

DETECCION DE UNA NUEVA VARIACION GENOMICA DE ADENOVIRUS 7 ASOCIADA A INFECCIONES SEVERAS DEL TRACTO RESPIRATORIO INFERIOR

ELSA G. BAUMEISTER, MARIANA FERNANDEZ COBO, VILMA SAVY

Departamento Virus, Instituto Nacional de Microbiología Dr. Carlos G. Malbrán, Buenos Aires

Resumen Se describe una nueva variación genómica de Adenovirus 7 asociada a infecciones graves del tracto respiratorio inferior en niños menores de tres años, y que ocurrieron durante 1990 en la ciudad de Buenos Aires. La misma pudo ser detectada solamente durante el mes de setiembre. El análisis de restricción con las enzimas BamHI, Bgl I, Bgl II y Sma I demostró que se halla altamente emparentada con el Adenovirus 7h recientemente descrito.

Los Adenovirus (ADV) son causa importante de enfermedad respiratoria, particularmente en niños menores de 5 años ya que el 5% de las infecciones respiratorias agudas (IRA) se deben a este virus². De todos los serotipos asociados a IRA el ADV 7 es el más frecuente, representando aproximadamente el 19,7% de todos los aislamientos que fueron tipificados y notificados a la Organización Mundial de la Salud durante el período 1967-1976^{9,10}. A través del análisis de restricción se ha demostrado que los ADV presentan una alta variabilidad genética, ya que se han encontrado distintos genotipos dentro de un mismo serotipo^{1,10}.

En particular, dentro de los ADV 7 se han descrito 11 tipos genómicos diferentes según el criterio establecido por Li y Wadell de acuerdo al patrón de restricción obtenido con BamHI^{5,6}. En el presente trabajo describimos una nueva variación genómica de ADV 7 asociada a enfermedad severa del tracto respiratorio inferior.

Materiales y métodos

Muestras

Todos los ADV fueron aislados de aspirados nasofaríngeos (ANF), que fueron colectados durante el año 1990 en hospitales pediátricos de la ciudad de Buenos Aires y que provenían de pacientes menores de tres años que presentaban enfermedad aguda del tracto respiratorio inferior (EATRI).

Diagnóstico

La presencia de ADV en los ANF fue demostrada por la detección de antígenos virales en extendidos celulares por inmunofluorescencia indirecta (IFI) y por aislamiento viral en cultivos de células HEp-2, a su vez confirmado por IFI. Para ello se utilizaron anticuerpos monoclonales cedidos por el CDC, Atlanta, EEUU.

Serotipificación

La seroneutralización fue llevada a cabo en microplacas con células HEp-2, usando antisueros de caballo específicos de tipo cedidos por el CDC, Atlanta, EEUU³.

Análisis de restricción

La amplificación viral se desarrolló en monocapas confluentes de células HEp-2 incubadas a 37°C en

Recibido: 7-X-1992

Aceptado: 17-III-1993

Dirección postal: Departamento Virus, Instituto Nacional de Microbiología, Av. Vélez Sarsfield 563, 1281 Buenos Aires, Argentina.

MEM-EARLE suplementado con 2% de suero fetal bovino y antibióticos hasta observar un ECP típico en el 80% del cultivo.

La extracción del DNA viral se realizó según O'Donnell et al⁸. Las endonucleasas de restricción (Bam HI, Bgl I, Bgl II y Sma I) fueron empleadas según las indicaciones del fabricante (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD). El producto de la restricción fue separado en un gel horizontal de agarosa al 1% en buffer TBE, las bandas de DNA se visualizaron con bromuro de etidio bajo luz UV.

Resultados

Se diagnosticaron 13 casos de EATRI asociada a ADV durante el año 1990, pudiéndose aislar 7 cepas, correspondiendo todas al serotipo 7 por neutralización (Tabla 1).

El análisis de restricción de los 7 aislamientos con Bam HI demostró la presencia de: un ADV 7c, dos ADV7h y cuatro ADV7 con un perfil hasta ahora no descripto. El perfil de esta nueva variación genómica (NVG) fue semejante al ADV 7h (Fig. 1).

Con objeto de profundizar la caracterización de la NVG se la comparó con el ADV 7h a través de la restricción con Bgl I, Bgl II y Sma I (Fig. 2) lle-

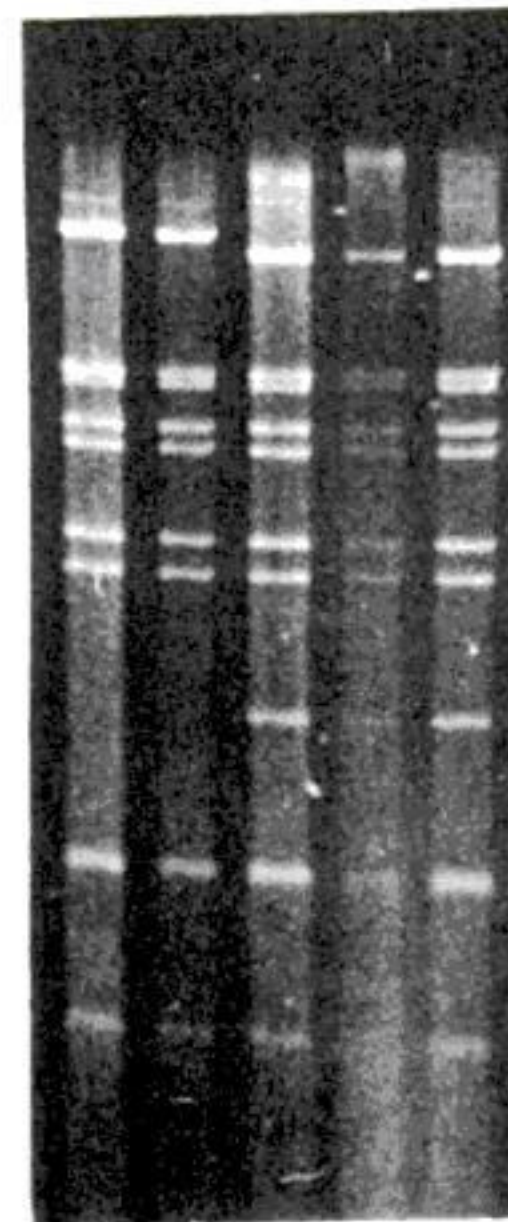


Fig. 1.— Patrón de restricción con BamHI Calles 1 y 2 ADV7h, calles 3,4 y 5 NVG.

gándose a observar un mismo perfil con estas enzimas. Todos los aislamientos de esta NVG presentaron idénticos perfiles con todas las enzimas ensayadas (Dato no mostrado).

TABLA 1.— Características de los Adenovirus aislados

Pte. N°	Sexo	Edad (mes)	Diag. Clin.	Detec. Ag.	Aislam.	Serotipo	Tipo Genómico
692	M	24	Neumonía	+	-*	NR	NR
703	M	8	EATRI	+	-*	NR	NR
761	M	1	EATRI	+	+	NR	NR
805	F	12	EATRI	+	-*	NR	NR
806	M	3	EATRI	+	+	7	NVG
808	F	13	Bronconeum.	+	+	7	h
809	M	3	Bronquiol.III	+	-	NR	NR
817	F	12	EATRI	+	+	7	NVG
820	F	ND	EATRI	+	+	7	NVG
843	F	11	Neumonitis/ encefalitis	+	+	7	NVG
851	M	7	EATRI	+	+	7	h
858	F	30	EATRI	+	+	7	c
895	F	12	EATRI	+	-	NR	NR

NR: No realizado; ND: Dato no disponible; NVG: Nueva variación genómica; *: Aislamiento no realizado debido a que el tiempo de evolución de la enfermedad superaba los 7 días; EATRI: Enfermedad aguda del tracto respiratorio inferior.

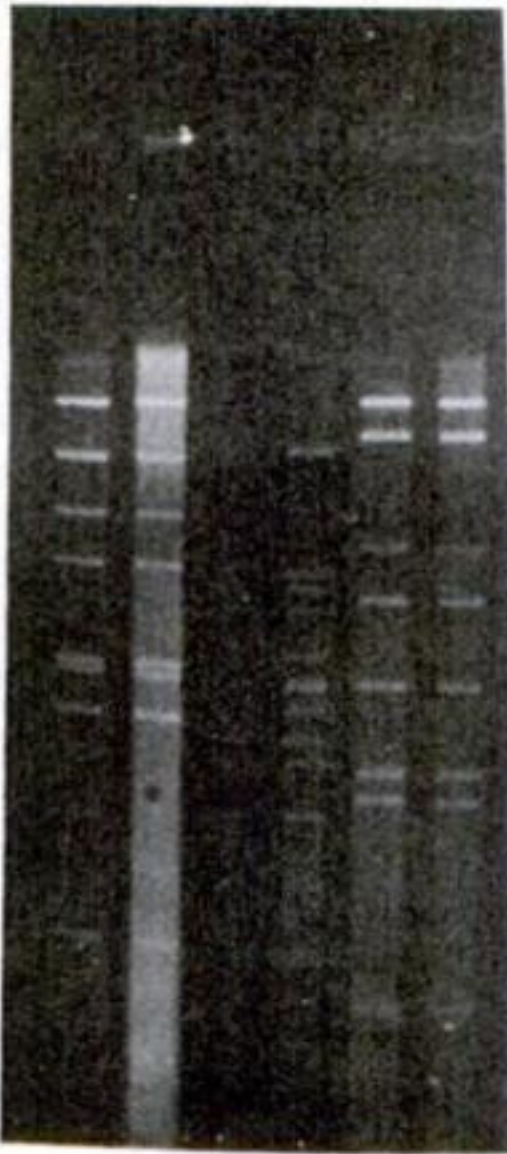


Fig. 2.— Comparación del perfil de restricción de la NVG (aislamiento n° 843) con el ADV7h (aislamiento n° 808). Calles 1 y 2: Smal, calles 3 y 4: BglII, calles 5 y 6: BglIII.

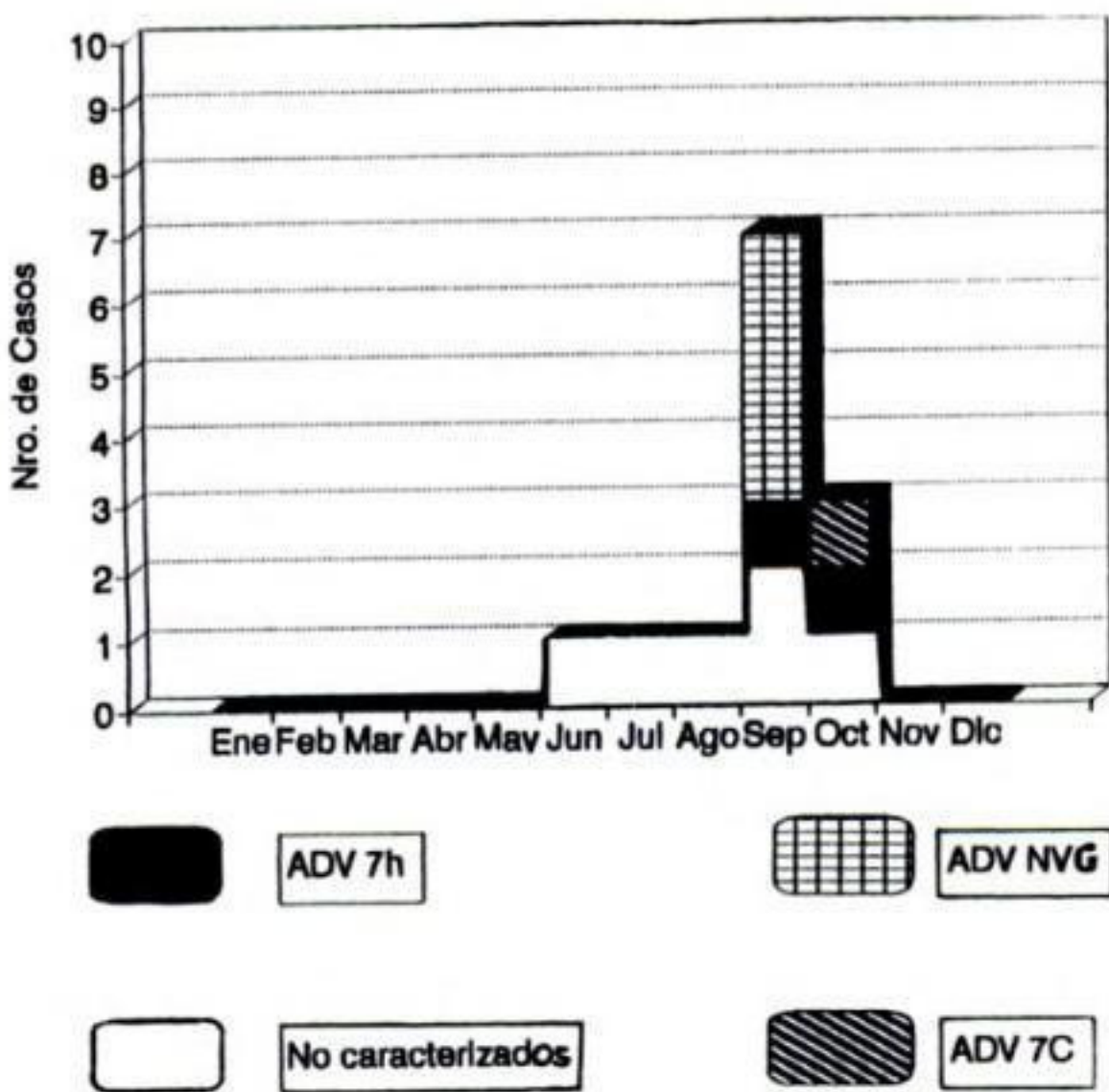


Fig. 3.— Distribución mensual de los ADV aislados durante el año 1990.

Discusión

Los ADV son probablemente responsables del 10% de las neumonías en niños pequeños⁴. Si bien la mayoría de ellos se recupera, se han descrito epidemias de ADV 7 que han resultado

en considerable mortalidad, tal el caso de un brote por ADV 7h ocurrido en Buenos Aires en 1988 (Datos no publicados). Es común encontrar secuelas en este tipo de pacientes aún varios años después de la infección respiratoria⁴.

Casos de ADV asociados a IRA pueden observarse a lo largo de todo el año, pero es más frecuente encontrarlos en su segunda mitad (invierno y comienzos de primavera). Como podemos ver en la Fig 3 los casos ADV positivos se concentraron en ese período, como así también los asociados a la NVG. A diferencia de los años anteriores en que predominó el ADV7h, en 1990 la NVG resultó ser la más frecuente entre los aislamientos estudiados (Tabla 1).

Como lo demuestra el perfil de restricción, esta NVG está ampliamente emparentada con el ADV7h, y probablemente derive de ella por adquisición de un nuevo sitio BamHI.

Siguiendo el criterio de nomenclatura de Li y Wadell⁶ podría asignársele una nueva letra (ADV7"i") a la NVG. De todas formas corresponde encarar un estudio más exhaustivo con un mayor número de enzimas, a fin de precisar su real homología con los tipos genómicos ya descriptos.

Summary

A new genomic variation of Adenovirus 7 associated to severe infections of the lower respiratory tract.

We report a new genomic variation of Adenovirus 7, associated to severe infections of the lower respiratory tract isolated during September 1990, from children under 3 years of age and living in Buenos Aires city. The restriction analysis with the BamHI, BglII, BglIII and Smal restriction endonucleases demonstrated that the new variation is highly related to the recently described Adenovirus 7h.

Bibliografía

1. Bailey A., Richmond S: Genetic heterogeneity of recent isolates of Adenovirus types 3,4 and 7. *J Clin Microbiol* 24: 30,1986.
2. Brandt CD, Kim HW, Varogosko AJ, et al: Infections in 18 000 infants and children in a controlled study of respiratory tract diseases. Adenovirus pathogenicity in relation to serologic type and illness. *Am J Epidemiol* 90: 484, 1969.

3. Fife K, Ashley R, Shield A, et al: Comparison of neutralization and DNA restriction enzyme, methods for typing clinical isolates of human Adenovirus. *J Clin Microbiol*, 22: 95, 1985.
4. Horwit MS: Adenoviral diseases. In: Virology, BN Field et al (eds). Raven Press, New York, 1985, p 477.
5. Kajon AE, Wadell G: Characterization of Adenovirus genome type 7h: Analysis of its relationship to other members of serotype 7. *Intervirology* 33:86, 1992.
6. Li Q, Wadell G: Analysis of 15 different genome types of Adenovirus 7 isolated on five continents. *J Virol*, 60: 331, 1986.
7. Niel C, Moraes MTB, Mistchenko AS, Leife JPG, Gomes SA: Restriction site mapping of four types of Adenovirus types 3 and 7 isolated in South America. *J Med Virol*, 33: 123, 1991.
8. O'Donnell B, Bell E, Payne B, Krainer V, Desselberger U.: DNA analysis of species 3 Adenovirus 7 isolated during summer outbreak of conjunctivitis and pharyngoconjunctival fever in Glasgow and London areas in 1981. *J Med Virol*, 18: 213, 1986.
9. Schmitz H, Wigand R, Heinrich W: World wide epidemiology of human adenovirus infections. *Am J Epidemiol* 117: 445, 1983.
10. Wadell G, Cooney MK, Da Costa Linhares A, et al: Molecular epidemiology of adenovirus. Global distribution of adenovirus 7 genome types. *J Clin Microbiol*, 21: 403, 1985.

...I had just finished a very difficult but necessary project. As so often in the past, I had to prepare a large research grant application, the worst kind of work I know. I have to write down what I already know and have already published. I learn nothing new from it. It has to be written clearly and concisely to be competitive. It must contain detailed plans for the future, even though both I and the funding agency realize that such plans are purely fictitious. In reality, the scientific problem has to be pursued step by step, without the constraints of a rigidly determined plan. This is the only part of my work that I dislike. For a period of two or three months I feel as if I am in prison. All my energy and the pleasure of work is gone, but I have to finish it! It is like climbing a high mountain.

...Acababa de dar fin a un proyecto tan difícil como necesario. Como tantas veces en el pasado, tenía que preparar una solicitud para un importante subsidio de investigación, el peor trabajo que conozco. Tengo que anotar todo lo que sé y que he publicado hasta ahora. No aprendo nada nuevo con eso. Tiene que ser presentado en forma clara y concisa para ser competitivo. Debe contener planes detallados para el futuro, a pesar que tanto la agencia que otorga fondos como yo mismo sabemos que estos planes son puramente ficticios. En realidad, la investigación científica debe proseguir paso a paso, sin la restricción de un plan rígido predeterminado. Esta es la única parte de mi trabajo que no me gusta. Durante dos o tres meses me siento como si estuviera en prisión. Toda mi energía y el placer de mi trabajo se ha ido ¡pero tengo que terminarlo! Es como escalar una gran montaña.

George Klein

Pietà. The MIT Press, Cambridge MA, 1992, p 159