

**DETECCIÓN DE ADENOVIRUS HUMANOS POR
HIBRIDIZACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS:
La región de 55.1 a 68.8 u.m. es conservada
en distintos serotipos humanos**

*Felipe García V., Ph.D.
Departamento de Biología, Univalle
Raquel Ocaiones de Conde, M.Sc.
Facultad de Salud, U.I.S.
Martha C. Domínguez G., M.Sc.
Departamento Microbiología, Univalle
Isabella Borrero M., M.Sc.
Departamento de Microbiología, Univalle*

Resumen

El recombinante pAd8-117 fue empleado como sonda de hibridización para la detección de secuencias de genomas adenovirales. Inicialmente fue posible demostrar que el clon recombinante es específico en la detección de secuencias adenovirales hasta 1 ng de DNA viral. El segmento de Hind III de 4,6 Kb que codifica por el extremo 5' del gene del polipéptido pII, mostró homología parcial con secuencias de DNA de los serotipos 8, 12, 4, 3 y 2. La alta homología que existe entre Ad8 y 4 fue confirmada en experiencias de hibridización en "dot-blot". Los resultados obtenidos muestran que el clon pAd8-117 es una buena sonda para la detección diagnóstica de adenovirus. La comparación de diagnóstico por inmunofluorescencia indirecta y la hibridización de ácidos nucleicos empleando 14 aislados de niños con infección respiratoria aguda, mostró que la hibridización con el clon pAd8-117 es más sensible.

Summary

The recombinant clon pAd8-117 was used as DNA hybridization probe to detection of adenoviral genomic sequences. In first instance it was possible to show that this recombinant exhibited specificity for adenoviral sequence up to 1 ng up DNA of homologous nucleic acid only. The Hind III adenoviral 4,6 Kb fragment cloned into pAd8 117 corresponds to 5' p11 gene terminus and showed partial homology between DNA from serotypes 8, 12, 4, 3 and 2. The high level of homology existing between serotype 8 and 4 was confirmed in dot blot hybridization experiments. The results obtained showed that the recombinant pAd8 117 is a potential DNA probe for detection of adenovirus from clinical samples. Comparisons performed using IFA and dot-blot hybridization as diagnostic methods in fourteen adenoviral isolates from children with acute respiratory infection, 300 nm, revealed that hybridization is a powerful tool to detection of adenovirus causing acute respiratory infections in children.

Introducción

Los adenovirus humanos son importantes agentes asociados con enfermedades respiratorias, siendo también causa de infecciones oftálmicas o gastrointestinales [1].

Actualmente se conocen 47 serotipos de adenovirus humanos [1], [2]. Estos se encuentran agrupados en siete subgéneros (*A* a *G*) [3]. Entre ellos, algunos serotipos han sido correlacionados con enfermedad respiratoria aguda (serotipos 3 y 7), queratoconjuntivitis epidémica (serotipo 8) y diarreas (serotipos 40 y 41) [4].

Los métodos convencionales empleados para el estudio y detección de enfermedades adenovirales, proporcionan algunas veces, información ambigua. Avances recientes en la metodología del DNA recombinante, han permitido obtener grandes cantidades de fragmentos de DNA viral, sin aislamiento y purificación de cantidades apreciables de virus. Estas moléculas de ADN han sido clonadas en vectores [5].

Los plásmidos recombinantes obtenidos pueden ser utilizados como sondas para hibridización de ácidos nucleicos tanto para la identificación de virus en muestras clínicas o en cultivos celulares como para el diagnóstico de enfermedades ([6], [7]).

En este trabajo presentamos los resultados obtenidos en la evaluación de un clon recombinante, el pAd8-117, como sonda de detección de adenovirus. Este recombinante contiene un segmento de DNA que codifica por

secuencias del polipéptido pII principal componente del hexón del adenovirus 8 prototipo [8].

Materiales y Métodos

Cultivo celular

Se infectaron monocapas de células de riñón embrionario (REH), previamente crecidas en medio mínimo esencial suplementado con sales en Earle, 10% de suero fetal bovino, L-glutamina y antibióticos [9].

Cepas virales y ADN viral

Todos los adenovirus empleados fueron obtenidos del Centro de Cultivo y Referencia en Atlanta y corresponden a las cepas prototipo. Los serotipos 3, 8, 12, 2 y 4 son representantes de cinco de los siete subgéneros de adenovirus humanos. El ADN de cada uno de los virus, fue obtenido empleando el método de Hirt modificado [10], [11].

Replicación del plásmido y extracción de DNA

El plásmido pAd8-117 se seleccionó de una genoteca cuyos recombinantes contienen fragmentos de Hind III del adenovirus 8 prototipo clonado en el sitio de Hind III del gene de resistencia a ampicilina de pBR 322 [8]. El ADN del plásmido fue extraído por modificación del método de lisis alcalina de Birnboim y Doly (1979) [12], [13]. El ADN del clon fue digerido con las endonucleasas de restricción Hind III y Sal I (Pharmacia, uk) utilizando dos unidades/ug de DNA. Los fragmentos de restricción fueron visualizados en electroforesis en geles de agarosa 8% [13] conteniendo bromuro de etidio. Los geles se fotografiaron utilizando película Kodak TriX ASA 400 transiluminando los geles con luz ultravioleta a 300 nm [13].

Transferencia de ADN

Fragmentos de restricción del plásmido recombinante pAd8-117, fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa utilizando la metodología descrita por Southern (1975) [14]. Los ADN de los adenovirus y de las células REH no infectadas, fueron transferidos a filtros de nitrocelulosa por medio de la técnica de transferencia en "dot-blot" [15]. En los dos casos, los filtros, después de la transferencia fueron incubados a 65°C durante dos horas.

Hibridización de ADN

Los ADN del serotipo 8 y del clon recombinante pAd8-117 fueron marcados radioactivamente empleando $\alpha^{32}P[dATP]$ por "Nick translation" [15], [13].

Los ADN con actividades específicas 10^7 - 10^8 cpm/ug, fueron hibridizados en condiciones que favorecieron una homología mayor del 80% con los otros adenovirus empleados en este trabajo. En todos los casos, el filtro hibridizado fue expuesto sobre una película de rayos X- Omatic (Kodak) y revelados después de exposición por tiempos variables según la experiencia.

Resultados

Caracterización del clon pAd8-117

El plásmido recombinante pAd8-117 fue aislado de una genoteca construida empleando fragmentos de restricción con Hind III del adenovirus tipo 8. Estos fragmentos fueron ligados al sitio Hind III del vector pBR 322 siendo seleccionados por su marca genética de resistencia a tetraciclina.

Los análisis de patrones de restricción con Hind III demostraron que el clon pAd8-117 contiene un inserto de 4,6 Kb. Además las experiencias de hibridización de Southern, permitieron evidenciar que el fragmento de 4,6 Kb de Hind III posee secuencias de nucleótidos del genoma del adenovirus 8 prototipo (Figura 1).

Con el objetivo de caracterizar genéticamente el fragmento de 4,6 Kb, el clon pAd8-117 fue digerido con la enzima de restricción Sal I. El patrón electroforético obtenido, permitió visualizar fragmentos de restricción de 4480, 2250, 720 y 500 pb respectivamente. Con base en el análisis de restricción del genoma del Ad8 realizado por Tacaks (1985), la región del genoma comprendida entre 55,1 a 68,8 unidades mapa (4,6 Kb) comprende el 60% del extremo 5' del gene que codifica por el polipéptido pII principal componente del hexón. El fragmento de 4,6 Kb de Hind III presenta dos sitios de restricción con la enzima Sal I. Teniendo como base este raciocinio fue posible evidenciar que el fragmento de ADN clonado contiene secuencias del gene pII del adenovirus 8 prototipo.

Homología del clon pAd8-117 con secuencias de DNA de adenovirus

La homología del plásmido pAd8-117 por secuencias adenovirales, se evaluó en experimentos de hibridización de "dot-blot". En éstos fueron utilizados DNA de células REH, DNA del bacteriófago lambda como controles de cada experimento. En las condiciones de hibridización empleadas (T_m 20°C, 0,03 M NaCl), fue posible detectar hibridización con el ADN extraído de adenovirus 8 cepa referencia. Por el contrario no se determinaron señales hasta con 100ng de DNA extraído de células de REH y del bacteriófago lambda.

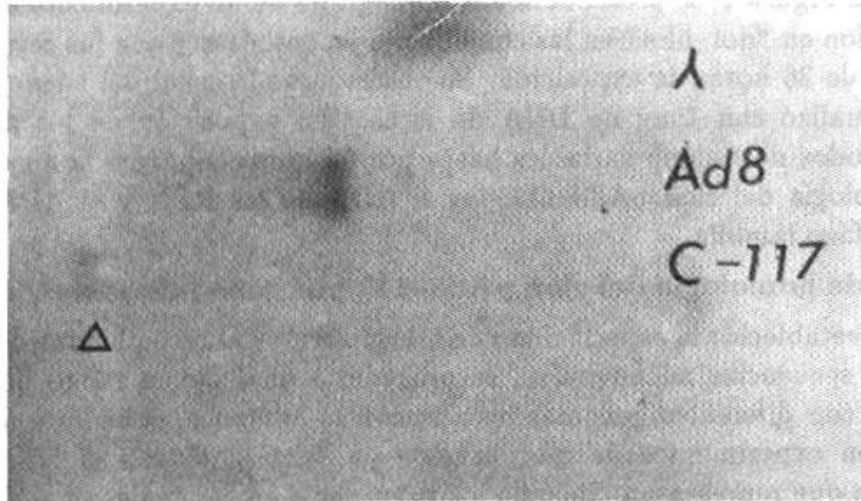


Figura 1: Hibridización en "Southern" del ADN de pAd8-117 digerido con Hind III con el ADN marcado por "Nick translation", del adenovirus tipo 8 cepa referencia. (Actividad específica = 10^7 cpm/ug ADN). (Ad8) ADN adenovirus tipo 8 cepa tipo; (C-117) ADN del clon recombinante pAd8-117. (λ) ADN del bacteriófago lambda.

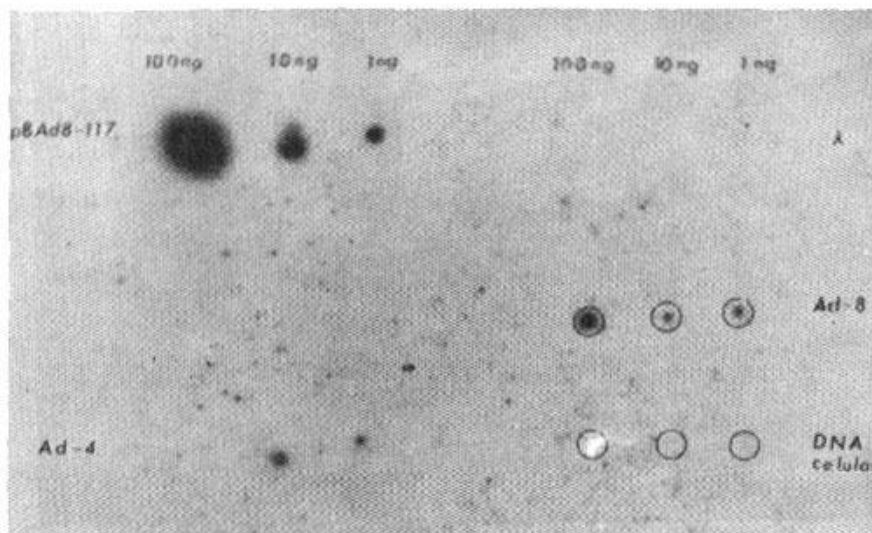


Figura 2: Patrón de hibridización en "dot blot" de ADN extraído de células REH, ADN del bacteriófago lambda y ADN de adenovirus 8 y 4 empleado como sonda el clon pAd8-117 marcado radioactivamente con [$\alpha^{32}P$]-dATP (act. específica 10^8 cpm/ug).

En la Figura 2, se presenta la autorradiografía de un experimento de hibridización en "dot-blot" en las condiciones ya descritas y que fue revelado después de 36 horas de exposición. Se observa que la señal del adenovirus 8 se visualizó con 1 ng de DNA de virus. La exposición de los filtros por períodos de tiempo variables hasta por 96 horas confirmó la ausencia de homología del clon pAd8-117 por el ADN de las REH y el ADN del bacteriófago lambda.

Rango de homología del clon pAd8-117 por genomas adenovirales

Una vez establecida la especificidad de hibridización del recombinante pAd8 117 con secuencias adenovirales, se procedió a analizar su rango de homología con diferentes genomas de adenovirus humanos. Con este fin se realizaron experimentos de hibridización en "dot-blot" con el DNA de serotipos que representan cinco de los subgéneros en los cuales se agrupan miembros del género *Mastadenovirus*. De otra parte se evaluó también el nivel mínimo de detección en cada caso, ensayando concentraciones diferentes de DNA de cada serotipo, de aproximadamente 10 ng/ y 100 ng respectivamente.

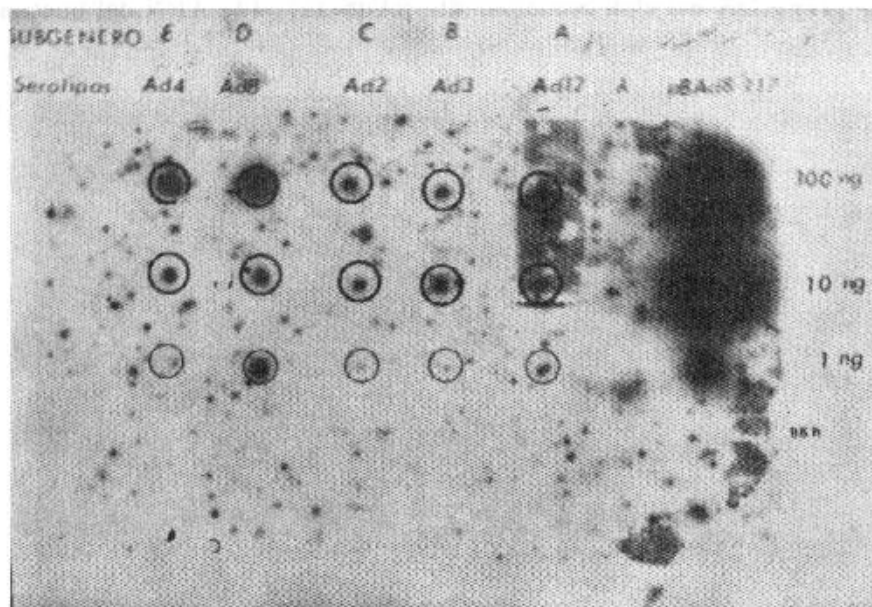


Figura 3: Detección de ADN de varios serotipos de adenovirus humanos por medio de hibridización de "dot-blot". ADN del recombinante pAd8-117 marcado radioactivamente con ($\alpha^{32}P$) dATP (act. específica 10^8 cpm/ug) fue utilizado como sonda de detección. Tiempo de exposición 36 horas.

Los resultados obtenidos, permitieron establecer señales de hibridización con 1 ng de los serotipos 8 y 4. Sin embargo sólo con 10 ng de ADN de los serotipos 12, 2 y 3 se obtuvieron señales de autoradiografía equivalentes. La Figura 3 muestra el patrón de hibridización en "dot-blot" del ADN de diferentes subgéneros de adenovirus con el clon recombinante pAd8-117. En todos los experimentos de hibridización fueron incluidos controles de ADN de células REH y ADN de lambda, además del mismo clon pAd8-117.

Comparación de la detección de adenovirus por pruebas indirectas y de hibridización con el clon pAd8-117

La tabla 1 presenta los resultados obtenidos en la aplicación de los criterios de efecto citopático, IFI e hibridización con el recombinante pAd8-117 en 14 aislados adenovirales recuperados de niños con infección respiratoria aguda. Es posible observar que la hibridización con el recombinante construido, pudo determinar con un criterio cierto aquellos aislados que fueron dudosos con la metodología de IFI (IRA 0272, 467, 845) en estos casos la hibridización fue negativa, este resultado reveló la ausencia de genomas adenovirales y evidenció una falta de sensibilidad en el diagnóstico por IFI de adenovirus respiratorios.

Tabla 1. Comparación entre diferentes métodos de diagnóstico de adenovirus respiratorios involucrados en infección aguda y la detección mediante hibridización directa con el ADN del clon pAd8-117.

AISLADO	CULTIVO	ECP	IFI	HIBRIDIZACIÓN CON CLON pAd8-117
IRA 0097	Hep ²	+	++	+
IRA 0100	REH	+	++	+
IRA 0105	Hep ² *	+	++	+
IRA 0115	REH	+	++	+
IRA 0116	REH	+	++	+
IRA 0156	REH, Hep ²	+,+	++	+
IRA 0272	Hep ²	+	++	-
IRA 0467	HEH, Hep ²	+,+	++	-
IRA 0509	Hep ²	+	++	+
IRA 0726	REH	+	++	*
IRA 0845	Hep ²	+	+	-
IRA 0871	Hep ² **	+	++	+
IRA 0874	REH, Hep ²	+	++	+
IRA 1003	REH, Hep ²	+	++	+

* : Aislamiento mixto adenovirus y RSV]

** : Aislamiento mixto adenovirus, I, IA

ECP : Efecto citopático

IFI : Inmunofluorescencia indirecta

Hep² : Línea celular de carcinoma laríngeo

REH : Células de riñón embrionario humano

Discusión

Se evaluó el clon pAd8-117 como sonda en la detección de adenovirus humanos. Los resultados de las experiencias de hibridización demostraron que el recombinante probado reconoce específicamente secuencias del genoma de los adenovirus tipo 8 y 4.

Los resultados obtenidos por Green *et. al.* (1979) [16] y Wadell *et. al.* (1980) [17], demostraron que el nivel de homología de genoma entre los diferentes adenovirus humanos es solamente del 9 al 20%, aunque la región de mayor homología que es compartida por todos los 47 serotipos conocidos no ha sido aún definida. Por esta razón, es difícil el desarrollo de una sonda de DNA que pueda reconocer el ADN de todos los tipos de adenovirus, de esta manera es necesario la construcción de sondas específicas.

Sin embargo, los estudios sobre comparación de secuencias nucleotídicas del gen del hexón (60 a 64 u.m.) de los serotipos 2, 3 y 5 [18] deben ser considerados para elegir una zona del genoma adenoviral que puede utilizarse para la construcción de una sonda de DNA. Los resultados previos del análisis de secuencias demuestran que esta región presenta dos zonas de alta homología entre los serotipos comparados y una zona heteróloga de tipo que corresponde a los determinantes antigénicos detectados mediante pruebas serológicas. Teniendo en cuenta las evidencias presentadas en estos estudios, se escogió la región del genoma Ad8 comprendida entre 55,1 y 68,8 u.m. la cual contiene el 65% del gen que codifica para la proteína del hexón (pII) y el gen para la proteína unida del extremo 5' del ADN viral. Esta región se clonó en el plásmido pAd8 117. Dicho recombinante porta un inserto de 4,6 Kb que corresponde a las secuencias nucleotídicas que codifican para la proteína del hexón y para la proteína unida al DNA, hecho que se ha demostrado con los análisis de hibridización y de restricción que fueron realizados. Con base en este criterio el plásmido recombinante pAd8-117 es un buen candidato para ser evaluado como sonda en la detección por hibridización de adenovirus humanos.

Una vez comprobada la naturaleza del recombinante pAd8-117, se procedió a hacer pruebas de hibridización, los ensayos realizados bajo las condiciones de fuerza iónica elevada (T_m -20°C; 0,03 M de NaCl), permitieron establecer una alta homología entre los ácidos nucleicos de los adenovirus humanos ensayados. En estas condiciones, sólo las cadenas de ADN que posean un 80% o más de nucleótidos complementarios pueden unirse para formar híbridos estables [19]. De acuerdo con lo anterior los resultados de las hibridizaciones demuestran que la región del genoma de los adenovirus

comprendida entre 55,1 a 68,8 u.m. posee secuencias que comparten un alto nivel de homología entre los diferentes subgéneros estudiados. El resultado obtenido apoya los de Wadell (1980b) [18], en el sentido que esta región del genoma adenoviral es altamente conservada entre el género **Mastadenovirus**.

De otra parte las señales observadas en las autorradiografías indican algunas diferencias en el grado de homología entre el ADN del serotipo 8 y el ADN de los otros serotipos. Como se consigna en los resultados, la sonda detecta a las 36 horas de exposición hasta 1 ng de ADN heterotípico. Sin embargo, en el ADN del serotipo 12 se evidenció señal de hibridización con 100 ng a las 96 horas, este resultado implica la existencia de una baja complementariedad de bases con el genoma del adenovirus 8.

Los resultados obtenidos en los experimentos de hibridización efectuados en este trabajo están de acuerdo con los datos reportados por Green (1979) [16] con respecto a la homología del genoma de los adenovirus del subgénero D que es compartida con miembros de otros subgéneros. En este sentido fue posible observar que la homología con Ad3 miembro del subgénero B es del 13,1%, con los del subgénero C (Ad2) es del 5,7% y con los del A (Ad12) es del 2,9% [16].

La evaluación del grado de homología entre ADN relacionados utilizando la técnica de hibridización, está determinada por las condiciones de estringencia de lavado utilizadas en el ensayo [10]. En las condiciones de alta estringencia (NaCl 0,003 M 1,5 mM citrato de sodio) empleadas en las hibridizaciones y en los lavados efectuados en este trabajo, solamente las moléculas de DNA con 14,3% o menos de bases no pareadas pueden ser térmicamente estables [19]. De otra manera usando condiciones de baja estringencia ($T_m - 35^\circ C$), es posible detectar homología entre regiones del genoma que presentan hasta un 36% de bases no pareadas.

De acuerdo con lo anterior, ensayando condiciones de más baja estringencia para realizar las pruebas de hibridización, es posible aumentar la sensibilidad de la sonda utilizada en este trabajo y de esta forma obtener resultados positivos a concentraciones de ADN menores a 1 ng. Esta posibilidad ha sido demostrada con los resultados de las pruebas de hibridización, bajo condiciones de menor estringencia, realizadas por García *et. al.* (1990) [20] para detectar ADN de adenovirus que han sido aislados a partir de aspirados nasofaríngeos, en el laboratorio de Virología de la Universidad del Valle. Bajo estas condiciones se obtuvo mejor señal autorradiográfica en menor tiempo de exposición. Esta posibilidad también ha sido demostrada

en los experimentos de hibridización desarrollados por Hyppia (1985) [21] utilizando como sonda el fragmento de ADN del Ad2 que codifica por la proteína del hexón. En dichos ensayos las condiciones de estringencia fueron más bajas a las utilizadas en este trabajo. Esto permitió detectar hasta 0.1 ng de ADN homotípico a las 16 horas de exposición autorradiográfica.

Los resultados obtenidos en las pruebas de hibridización realizadas en el presente trabajo, muestran que hay homología entre las secuencias de nucleótidos que codifican por la proteína del hexón y por la proteína unida al ADN entre los diferentes subgéneros de adenovirus. Teniendo en cuenta el sistema de cuantificación empleado, las cifras del nivel de sensibilidad son aproximaciones a las cantidades visualizadas semicuantitativamente. Sin embargo, este hecho demuestra la versatilidad del ensayo como una aproximación diagnóstica de adenovirus directamente de muestras clínicas.

El uso potencial del clon pAd8-117 como sonda de determinación diagnóstica de adenovirus humanos se ensayó en una prueba en la que catorce aislados adenovirales de niños con enfermedad respiratoria aguda obtenida de un estudio efectuado en el Centro de Salud de Siloé, Cali, Colombia, fueron determinados como tales por IFI y por hibridización con el clon pAd8-117 cuando se compararon los resultados, se pudo establecer que la hibridización con el recombinante construido por nuestro laboratorio es un método de mayor resolución que la IFI.

El empleo de recombinantes como sondas diagnósticas también ha sido evaluado por Hyppia (1985) [21]. Ciertos segmentos del adenovirus serotipo 2 fueron ensayados como sondas de detección de adenovirus, siendo el fragmento del hexón de Ad2 una potencial sonda diagnóstica de adenovirus. En nuestro trabajo hemos puesto en evidencia que el fragmento del hexón del adenovirus 8 cepa TRIM es también una sonda de potencial uso diagnóstico para la detección de adenovirus presentes en infecciones asociadas y es una alternativa más confiable y rápida que IFI.

Agradecimientos

Al señor Juan Carlos Aristizábal por el trabajo del levantamiento de texto y al personal del Departamento de Microbiología por la asistencia técnica. Este trabajo fue realizado con aportes financieros del ICFES a través del convenio ICFES-BID y de la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Valle.

Bibliografía

- [1] Horwitz, M.S. *Adenoviral diseases*, in B. M. Fields. (Ed), Virology, Raven Press, N.Y., (1985).
- [2] De Jong, J.C., Wigand, R., Kidd, A.H., Wadell, G., Kapsenberg, J.G., Masarie, C.J., Neimenbol, A.G., Pritzlaff, R.G. *Candidate adenovirus 40 and 41 fastidious adenoviruses from human infantile stool*, J. Med. Virol, 11: 215–231, (1983).
- [3] Wadell, G., de Jong, J.C., Wolontis, S. *Molecular epidemiology of adenovirus. Alternating appearance of two different genome types adenovirus 7 during epidemic outbreak in Europe from 1958 to 1980*. Infect Immun. 34: 368–372, (1981).
- [4] Schimitz, H.R., Wigand, R., Heinrich, W. *Worldwide epidemiology of human adenovirus infections*. Amm. J. Epidemiol. 117: 455–466, (1983).
- [5] Lentomaki, K.I., Julkunen, K., Sandelin, J., Salonen, M., Veitonen, M., Ranki, T. Hovi. *Rapid diagnosis of respiratory adenovirus in young adult men.*, J. Clin. Microbiol. 24 : 108–111, (1985).
- [6] Sakaoka, H., Tsugumatzu, A., Ozaki, J., Ishida, S., Fujinaga, T. *Restriction endonuclease cleavage analysis of simple virus isolates obtained from three pairs of siblings*. Infect. Immun., 43: 771–774, (1984).
- [7] Hyppia, T., Stalhandske, P., Vanionpaa, R., Pettersson, U. *Detection of enteroviruses by spot hybridization*. J. Clin. Microbiol., 19: 436–438, (1984).
- [8] García-Vallejo, F., Ocaziones, R., Borrero, I. *Manipulación de genomas adenovirales en la nueva biotecnología, Fundamentos y usos*. ICA. Editores J. Jaramillo, O. Agudelo, 205, (1990).
- [9] Rengifo B., García, F., Ocaziones, R., Borrero I. *Characterization of a new possible genomic subtype of adenovirus 3*. J. Clin. Microbiol. (sometido), (1991).
- [10] Hirt B. *Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures*. J. Mol. Biol. 26: 365–369, (1967).

- [11] Tibbitts, C., Johansson, K., Philipson, L. *Hidroxilapatita chromatography and formamide denaturation of adenovirus ADN*. J. Virol. 12: 218-225, (1973).
- [12] Birnboim, H.C., Doly, J. *A rapid alkaline extraction an procedure for sreening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acid. Res. 7: 15-13, (1979).
- [13] Maniatis, J., Pritsch, E.F., Sambrook, J. *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. (Cold Springer Harbor Laboratory Press), N.Y., (1982).
- [14] Southern, E.M. *Detection of specific secuencias among DNA fragments separated by gel electrophoresis*. J. Mol. Biol. 98: 503-517, (1975).
- [15] Stalhandske, P., Petterson, U. *Identification of DNA virus by membrane filter hibridization*. J. Clin. Microbiol. 15: 744-747 (1982).
- [16] Greenn, M., Mackey, K., Ridden, P. *Thirty one human adenoviruses serotypes (1-31) from five groups based upon DNA genome homologies*. Virology, 98: 481, (1979).
- [17] Wadell, G. *Molecular epidemiology of human adenoviruses*. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 110: 191-220, (1984).
- [18] Wadell, G., Hammarshjold, M., Winberg, G., Varsanyi, T., Sundell, G. *Genetic variability of adenovirus*. Ann. N.Y. Acad. Sci., 354: 16-42, (1980).
- [19] Szomolangyi, E., Masz, I. *Recombinant DNA technology in adenovirus research*. Acta Virol., 28: 84-88, (1984).
- [20] García, F., Domínguez, M.C., Borrero, I. *Variación genómica intratípica de adenovirus respiratorios aislados en Cali, en la nueva biotecnología. Fundamentos, usos y perspectivas*. ICA. Editores J. Jaramillo, O. Agudelo, 223, (1990)
- [21] Hyppia, T. *Detection of a adenovirus in nasopharingcal specimens by radiactive and non radiactive probes*. J. Clin. Microbiol., 21: 730-733, (1985).