenar la cámara con amortiguador tris-barbital.
- 7) Poner la placa sobre la división de la cámara de modo que el antígeno quede del lado del cátodo y el antisuero del lado del ánodo.
- 8) Acomodar el papel filtro a los lados de la placa de tal manera que el papel tenga uno de sus extremos dentro del amortiguador y el otro sobre la placa.
- 9) Ya que están colocadas todas las muestras prender la fuente de poder con una corriente de 2 volts/cm.
- 10) Dejar aproximadamente 18 horas para dar tiempo a que se forme el precipitado antígeno-anticuerpo.

- 11) Poner la placa a lavar en una solución salina durante 48 horas a 4°C, cambiando la solución cada 12 horas.
- 12) Pasar las placas a una lámina de papel filtro y secar la placa durante 12 horas.
- 13) Teñirlas en azul de Comassie durante 5 minutos.
- 14) Lavar las placas en ácido acético durante una hora y después con agua.

OBTENCION DEL ANTISUERO. - La purificación del virus se hizo igual que para microscopia electrónica, se centrifugó en equilibrio en cloruro de cesio de densidad 1.36 g/cm^3 en un buffer, centrifugar por 24 horas a 4°C en el rotor SW 50.1 a 37,000 rpm, se recogió la gradiente y las fracciones conteniendo el virus fueron localizadas por turbidez y absorbancia a 260 nm fueron juntadas y dializadas contra el buffer.

- 1) Mezclar 0.6 ml de virus purificado en gradiente de cloruro de cesio con 0.6 ml de coadyubante, con una jeringa hasta que al poner una gota en agua no se difunda.
- 2) Hacer una inoculación subcutanea (poniendo en tres diferentes sitios) ya sea en la nuca o en la pata.
- 3) Inocular al conejo cada siete días durante tres semanas en la misma forma.

- 4) Sangrar al conejo a los 25 días después de la primera inoculación haciéndole punción cardiaca.
- 5) La sangre obtenida dejarla a 37 C durante 30 minutos.
- 6) Una vez formado el coagulo, hay que desprenderlo de las paredes del tubo.
- 7) Dejar a 4°C durante 15 minutos para que el coagulo se contraiga.
- 8) Centrifugar a 3,000 rpm por 15 minutos.
- 9) Guardar el suero a - 70° C
- 10) El título del suero se determina por contra-inmuno-electro-osmoforesis haciendo varias diluciones del mismo.

MATERIALES.

Reactivos.

Poliétilen glicol (carbomex 6000 Unión Carbaide)

Fluorocarbón (triclora trifluora etano Halocarburos S. A.)

Agarosa (Sigma Chem. Co.)

Lauril sulfato de sodio (Sigma Chem. Co.)

2-Mercaptoetanol (Sigma Chem. Co.)

Sal disódica o tetrasódica del ácido etilendiminotetracético (EDTA)

(Sigma Chem Co.)

Bromofenol

Bromuro de etidio (Calbio Chem Cal U. S. A.)

Trizma base (Sigma Chem Co.)

Acido barbitúrico

Hidroxido de sodio (J. T. Baker)

Azul de comassie (Bio-Rad Inc.)

Acido acético (J. T. Baker)

Cloruro de sodio (J. T. Baker)

Acido Fosfotungstico

Hidroxido de potasio (J. T. Baker)

SOLUCIONES.

Amortiguador Loening x 10 pH 7.8

Trizma base 0.36 M.

NaH_2PO_4	0.30 M.
Sal disodica del EDTA	0.01 M.
SDS	1%

Amortiguador Loening

Igual al anterior diluido 10 veces con agua destilada.

Solución de polietilen glicol al 50%

Polietilen glicol 50 g por 100 de agua destilada.

Solución de sacarosa al 45%.

Sacarosa 45g por 100 de agua destilada.

Solución de glicerol-bromofenol al 10%

Bromofenol solución saturada

Glicerol 90%

Solución disruptora SDS-ME

Lauril sulfato de sodio 6%

2-Mercapto etanol 0.6%

Sal disódica del EDTA 0.036 M

Solución de bromuro de etidio 1 g/ml

Mantener una solución concentrada a 1 mg/ml en la oscuridad y diluirla $1:10^3$ antes de usarla.

Solución de fosfotungstato de potasio al 2%

Acido fosfotungstico 1 ml

Hidroxido de potasio 0.45 ml

Agarosa al 2%

Agarosa		0.4g	
Buffer Loening	x 10		2 ml
Agua destilada			18 ml
Agarosa al 1%			
Agarosa			0.2 ml
Buffer Tris-barbital			20 ml
Amortiguador tris-barbital pH 8.6			
Acido barbitúrico		9.44g	
Hidróxido de sodio		1.45g	
Trizma-base			2M.
Solución salina al 0.85%			
Cloruro de sodio		0.85g	
Agua destilada			100g
Solución de ácido acético al 50%			
Acido acético			50ml

RESULTADOS.

Para determinar las sensibilidades, de las tres distintas técnicas mencionadas, se purificó rotavirus de las heces de un niño con diarrea. Esta preparación vista al microscopio electrónico mostraba casi exclusivamente partículas virales excepto por algunos flagelos de bacterias.

Para determinar el número de partículas virales por ml. se determino la absorbancia a 260 nm y se supuso que los rotavirus tienen una absorción específica igual a la de los reovirus, ya que son muy parecidos. De esto se calculó que la preparación con una absorbancia de 0.820 contenía 1.7×10^{12} partículas por ml. (27)

Se determinó el número mínimo de partículas detectables empleando la técnica de microscopía electrónica, para esto se hicieron diluciones desde 0 hasta 1/4096, se examinaron al microscopio electrónico, y se consideró positiva hasta la dilución 1/4096 que tenía un virus por cuadrado en una rejilla de 300 mesh.

Para determinar la sensibilidad con la electroforesis de ARN también se hicieron varias diluciones a partir del virus ya diluido 1/3, las posteriores diluciones fueron desde 1/5 hasta 1/80, cada una de estas diluciones se corrieron en distintos geles, con este método se encontró que daba positiva hasta la dilución 1/40.

En la contra-inmuno-electro-osmoforesis (C.I.E.P.) se hicieron -

diluciones desde 0 hasta 1/80 dando positiva hasta la dilución 1/40, en este experimento se uso el antisuero diluido 1/8, el título del mismo era de 1/128.

Con estos datos se pudo determinar el número mínimo de partículas por ml con las tres distintas técnicas (Tabla 3).

Las técnicas empleadas han sido utilizadas por distintos autores en diversas formas, algunas usan directamente una suspensión de heces (26, 29, 30) mientras otros emplean procedimientos diversos para concentrar el virus; como se utilizan, sin embargo, las mismas técnicas los resultados sobre comparación de sensibilidades se prestan a confusión.

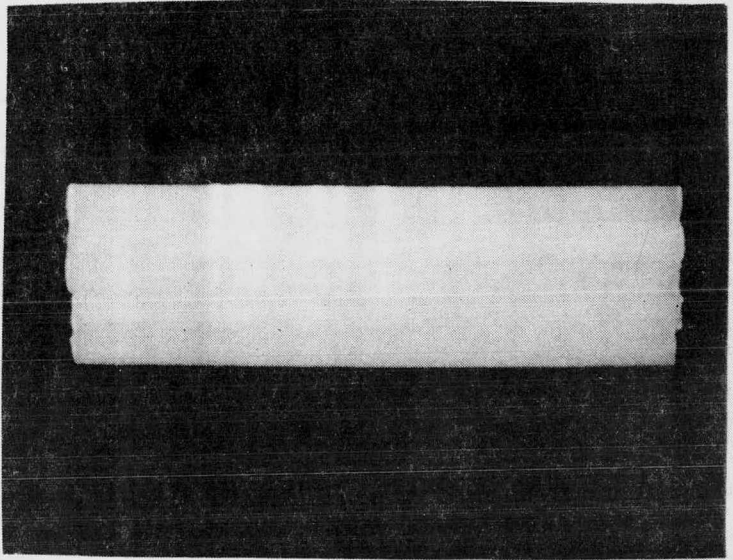
A continuación damos las sensibilidades esperadas en los procedimientos seguidos por los distintos autores, los cálculos se hicieron basándose en la mínima cantidad de partículas detectables, determinadas en este trabajo y la dilución o concentración del virus en las heces, resultante del procedimiento usado. (Tabla 4).

SENSIBILIDAD RELATIVA PARA LA DE TECCION DE ROTAVIRUS PURIFICADO		
TECNICA EMPLEADA	NUMERO DE VIRUS/ml MINIMO DE TECTABLE	ng DE VIRUS/ml
MICROSCOPIA ELECTRONICA	4×10^8	0.3
ELECTROFORESIS DE ARN	1.4×10^{10}	123
CONTRA-INMUNOELECTRO- OSMOFORESIS	4.2×10^{10}	376

TABLA III

NUMERO DE PARTICULAS DETECTABLES EXPRESADAS POR GRAMO DE HECES	
MICROSCOPIA ELECTRONICA	
BISHOP Y COLS.	$2.0 - 4.0 \times 10^7$
SPENCE Y COLS.	$10^9 - 5 \times 10^9$
MIDDLETON Y COLS.	$10^9 - 5 \times 10^9$
TUFVESSON Y COLS.	5×10^9
EN ESTE TRABAJO	$2.0 - 4.0 \times 10^7$
CONTRA -INMUNOELECTRO-OSMOFORESIS	
MIDDLETON Y COLS.	$4.0 - 8.0 \times 10^{12}$
TUFVESSON Y COLS.	$4.0 - 8.0 \times 10^{12}$
EN ESTE TRABAJO	4.2×10^{11}
ELECTROFORESIS DE ARN	
EN ESTE TRABAJO	1.4×10^{11}

TABLA IV



ELECTROFORESIS DE ARN.



CONTRAINMUNO-ELECTRO-OSMOFORESIS

CONCLUSIONES

La sensibilidad obtenida por microscopia electrónica es relativa - dependiendo de la superficie examinada, se ha considerado que muestras - conteniendo menos de un virus por cada dos a cuatro cuadrados en una re- jilla de 300 mesh sería considerada negativa, por esto únicamente toma- - mos como positiva hasta la dilución 1/4096.

La sensibilidad obtenida por electroforesis de ARN es aquella es- - perada de acuerdo a la mínima cantidad de ARN, detectable por bromuro- - de etidio; considerando que la tinción de ARN de doble hebra tiene la mis- - ma sensibilidad que la tinción de ADN de acuerdo a Helling y col (28) la - - mínima cantidad de ARN detectable sería de 10 ng o menos, el valor ob- - tenido en este estudio concuerda con estos datos:

Los rotavirus contienen 11 moléculas de ARN la más grande de un peso molecular de 2.2×10^6 (21) por lo tanto una solución con 1.4×10^{10} partículas/ml contendría 46 ng/ del segmento de mayor tamaño de ARN/- ml, como en este método se emplea 15 1 la cantidad mínima de ARN -- detectable en las condiciones empleadas fue de 3.0 ng.

Los resultados con la CIEO son contradictorios, se estima que la- - cantidad mínima de antígeno detectable por este método es del orden de -- los 10 ng (31), y en este trabajo la cantidad mínima que se detecto fue de- - solo 25 ng de virus; considerando que el título del antisuero es de 1/128 -

y se utilizo una dilución del suero de 1/8 podemos descartar que la poca sensibilidad se deba al antisuero.

Se puede concluir que la técnica más sensible es la de microscopía electrónica seguida por la electroforesis de ARN 30 veces menos sensible y por la CIEO que es de 5-6 veces menos sensible que la electroforesis -- ARN.

Sin embargo la enorme diferencia observada en la sensibilidad de estas dos técnicas con respecto a la microscopia electrónica no afecta -- grandemente los resultados cuando son utilizadas para el diagnóstico, debido a que la cantidad de virus excretado por los niños enfermos es alta. -- Otros estudios por otros autores (11) y en este laboratorio muestran que -- alrededor de 70 - 80 % de los casos detectados por microscopía electróni- ca tambien son detectados por electroforesis de ARN y Contra - inmuno-- electro-osmoforesis.

Basandonos en estas observaciones es apropiado por ahora el uso -- de la electroforesis y CIEO, ya que en muchos laboratorios y hospitales -- no se tiene un microscopio electronico.

BIBLIOGRAFIA

1. - Rojas T. Dona. Gonzalez, C. A. Albarran, E. R. Aspectos -- epidemiológicos de las diarreas virales (1977) Ins. de Inv. Biomédicas.
2. - Bishop, R. F., Davidson, G. P., Holmes, I. H. and Ruck, B. - Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with - acute non-bacterial gastroenteritis Lancet 2 1281-1283 (1973).
3. - Bishop, R. F. et al Detection of new virus by electron microscop - y of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. Lancet - 1 140-151 (1974).
4. - Cruickshank, J. G., Exton, J.H. and Webster, O.F. Viruses - in gastroenteritis. Lancet 1 1353 (1974).
5. - Appleton, H. and Higgins, P.G. Viruses and gastroenteritis in infants. Lancet 1 1297 (1975).
6. - Thornton, A. and Zuckerman, J. A. The virus of acute diarr - hoea. Nature 254 557-558 (1975).
7. - Lancet (Editorial) Rotavirus in man and animals 1 257-259 -- (1975).
8. - Kapikian, A. Z., Kim, W.W., Wyatt, R.G., Rodriguez, W.J. Ross, S., Cline, W.L., Parrot, R.H. and Chanock, R.M. Reoviruslike -

agent in stools association with infantile diarrhea and development of serologic test. Science 185 1049-1053 (1974).

9. - Kapikian, A. Z., Cline, W.L., Mebus, C. A., Wyatt, R.G., - James, H.D., Wankirk, D. and Chanok, R.M. New Complement-fixation - test for the human Reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. Lancet 1 1056-1061 (1975).

10. - Kapikian, A.Z., Kalika, R. A., Shihw, K.J., Cline, W.L. - Thornhill, T.S., Wyatt, R.G., Chanock, R.M., Kim, H.W., Gerin, J. - L., Bouyant density in cesium chloride of the human Reovirus-like agent - of infantile gastroenteritis by ultracentrifugation, electron microscopy and complement fixation Virology 70 564-569 (1976).

11. - Tufvesson, B. and Johnsson, T. Immuno-electro-osmophoresis for detection of Reo-like virus. Methodology and comparison with electron microscopy. T. Acta. Path. Microbiol. Scand. Seet. B. 84 225-228 - --- (1976).

12. - Espejo, T. R., Calderon, E. and Gonzalez, N. Distinct reo-virus-like agent associated with acute infantile gastroenteritis. Journal of clinical microbiology 6 502-506 (1977).

13. - Flewett, T. H., Bryden, A. S., and Davies, H. Virus particles in gastroenteritis. Lancet 2 1497 (1973).

14. - Flewett, T. H., Bryden, A.S., Davies, H., Woode, G. N., -

Bridger, J. C. and Derrick, J. M. Relation between viruses from acute -- gastroenteritis of children and newborn calves *Lancet* 2 61 (1974 a).

15. - Middleton, P. J., Szimanski, M. T., Abbott, G. D., Bortolussi, R. and Hamilton, J. R. Orbivirus acute gastroenteritis of infancy. -- *Lancet* 1 1241 (1974).

16. - Kapikian, A. Z., Kim, H. W., Whatt, R.G., Cline, W. L., - Arrobio, O. J., Brandt, C. D., Rodriguez, W. J., Sack, D. A., Chanock, R. M. and Parrott, R. H. Human reovirus-like agent as the major patho-- gen associated with "winter" gastroenteritis in hospitalized infants and -- young children. *The new england journal of medicine.* 294 965-972 - -- (1976).

17. - Davidson, G. P., Bishop, R. F., Townley, R. W., Holmes, - I. and Ruck, B. J. Importance of a new virus in acute sporadic enteritis - in children, *Lancet* 1 242-246 (1975).

18. - Holmes, I. H., Ruck, B. I., Bishop, R. F. and Davidson, G. Infantile enteritis viruses: Morphogenesis and morphology *Journal of virology* 16 937-943 (1975).

19. - Martin, M. L., Palmer, L. E. and Middleton, J. P. Ultraes- tructure of infantile gastroenteritis virus *Virology* 68 146-153 (1975).

20. - Rodger, S. M., Schnagl, R. D. and Holmes, I. H. Further - biochemical characterization, including the detection of surface glycopro-

teins, of human, calf and simian rotaviruses. Journal of virology 24 - - - 91-98 (1977).

21. - Rodger, S. M. et al. Biochemical and biophysical characteristics of diarrhea viruses of human and calf origin. Journal of virology 16 - 1229-1235 (1975).

22. - Skehel, J. J. and Joklik, W. K. Studies on the in vitro transcription of reovirus RNA catalyzed by reovirus cores. Virology 39 822--831 (1969).

23. - Bridger, J. C. and Woode, G. N. Neonatal calf diarrhoea Identification of a reovirus-like agent (rotavirus) in faeces by immunofluorescence and immunoelectron microscopy. British veterinary journal 131 - - 528-535 (1975).

24. - Kapikian, A.Z., Wyatt, R. G., Dalin, R., Thornhill, T. S., Kalika, A. R. and Chanock, R. M. Visualisation by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infections non-bacterial gastroenteritis. Journal of virology. 10 1075-1081 (1972).

25. - Toussaint, A.J., Anderson, R. L., Soluble antigen fluorescent antibody technique. Applied microbiology 13 552-558 (1965).

26. - Middleton, P. J., Petric, M., Hewitt, C. M., Szymanski, -- M.T. and Tam, J. S. Counter-immunoelectro-osmophoresis for the detection of infantile gastroenteritis virus (Orbi-group antigen and antibody. J.

Clin. Path. 29 191-197 (1976).

27. - Smith, R. E., Zweerink, H. J. and Joklik, W. R. Polypeptide components of virions, top component and cores of reovirus type 3. *Virology* 3 791-810 (1969).

28. - Hilling, R. B., Goodman, M. H. and Bayer, H. W. Analysis of endonuclease R. Eco RI fragments of DNA lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose gelelectrophoreses. *J. Virol.* 14 1235-1244 ---- (1974).

29. - Grawballe, P. C., Geuner, J., Meyling, A. and Hornsleth, - A. Rapid diagnosis of Rotavirus infections: Comparison of electron microscopy and immuno-electro-osmophoresis for the detection of rotavirus in --- human infantile gastroenteritis. *J. Gen. Virol.* 35 203-213 (1977).

30. - Tufvesson, B. and Johnson, T. Immunoelectro-osmophoresis for detection of reo-like virus: Methodology and comparison with electron microscopy. *Acta. Path. Microbiol. Scand. Sect. B.* 84 225-228 (1976).

31. - Crowle J. A. Immunodiffusion. Academic Press 2 Ed. p303 - N. Y. and London (1977).