

DETECCION DE LAS INFECCIONES POR ROTAVIRUS MEDIANTE EL METODO INMUNOCITOQUIMICO DE PEROXIDASA-ANTIPEROXIDASA

H. HANSSEN, G. ESCOVAR

Se detectaron rotavirus en tejido intestinal de animales o en cultivos celulares mediante el método inmunocitoquímico de peroxidasa-antiperoxidasa (PAP). El método PAP demostró ser una técnica sensible y eficaz para la detección de rotavirus en las células infectadas. Ofrece las ventajas de reacciones inespecíficas despreciables, el uso del microscopio de luz, la producción de placas permanentes y la conservación de los reactivos inmunológicos. Su capacidad para detectar antígenos en tejidos embebidos en parafina destaca la utilidad del método PAP en estudios retrospectivos.

INTRODUCCION

Los rotavirus son agentes infecciosos de amplia distribución mundial y se han infor-

mado como causa común de gastroenteritis en humanos y animales (1, 2). El hallazgo de rotavirus humanos ha sido informado por lo menos en 25 países y aún no se han encontrado grupos de poblaciones libres de anticuerpos para estos agentes infecciosos (3).

Numerosos procedimientos han sido desarrollados con el propósito de detectar rotavirus en el contenido intestinal y las heces de pacientes con gastroenteritis. Estos incluyen electromicroscopía (4), inmunoelectromicroscopía (5), inmunodifusión (6), electroforesis por contracorrente (7, 8), fijación de complemento (9), inmunofluorescencia (10), hemoaglutinación (11), ensayo inmunoenzimático (12), radioinmunoensayo (13), ensayo de formación de placas para medir la infectividad viral (14) y, más recientemente, una combinación del ensayo inmunoenzimático y el radioinmunoensayo en una prueba considerada muy sensible (15).

Solamente la inmunofluorescencia y la electromicroscopía han sido utilizadas para demostrar directamente partículas virales y

Dr. Henry Hanssen V.: Profesor Asociado, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín. Actualmente en entrenamiento: Department of Virology/Epidemiology, Baylor College of Medicine, Texas Medical Center, Houston, Texas 77030, U.S.A.; Dra. Genarina Escovar: Profesora Asistente, Departamento de Morfología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín.

Solicitud de separatas al Dr. Hanssen.

sus antígenos en biopsias de tejido intestinal o en cultivos celulares afectados (16-18). En el presente trabajo se describe la experiencia en el desarrollo de un procedimiento enzimático e inmunocitoquímico de peroxidasa-antiperoxidasa y su aplicación en la detección de rotavirus en cultivos celulares y en material de biopsias de tejido intestinal.

MATERIAL Y METODOS

Para los propósitos descritos anteriormente, se utilizó el procedimiento de peroxidasa-antiperoxidasa (PAP), sin anticuerpo marcado, descrito por Sternberger (19). Consiste esencialmente en lo siguiente:

- Se somete el tejido o cultivo celular infectado o presuntamente infectado, a reaccionar con un antisuero específico dirigido hacia el agente infeccioso. En las infecciones de los cultivos celulares y de los tejidos se utilizaron respectivamente el rotavirus de simio SA-11 y el rotavirus porcino. Como antisueros se emplearon suero total de cobayo anti-rotavirus SA-11 y anti-rotavirus porcino (cepa OSU).
- Se utiliza un segundo antisuero como anticuerpo ligante. En el presente trabajo se utilizó inmunoglobulina de cabra anticobayo.
- Se agrega un tercer suero purificado de cobayo, el cual contiene anticuerpos antiperoxidasa o complejo soluble peroxidasa-antiperoxidasa.
- La reacción enzimática se desarrolla con peróxido de hidrógeno como substrato y con hidrocloreuro de diaminobenzidina como donador de electrones.
- Como resultado de esta reacción se obtiene un producto insoluble que varía de color café claro a oscuro, dependiendo de la intensidad de la reacción y de la cantidad de antígeno presente en las células o tejidos. La reacción se describe esquemáticamente en la Figura 1.

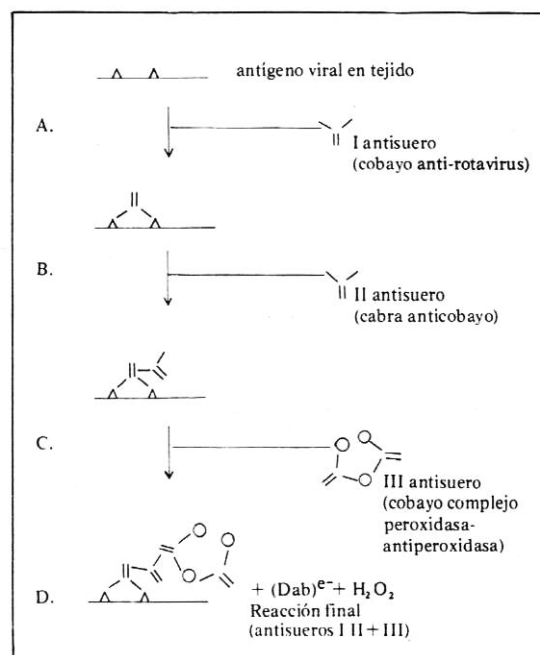


Figura 1. Método de peroxidasa-antiperoxidasa.

Infección de tejidos. Para el estudio de tejidos se utilizaron en total seis cerdos (raza New Jersey), de un día de edad y privados de calostro. Cuatro de ellos fueron infectados y los dos restantes se utilizaron como controles. La infección se realizó por vía oral, mediante el empleo de una sonda gástrica. A cada cerdo se le administró una dosis de 4 mililitros de rotavirus porcino (American Type Culture Collection) con un título original en ensayo de formación de placas de $4,5 \times 10^5$ unidades formadoras de placa por mililitro. A los cerdos controles se les administró una cantidad igual de solución amortiguadora de base Tris ultrapurificada (hidroximetil-amino-metano; hidrocloreuro Tris 0,05M; NaCl 0,15M; pH 7,6) (Schwarzmann, Orangesburg, N.Y.), libre de virus.

Los animales en estudio fueron mantenidos por 36 horas después de la infección en unidades aisladas e independientes. Una porción de 25 centímetros de longitud de la unión yeyuno-ileal fue removida por cirugía, previa anestesia de los animales con pentotal sódico al 0,5%. Para su ob-

tención se ligaron los extremos distales de la porción intestinal seleccionada y, por cada extremo distal y en posición interna al sitio de la ligadura, se hizo una incisión. Por cada incisión se introdujo un catéter, uno de los cuales fue cuidadosamente conectado externamente a una bomba de impulsión. Por medio de este sistema e impulsión de solución salina de base Tris, se removió el contenido intestinal hasta obtener un lavado exhaustivo de los tejidos; luego se removió la porción de tejido, y se sumergió en solución de formalina al 10% y posteriormente embebida en parafina. Se obtuvieron cortes histológicos de 4 micras de espesor, mediante el uso de un micró-tomo de tipo convencional, y se colocaron en láminas portaobjetos previamente tratadas con albúmina o gelatina para asegurar una mejor adherencia de los tejidos. Los cortes histológicos fueron puestos a 37°C durante 24 horas y luego guardados hasta el momento de su utilización.

Inmediatamente antes de realizar el método PAP, se procedió a desparafinar los cortes histológicos utilizando consecutivamente las siguientes soluciones: xilol, 3 minutos, 2 veces; etanol al 100% 2 minutos, 2 veces; etanol al 90%, 1 minuto; etanol al 70%, 1 minuto. Los tejidos fueron rehidratados en agua destilada durante 3 minutos.

Con el objeto de remover la peroxidasa endógena presente normalmente en los enterocitos de las vellosidades intestinales, se utilizó una modificación del método de Isobe et al. (20). Para tal fin los tejidos fueron tratados con una solución de ácido peryódico 0,005M (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) por 10 minutos, lavados en solución amortiguadora de base Tris, pH 7,6, por 15 minutos y tratados posteriormente con solución de borohidrido sódico 0,003M (Sigma, Co.), durante 30 minutos. Finalmente fueron lavados en solución salina Tris durante 15 minutos.

Con el propósito de formar una película homogénea sobre la superficie de los te-

jididos, la cual facilita la adherencia de los antisueros, éstos fueron sometidos a tratamiento con solución de albúmina de huevo al 10% (Sigma, Co.), preparada en solución salina Tris y aplicada durante 30 minutos.

Infección de los cultivos celulares. Se cultivaron células de riñón de mono, MA104 (*Macaccus rhesus*) (Microbiological Associates, Bethesda, Md.), permitiéndoseles crecer en laminillas cubreobjetos. Cuando las células habían formado una monocapa, se realizó una infección con rotavirus de simio SA-11 (American Type Culture Collection), utilizando de 1 a 10 unidades formadoras de placa por célula (21). Dieciocho horas después de la infección, las células se fijaron con etanol al 100% durante 10 minutos a -20°C. Posteriormente fueron conservadas a la misma temperatura hasta el momento de su utilización.

Virus utilizados. Para las infecciones de tejidos y células se utilizaron rotavirus SA-11 y rotavirus porcino. En la producción de antisuero específico para los rotavirus se utilizó virus purificado cultivado en células MA104. De 24 a 36 horas después de la infección y cuando el efecto citopatogénico viral fue evidente, las células fueron lisadas mediante tres ciclos de congelación y descongelación. Los lisados celulares fueron disgregados mediante ultrasonido por 2 minutos, a 8.000 ciclos por segundo en un aparato emisor de sonido (Delcco Scie. Co. 111.). Las partículas virales se extrajeron por tratamiento de los lisados celulares con volúmenes iguales de freón líquido. La fase acuosa resultante de la extracción, se separó mediante centrifugación a 1.500 rpm, durante 10 minutos. Los viriones presentes en la fase acuosa fueron precipitados con polietilenglicol de peso molecular 6.000 (Sigma, Co.) a una concentración final del 10%. El precipitado obtenido se sedimentó por centrifugación a 10.000 rpm, durante 30 minutos. El sedimento con las partículas virales se llevó al equilibrio en gra-

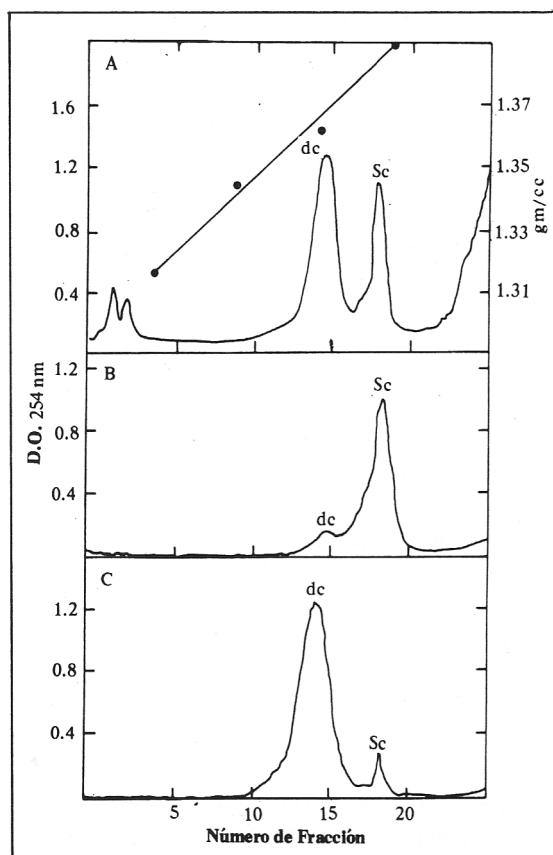


Figura 2. Separación de las partículas virales de cápside doble (dc) y simple (Sc) en gradientes de cloruro de cesio de índice de refracción de 1,369. Las fracciones de los gradientes fueron colectadas a una densidad óptica (D.O.) de 254 nm. Las diferencias en densidad de las partículas de rotavirus permite su óptima separación.

dientes de cloruro de cesio, con un índice de refracción de 1,369. Con el objeto de separar las partículas virales de cápside doble y simple en base a su diferente densidad, los gradientes fueron centrifugados en una ultracentrifuga Beckman modelo L-5-50, por 18 horas a 36.000 rpm. Las fracciones correspondientes a la densidad de los rotavirus se colectaron en un separador de fracciones ISCO modelo 640. Los remanentes de sal de cesio fueron removidos mediante diálisis por 24 horas a 4°C. La Figura 2 ilustra la separación de las partículas virales en los gradientes de cloruro de cesio. Una evaluación de la pureza del antígeno, correspondiente a cada purificación viral, se realizó mediante examen al microscopio electrónico (Hitachi), en muestras

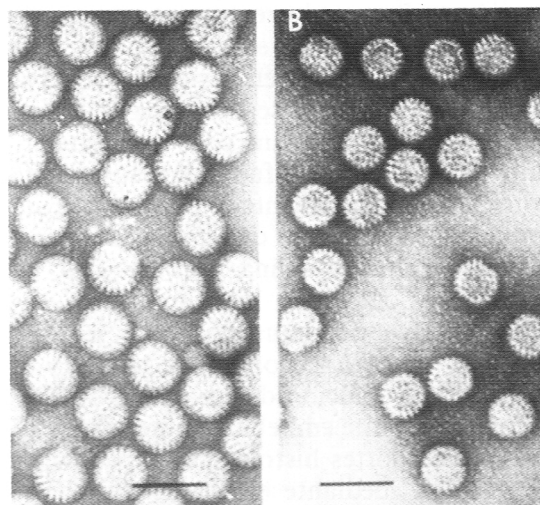


Figura 3. Partículas de rotavirus como se aprecian al microscopio electrónico después de su purificación en gradientes de cloruro de cesio. Las preparaciones fueron teñidas con ácido fosfotúngstico al 2%. Las fotografías fueron tomadas a 45.000 y 80.000 aumentos, respectivamente.

teñidas con ácido fosfotúngstico al 2% (Figura 3).

Preparación de los antiseros. Los antiseros anti-rotavirus fueron preparados en cobayos adultos jóvenes, por inoculación de 50 microgramos de una mezcla al 50% de partículas virales de cápside doble y simple. El inóculo se suspendió en igual volumen de coadyuvante completo de Freund. La inoculación se hizo en los cojines de las plantas de las extremidades posteriores del animal. La respuesta inmune de los animales fue estimulada por dos inóculos subsecuentes, espaciados por un período de tres semanas. El segundo inóculo se realizó por vía intramuscular y utilizando coadyuvante de Freund incompleto. Sueros preinmunes correspondientes a cada animal, fueron obtenidos antes de iniciar las inmunizaciones. Para producir los antiseros se emplearon solamente cobayos previamente negativos para rotavirus en la prueba de inmunofluorescencia. Los cobayos así inmunizados fueron sangrados en blanco por punción cardiaca. La sangre obtenida se dejó coagular y los sueros se obtuvieron por centrifugación, previa remoción del coágulo. Los sueros se inac-

tivaron a 56°C por 30 minutos. Posteriormente fueron almacenados a -20°C hasta su utilización. A cada suero se le determinó su título anti-rotavirus por pruebas de inmunofluorescencia e inhibición de formación de placas. El antisuero ligante (suero de cabra anticobayo) y el tercer antisuero (complejo soluble PAP) fueron obtenidos comercialmente (Cappel, Pa.).

Tinción de peroxidasa-antiperoxidasa.

Se utilizó la técnica de Sternberger (19) con ligeras modificaciones. Todos los antisueros fueron diluidos en solución salina de base Tris, pH 7,6, la cual contenía suero fetal bovino a una concentración del 10% y comprobado como negativo para rotavirus por prueba de inmunofluorescencia. En este estudio se utilizó el primer antisuero (cobayo anti-rotavirus) diluido 1:100; el segundo antisuero (cabra anticobayo) diluido 1:10 y el tercer antisuero (complejo soluble PAP) diluido 1:50.

La exposición de tejidos y células a cada uno de los antisueros, se realizó añadiendo gotas del correspondiente antisuero directamente sobre su superficie. Se usaron cantidades de 50 a 100 microlitros de cada antisuero, hasta lograr cubrir completamente el área de tejido. Cada período de incubación se realizó en cámara húmeda a 37°C, por 30 minutos. Después de cada período de incubación, los tejidos y células fueron lavados con solución salina de base Tris, que contenía suero fetal bovino a una concentración del 2%. Después del último período de incubación con el tercer antisuero, las preparaciones fueron lavadas por inmersión en solución salina Tris libre de suero, dos veces durante 10 minutos.

Las láminas y cubreobjetos fueron posteriormente tratadas en la oscuridad durante 5 minutos con una solución al 0,05% de tetracloruro 3-3' de diaminobenzidina (Grado II N° 5637) (Sigma, Co.), preparada en solución salina de base Tris pH 7,6. A esta solución se le agregaron 25 microlitros de peróxido de hidrógeno al

30%. Durante este período la solución se mantuvo en agitación lenta pero continua, utilizando un agitador Modelo G2 (New Brunswick Co. N.J.). El recipiente que contenía la solución se mantuvo cerrado para impedir el ingreso de oxígeno externo.

Las preparaciones fueron lavadas por inmersión en solución salina Tris, 2 veces por 5 minutos y teñidas por contraste con Hematoxilina de Gill's N° 3 (Polysciences, Pa.), por un minuto. El exceso de colorante se removió lavando los preparados en agua destilada. Con el fin de obtener un mejor contraste en la tinción, las preparaciones se sumergieron durante un minuto en solución acuosa saturada de carbonato de litio. Posteriormente, después de ser lavados con agua destilada, los tejidos se sometieron a un proceso de deshidratación y clarificación, utilizando concentraciones crecientes de etanol (15%, 50%, 75%, 95% y 100%) y xilol absoluto, por períodos de 5 minutos para cada alcohol durante la deshidratación y 10 minutos para el proceso de clarificación.

Finalmente las láminas y cubreobjetos que contenían las células y tejidos fueron montadas en Permount (Fischer Scientific Co.). Cada una de las preparaciones fue examinada por microscopía de luz, utilizando un microscopio Zeiss (Modelo 51863) con cámara fotográfica incorporada.

RESULTADOS

Detección de rotavirus en cultivos celulares. Los patrones de reacción observados, fueron los de un teñido citoplasmático y perinuclear. Este último usualmente enriquecido por inclusiones (Figura 4). Ocasionalmente, pudieron discernirse patrones de tinción nuclear especialmente en células en avanzado estado de efecto citopatogénico. Aparentemente, este tipo de reacción nuclear es característico de la prueba peroxidasa-antiperoxidasa, ya que no pudieron ser observados en células no

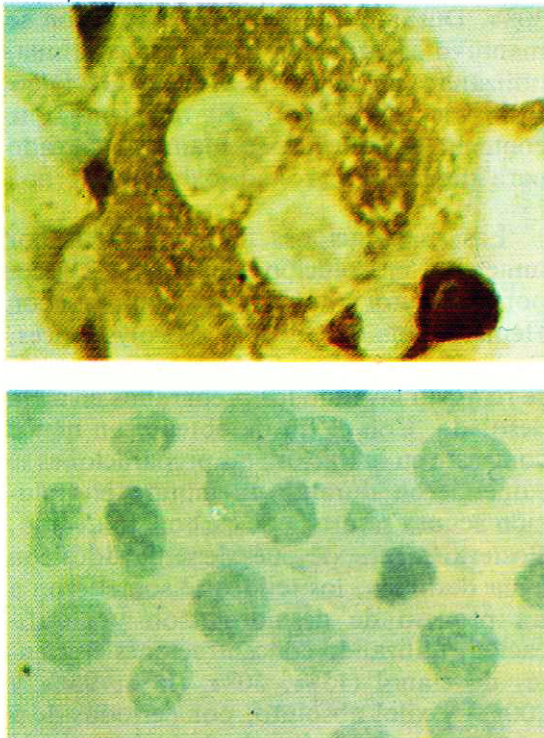


Figura 4. En la parte superior un cultivo de células MA104 infectado con rotavirus de simio SA11 y positivo para la reacción de peroxidasa-antiperoxidasa. La parte inferior ilustra una reacción negativa de peroxidasa-antiperoxidasa en el mismo tipo de células.

infectadas o en células tratadas con sueros preinmunes (Figura 4). Fue posible también detectar células con reacción positiva a multiplicidades muy bajas de la infección. La prueba permitió utilizar diluciones altas de antisuero, anti-rotavirus o primer antisuero, en rangos de diluciones de 1:200 a 1:400. Las reacciones positivas y negativas fueron claramente diferenciables. Las reacciones débilmente positivas, no constituyeron aparentemente un problema para ser diferenciadas de una reacción de contraste de fondo inespecífico, el cual resultó ser mínimo en este tipo de reacción.

Detección de rotavirus en cortes de tejidos infectados. La prueba de peroxidasa-antiperoxidasa parece constituirse en una prueba de gran utilidad en la detección de antígenos en tejidos. En el presente trabajo se pudieron identificar en forma definitiva células infectadas en el tejido intestinal (Figura 5). Los antígenos virales

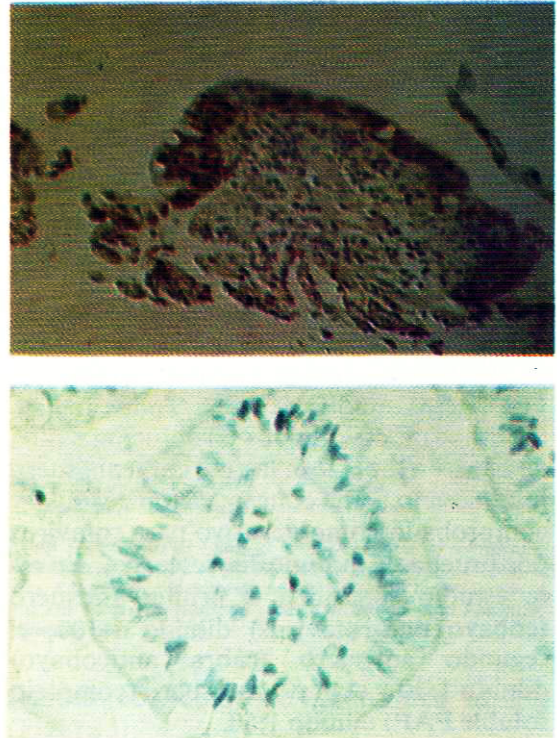


Figura 5. La parte superior de la figura ilustra tejido intestinal de cerdo, porción yeyunoileal, con células infectadas con rotavirus. La reacción positiva de peroxidasa-antiperoxidasa se distingue por un fuerte color café depositado sobre las células. El tejido control negativo se presenta en la parte inferior. Nótese la ausencia de peroxidasa en las células.

fueron fácilmente localizados, pudiéndose establecer el tipo de célula infectada. Las células predominantemente infectadas fueron los enterocitos del epitelio de las vellosidades intestinales. Se encontró un mayor número de células con reacción positiva, hacia el borde de la vellosidad, en aquellas más relacionadas con el lumen intestinal (Figura 5). A nivel de las criptas, el número de células con reacción positiva fue muy escaso o no se presentó.

DISCUSION

Hasta el momento ha sido posible demostrar la presencia de antígenos de rotavirus en biopsias de tejido o en cultivos celulares mediante el empleo de técnicas de inmunofluorescencia y electromicroscopía. El presente estudio demuestra la aplicación

de la prueba de peroxidasa-antiperoxidasa en la detección de antígenos de rotavirus en biopsias de tejidos y en cultivos celulares.

El principal propósito de este artículo es familiarizar al investigador con las diferentes etapas de la técnica, con el objeto de que pueda establecer y extender por analogía este tipo de prueba a otros sistemas. También se discuten las principales ventajas y desventajas del procedimiento y los obstáculos que deben ser superados para lograr el establecimiento del ensayo.

Como en cualquier técnica de investigación biomédica, el éxito del procedimiento reside en la calidad, estabilidad, especificidad y sensibilidad de los componentes de la prueba. Considerando que la prueba comprende varios componentes y múltiples pasos secuenciales, cada aspecto de ella es proporcionalmente importante y por lo tanto debe considerarse cuidadosamente. A fin de facilitar la comprensión del procedimiento, se prefiere discutirlo en la misma secuencia como se describió.

Infección de tejidos y cultivos celulares.

En el presente trabajo se utilizaron cultivos celulares y tejidos infectados experimentalmente. Sin embargo, el método PAP tiene aplicación en el estudio de antígenos presentes en tejidos frescos procedentes de biopsias, o en estudios retrospectivos utilizando material de autopsias. Una de las principales ventajas que ofrece el método es la utilización de cortes histológicos embebidos en parafina.

En relación al tipo de fijador utilizado debe escogerse aquél que preserve óptimamente los determinantes antigénicos del agente o sustancia que se desee estudiar. Usualmente utilizar cortes de tejidos procesados por el método de congelación es el método de elección, pues preserva la reactividad antigénica. Cuando se desee realizar estudios en cortes histológicos en parafina, conviene utilizar tejidos fijados en formalina al 10%, o en solución salina amortiguadora de fosfatos, o en fijador

de Bouin (ácido pícrico-formalina-ácido acético glacial). En términos generales la selección del fijador depende de la naturaleza del antígeno; por ejemplo, si los antígenos son de naturaleza lipóide, es inconveniente utilizar cortes histológicos embebidos en parafina, ya que los lípidos son extraídos en los solventes usados en este procedimiento.

En relación a la información de reacciones positivas o negativas, existen varios factores que pueden conducir a interpretaciones erróneas. Los niveles de un antígeno en particular pueden variar de un tejido a otro y en ciertos sistemas pueden ser considerablemente bajos aún en el mismo órgano blanco de la infección. Para evitar falsos negativos en estos casos se recomienda el empleo de un primer antisuero lo suficientemente potente para detectar al antígeno.

Otro factor importante es la remoción adecuada de peroxidasa endógena del tejido en estudio. Si la remoción es inadecuada o no se realiza, su presencia puede conducir a la interpretación de falsos positivos. La utilización de ácido peryódico y borohidrido de sodio para remover la peroxidasa endógena presente en los enterocitos del epitelio intestinal, ofrece resultados satisfactorios. Sin embargo, en tejidos muy hemorrágicos con altos niveles de peroxidasa endógena, se recomienda utilizar el método de Burns (22) en el cual los tejidos luego de ser desparafinados, se someten a la acción de una solución de metanol al 100% más 0,5% de peróxido de hidrógeno, durante 30 minutos.

Preparación de los antisueros. En sistemas análogos un gran número de diferentes antisueros se pueden obtener comercialmente, ahorrando algunas veces trabajo y tiempo. En otras ocasiones, este propósito no se alcanza debido a la falta de potencia de los mismos, disponibilidad de antisueros de la especie adecuada o, en ciertos casos, por los reglamentos que restringen la producción comercial. Por estas razones

resulta más conveniente, y especialmente en el caso del primer antisuero, prepararlo en el laboratorio. En el presente estudio se acudió a la preparación local del antisuero anti-rotavirus, ante la imposibilidad de conseguirlo comercialmente y por no contar con un suero preinmune negativo para rotavirus, ya que estos agentes infecciosos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y fácilmente infectan los animales de laboratorio si éstos no se mantienen en condiciones adecuadas de aislamiento.

Generalmente la especificidad y la potencia del antisuero dependen de la pureza del antígeno utilizado en la inmunización; en consecuencia, se utilizaron rotavirus altamente purificados para la producción de suero total anti-rotavirus. Este procedimiento es aconsejable cuando se desea trabajar con agentes infecciosos o en sistemas donde el propósito es detectar un producto celular, por ejemplo, una hormona o una proteína.

Generalmente no se presentan mayores inconvenientes para obtener el anticuerpo ligante y el complejo soluble comercialmente de casas con reconocida experiencia en su producción. La selección de la especie animal para producir el antisuero es también factor de considerable importancia, ya que los anticuerpos de algunas especies animales reaccionan heterológicamente con el tejido donde se pretende detectar el antígeno, resultando entonces en reacciones positivas inespecíficas. El cobayo fue seleccionado en nuestro estudio considerando la facilidad en su manipulación, la alta especificidad del suero, el grado de divergencia evolutiva con las células y tejidos de las especies utilizadas y la potencia o título del suero obtenido solamente con tres inoculaciones de los animales con reducidas concentraciones de antígeno: 50 microgramos de proteína viral presentes en una mezcla igualmente proporcionada de partículas virales de cápside doble y simple por inóculo.

Especificidad. La prueba PAP constituye un método específico para la detección de antígenos en cultivos celulares y tejidos siempre y cuando se eviten y corrijan los principales factores que puedan alterarla. La falta de especificidad en el método PAP, proviene generalmente de dos fuentes: una es la inherente a los reactivos inmunocitoquímicos empleados, los cuales pueden reaccionar con los tejidos mediante una unión de tipo no inmunológico o enlace heterólogo no inmune. El otro tipo de inespecificidad es de naturaleza inmunológica, debida a reacciones cruzadas del primer antisuero utilizado en la prueba. Los factores que alteran principalmente la especificidad de la prueba son los siguientes:

- 1) Unión de algunos componentes del primer antisuero al tejido mediante enlaces no inmunológicos.
- 2) Unión directa al tejido de algún componente del antisuero ligante. Este componente puede ser un anticuerpo u otra molécula que reaccione directamente uniéndose al tejido o también a componentes del primer antisuero.
- 3) Unión directa al tejido del complejo soluble PAP.

Los componentes de naturaleza diferente a los anticuerpos, posiblemente existentes en el primer antisuero, generalmente no constituyen mayor problema en el método PAP que utiliza anticuerpos no marcados, ya que a pesar de que estos componentes pueden ser enlazados por el segundo antisuero los anticuerpos que intervienen en esta reacción son incapaces de unirse al complejo soluble PAP (23).

La unión inespecífica de anticuerpos del segundo antisuero o de componentes no inmunológicos al tejido, puede obviarse mediante la absorción de este suero con extractos de tejido de una especie animal heteróloga pero evolutivamente relacionada, por ejemplo, tratando el antisuero con extracto liofilizado de hígado de ratón. El tratamiento del suero por 24 horas a

4°C, seguido de centrifugación para separar el suero del tejido absorbente, son por lo general suficientes para alcanzar este objetivo. En el caso de cultivos celulares conviene absorber el suero con lisados celulares obtenidos de la misma línea celular en la que se pretende realizar los experimentos. En el presente trabajo el suero de cabra anticobayo fue absorbido con lisados de células MA104.

La unión del complejo soluble PAP al tejido se realiza generalmente con receptores para el fragmento Fc de la molécula de anticuerpo. Debido a que las preparaciones de tejido embebidos en parafina y los cortes finos para microscopía electrónica incluidas en araldita, generalmente destruyen estos receptores, esta unión resulta altamente improbable. La posibilidad de utilizar tejidos previamente embebidos en parafina para realizar estudios retrospectivos hacen de la prueba un método altamente deseable.

La prueba de peroxidasa-antiperoxidasa ha mostrado ser tan sensible como la inmunofluorescencia; sin embargo, el método PAP tiene la ventaja de que el antisuero primario puede ser utilizado en diluciones altas, representando un significativo ahorro de un valioso reactivo.

La mínima inespecificidad del método PAP, cuando se compara con la inmunofluorescencia, permite una determinación más precisa de antígenos presentes en bajas concentraciones en los tejidos, los cuales aparentemente no son detectables por inmunofluorescencia. Una ventaja adicional de este método sobre la inmunofluorescencia es que no requiere el uso de costoso equipo de microscopía con lámparas de luz ultravioleta, ya que el método ofrece la posibilidad de trabajar en microscopía de luz con resultados satisfactorios.

La posibilidad de incorporar un segundo anticuerpo dirigido a detectar otro tipo de antígeno en el mismo tejido, siempre y

cuando se utilice un segundo substrato que por su reacción genere un producto de diferente color, amplía la versatilidad de la prueba y la hace potencialmente útil en el estudio de infecciones mixtas en gastroenteritis. Finalmente, la aplicación del procedimiento en electromicroscopía permite estudios detallados de ultraestructura que pueden aclarar la morfogénesis y replicación de los rotavirus.

SUMMARY

Rotavirus infections in intestinal tissues of animals or in tissue culture cells were detected utilizing the immunocytochemical unlabeled soluble enzyme peroxidase-antiperoxidase (PAP) method. The PAP immunological stain technique revealed to be an available and sensitive method for detection of rotavirus infected cells. The PAP technique offers the advantages of negligible nonspecific staining reactions, the use of a standard light microscope, the production of permanent slides and the conservation of immunological reagents. The ability to detect antigens in paraffin embedded tissues enhances the usefulness of the PAP test for both prospective and retrospective studies.

BIBLIOGRAFIA

- 1.— BISHOP RF, DAVIDSON GP, HOLMES IH, RUCK BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* 1973; ii: 1281-1283.
- 2.— BOHL EH, KOHLER EM, SAIF U, CROSS RF, AGNES AG et al. Rotavirus as a cause of diarrhea in pigs. *J Am Vet Med Assoc* 1978; 172: 458-463.
- 3.— KAPIKIAN AZ et al. Gastroenteritis viruses. En: LENNETTE EH, SCHMIDT NJ. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*. 5 ed. Washington DC: American Public Health Association; 1979: 927.
- 4.— BISHOP RF, DAVIDSON GP, HOLMES IH, RUCK BJ. Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet* 1974; i: 149-151.
- 5.— KAPIKIAN AZ, FINSTONE SM, PURCELL RH, WYATT RG, THORNHILL TS et al. Detection and identification by immune electron microscopy of fastidious agents associated with respiratory illness, acute non-bacterial gastroenteritis and hepatitis A. *Perspect Virol* 1975; 9: 9-45.

- 6.— RHODES MB, STAJR EL, McCULLOUGH RA, MCGILL LD, MEBUS CA. Comparison of results using electron microscope, immunodiffusion and fluorescent antibody analyses to detect rotavirus in diarrheic fecal samples of calves. *Can J Comp Med* 1979; 43: 84-89.
- 7.— MIDDLETON PJ, PETRIC M, HEWITT CM, SZYMANSKI MT, TAM JS. Counter-immunoelectro-osmophoresis for the detection of infantile gastroenteritis virus (orbi-group) antigen and antibody. *J Clin Pathol* 1976; 29: 191-197.
- 8.— TUFVESSON B, JOHNSSONT. Immunoelectroosmophoresis for detection of reo-like virus: methodology and comparison with electron microscopy. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1976; 84: 225-228.
- 9.— KAPIKIAN AZ, CLINE WL, MEBUS CA, WYATT RG, KALICA AR et al. New complement-fixation test for the human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. *Lancet* 1975; i: 1056-1060.
- 10.— YOLKEN RH, WYATT RG, KALICA AR, KIM HW, BRANDT CD et al. Use of a free viral immunofluorescence assay to detect human reovirus-like agent in human stools. *Infect Immun* 1977; 16:467-470.
- 11.— MATSUNO G NAGAYOSHI S. Quantitative estimation of infantile gastroenteritis virus antigens in stools by immune adherence hemagglutination test. *J Clin Microbiol* 1978; 7: 310-311.
- 12.— ELLENS DI, LEEUW PW. Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of rotavirus infections in calves. *J Clin Microbiol* 1977; 6: 530-532.
- 13.— CUKOR G, BERRY MK, BLACKLOW NR. Simplified radioimmunoassay for detection of human rotavirus in stools. *J Infect Dis* 1978; 138: 906-910.
- 14.— MATSUNO S, INOUE S, KONO R. Plaque assay of neonatal calf diarrhea virus and the neutralizing antibody in human sera. *J Clin Microbiol* 1977; 5:1-4.
- 15.— HARRIS CC, YOKEN RH, KROKAN H, CHANG-HSU IH. Ultrasensitive enzymatic radioimmunoassay: application to detection of cholera toxin and rotavirus. *Proc Nat Acad Sci USA* 1979; 76:5336-5339.
- 16.— DAVIDSON GP, GOLLER I, BISHOP RF, TOWNLEY RR W, HOLMES IH et al. Immunofluorescence in duodenal mucosa of children with acute enteritis due to a new virus. *J Clin Pathol* 1975; 28:263-266.
- 17.— THORNHILL TS, WYATT RG, KALICA AR, DOLIN R, CHANOCK RM et al. Detection by immune electron microscopy of 26 to 27 nm virus-like particles associated with two family outbreaks of gastroenteritis. *J Infect Dis* 1977; 135: 20-27.
- 18.— MEBUS CA, STAIR EL, UNDERDAHL NR, TWIEHAUS MJ. Pathology of neonatal calf diarrhea induced by a reo-like virus. *Vet Pathol* 1971; 8: 490-505.
- 19.— STERNBERGER LA, HARDY PH Jr., CUCULIS JJ, MEYER HG. The unlabeled antibody-enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 1970; 18: 315.
- 20.— ISOBE Y, CHEN ST, NAKANE PK, BROWN WR. Studies on translocation of immunoglobulins across intestinal epithelium. I. Improvements in the peroxidase-labeled antibody method for application to study of human intestinal mucosa. *Acta Histochem Cytochem* 1977; 10:161-171.
- 21 — ESTES MK, GRAHAM DY, SMITH EM, GERBA CP. Rotavirus stability and inactivation. *J Gen Virol* 1979; 43: 403-409.
- 22.— BURNS J. Background staining and sensitivity of the unlabeled antibody-enzyme (PAP) method. Comparison with peroxidase labeled antibody sandwich method using formalin fixed paraffin embedded material. *Histochemistry* 1975; 43: 291.
- 23.— STERNBERGER LA, PETRALI JP. The unlabeled antibody enzyme method. Attempted use of peroxidase-labeled antigen as the third layer in the technique. *J Histochem Cytochem* 1977; 25:1036.