

Puesta a punto de dos técnicas de detección y cuantificación molecular de los diferentes serotipos de Adenovirus Aviar pertenecientes al grupo I (*Género Aviadenovirus*)

S. OLIVER^{1*}, N. MAJÓ^{1,2}, A. RAMIS^{1,2}, R. RIVAS¹, M. BIARNÉS³, A. BLANCO³, N. BUSQUETS¹, R. DOLZ¹

¹Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), UAB-IRTA, Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, España; ²Departament de Sanitat i Anatomia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, España; ³Centre de Sanitat Avícola de Catalunya i Aragó (CESAC), Avda. Castellvell, 32, 43206 Reus, Tarragona, España.

*Autor corresposal: vet.salva@hotmail.com

Resumen

La hepatitis por cuerpos de inclusión (IBH) es una enfermedad vírica y aguda causada por diferentes serotipos de adenovirus aviar (FAdV). De forma clásica, el serotipado se lleva a cabo mediante técnicas de seroneutralización pero, por su coste y complejidad, no se suele realizar de manera rutinaria.

Por ello, se pusieron a punto dos técnicas moleculares. La primera estaba basada en la amplificación y secuenciación parcial del gen hexón del FAdV. El análisis filogenético y de similitud de las secuencias obtenidas permitió clasificar 4 de 7 virus detectados en el genotipo D, serotipo 11; y 3 de los 7 virus en el genotipo E, serotipo 8b. La segunda técnica desarrollada fue una PCR a tiempo real, mediante la cual se pudo realizar el análisis de las muestras estudiadas con una sensibilidad mayor a la de la PCR convencional.

En conclusión, mediante estas dos técnicas se podrá clasificar los serotipos de FAdV implicados en los brotes estudiados de una manera más rápida y detectar con elevada sensibilidad la carga viral presente en diferentes tipos de muestras de aves infectadas por FAdV.

Abstract

Inclusion body hepatitis (IBH) is an acute viral disease caused by several serotypes of fowl adenovirus (FAdV). Conventionally, serotyping was carried out by serum neutralization techniques but due to cost and difficulty, not usually performed routinely.

Therefore, two techniques were developed. The first method consisted of the amplification and partial sequencing of the FAdV hexon gene. Phylogenetic and similarity analysis of sequences obtained classified 4 of 7 viruses detected in group D genotype, serotype 11; and 3 of 7 viruses detected in group E genotype, serotype 8b. Real time PCR was the second technique developed, which the studied samples were analyzed with a higher sensitivity than conventional PCR.

In conclusion, these two techniques may classify FAdV serotypes implicated in outbreaks more quickly and detect with high sensitivity viral burden present in different samples of FAdV infected birds.

Palabras clave: Adenovirus aviar; caracterización molecular; hepatitis por cuerpos de inclusión.

Introducción

La hepatitis por cuerpos de inclusión (IBH) es una enfermedad vírica y aguda causada por adenovirus aviáres (FAdV) pertenecientes al género Aviadenovirus, previamente denominado grupo I. Dentro de este género se han descrito 12 serotipos de diferente patogenicidad (Hess, 2000) que se agrupan en 5 genotipos (Benkö et al., 2005). Los brotes de IBH descritos hasta el momento, están mayoritariamente asociados a los serotipos 2, 8b y 11 (Dar et al., 2012; Mase et al., 2012; Grgic et al., 2011; Ojkic et al., 2008). Aunque existe poca información al respecto, se considera que existe muy baja protección cruzada entre los diferentes serotipos. De forma clásica, el serotipado se lleva a cabo mediante técnicas de seroneutralización pero, por su coste y complejidad, no se suele realizar de manera rutinaria.

El objetivo de este estudio fue poner a punto una técnica molecular basada en la amplificación y secuenciación parcial del gen hexón del FAdV, que permitiera la detección y clasificación de FAdV, así como una PCR a tiempo real para poder realizar la detección de las muestras con una mayor sensibilidad.

Material y métodos

Detección y clasificación de los FAdVs presentes en las muestras

Para comprobar la funcionalidad de las técnicas desarrolladas, se seleccionaron 7 casos de IBH remitidos al CRESA y al CESAC y confirmados mediante histopatología durante los años 2011 y 2012.

- Extracción de ADN y PCR convencional

La extracción de ADN se realizó a partir de muestras de hígado de los casos seleccionados. El kit empleado para esta técnica fue el NucleoSpin Blood (Macherey-Nagel). En la PCR se utilizaron unos primers (H1/H2), previamente descritos (Raue y Hess, 1998), que amplificaban parcialmente el gen que codifica las proteínas hexones del FAdV. El volumen final de reacción fue de 25 µl que contenían 2,5 µl de cada uno de los primers a 10 µM y 5 µl de ADN. La desnaturalización inicial se realizó a 94°C durante 2 min. Las condiciones cíclicas fueron de 30 ciclos a 94°C durante 1 min, 60°C durante 1 min y 72°C durante 1,5 min, seguidos de una amplificación final de 72°C durante 2 min y un mantenimiento a 4°C. Los productos amplificados, que tenían un tamaño de 1219 pb, fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1,8% con 1,2 µl de bromuro de etidio (110 V, 30 min).

- Secuenciación parcial del gen hexón del FAdV y análisis filogenético

Antes de llevar a cabo la secuenciación, los productos de la PCR anterior fueron purificados usando el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). A partir de estos productos ya purificados se realizaron dos PCRs, una utilizando el primer H1 y otra con el primer H2. En cada PCR se obtuvo un volumen final de reacción de 10 µl, los cuales contenían 0,5 µl de Big dye, 1 µl del primer correspondiente a 5 µM y 2 µl de producto purificado. Posteriormente, los productos amplificados fueron precipitados y resuspendidos en formamida y secuenciados. En todas las muestras se obtuvo un fragmento de unos 500 nucleótidos para la comparación molecular.

PCR a tiempo real utilizando SYBR Green

- Aislamiento y titulación del virus

A partir de hígado congelado de dos casos de IBH confirmados con la técnica anterior, uno perteneciente al serotipo 8b y el otro al serotipo 11, se realizó aislamiento y titulación de los virus. En ambas técnicas se emplearon cultivos primarios de hepatocitos a partir de embriones de pollo de 15

días. El aislamiento fue realizado en placas de cultivo con 5×10^6 células/placa, éstas fueron infectadas e incubadas a 37°C y 5% CO_2 , el efecto citopático se observó entre 24-48 horas post-infección.

Para llevar a cabo la titulación vírica se realizaron varios pases, sembrándose $17,5 \times 10^6$ células por placa y observando una monocapa confluyente de células en un periodo de 24-48 horas. Consecutivamente, se realizó la infección y lectura del efecto citopático a las 72-96 horas post-infección. El título vírico fue calculado empleando el método Reed–Muench.

- PCR a tiempo real

Los primers (52K-fw/52K-rv) utilizados en la PCR a tiempo real fueron descritos previamente (Günes et al., 2012) y amplifican la región del gen 52K del FAdV. El fluorocromo empleado como marcador para esta PCR fue el SYBR Green y el volumen final de reacción que se obtuvo fue de 25 μl , los cuales contenían 1,75 μl de cada uno de los primers a $10 \mu\text{M}$ y 5 μl de ADN. El termoperfil de esta reacción consistía en una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min, 40 ciclos a 94°C durante 1 min, 60°C durante 1 min (en esta etapa fue detectada la fluorescencia) y 72°C durante 1,5 min; y una curva de disociación final a 95°C durante 15 seg, 60°C durante 1 min y 95°C durante 15 seg. Los productos amplificados tenían un tamaño de 176 pb.

Resultados y discusión

Detección y clasificación de los FAdVs presentes en las muestras

Las secuencias obtenidas mediante PCR convencional y secuenciación se compararon con 12 secuencias de virus de referencia de cada uno de los serotipos de FAdV publicadas en el GenBank y a partir de estas secuencias se realizó un análisis filogenético utilizando los programas BioEdit Sequence Alignment Editor y Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) (Figura 1). Debido a los primers utilizados en la PCR convencional, estas secuencias tuvieron un tamaño suficiente (500 nucleótidos) como para poder realizar un posterior análisis filogenético con el fin de clasificarlas según su genotipo y serotipo de FAdV.

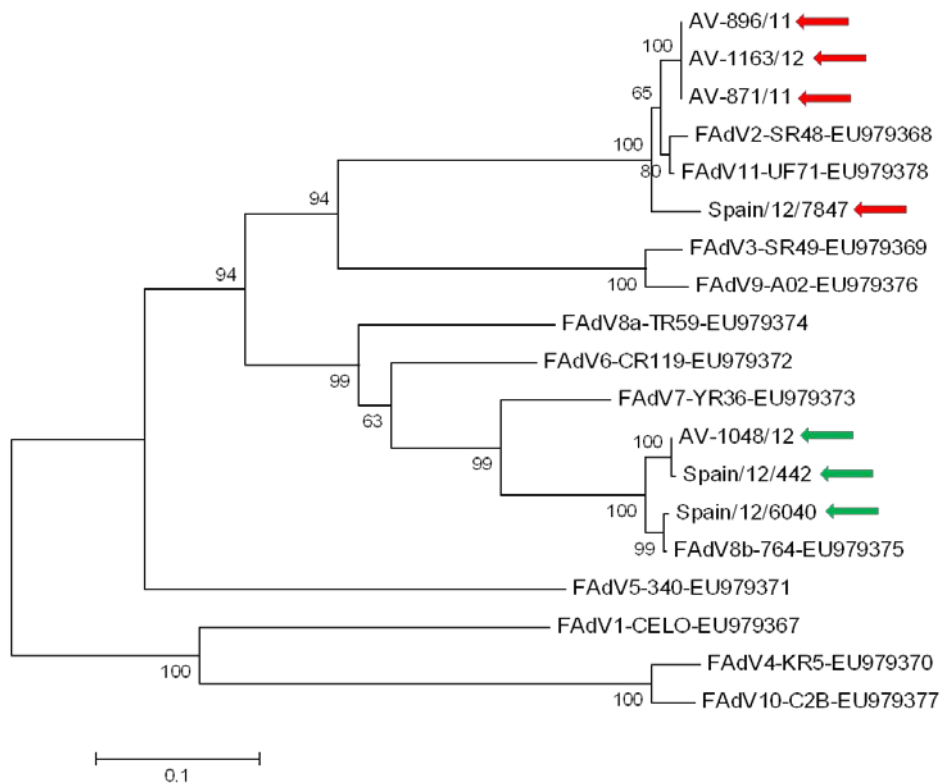


Figura 1. Árbol filogenético realizado a partir de las secuencias nucleotídicas (500 pb) obtenidas en nuestra secuenciación (señaladas con una flecha) y de las 12 secuencias de referencia de cada uno de los serotipos de FAdV. El programa utilizado fue el Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Maximum Composite Likelihood Model, 1000 Bootstrap Replications).

El árbol filogenético agrupó 4 (AV-896/11; AV-1163/12; AV-871/11; Spain/12/7847) de los 7 virus en la misma rama que los serotipos 2 y 11 (genotipo D). Los otros 3 virus (AV-1048/12; Spain/12/442; Spain/12/6040) se agruparon en la misma rama que el serotipo 8b (genotipo E).

El análisis de las similitudes nucleotídicas y aminoacídicas mostró que los 3 virus agrupados en el genotipo E tenían más de un 96% de similitud nucleotídica y aminoacídica entre ellos, y la máxima similitud con los adenovirus de referencia la mostraron con el adenovirus del serotipo 8b. Por lo que respecta a los virus agrupados en el serotipo E, tres virus (AV-896/11; AV-1163/12; AV-871/11) mostraron un 100% de similitud entre ellos y junto con el otro caso (Spain/12/7847) mostraron la máxima similitud, respecto a los adenovirus de referencia, con los serotipos 2 y 11.

PCR a tiempo real utilizando SYBR Green y sensibilidad de las técnicas

Para determinar la sensibilidad tanto de la PCR convencional realizada en la primera parte de este estudio como de la PCR a tiempo real, con el fin de poderlas comparar, se realizaron diluciones seriadas decimales de las dos suspensiones víricas aisladas. Los títulos obtenidos previamente en estas dos suspensiones fueron de $10^{6.5}$ TCID₅₀/ml para el serotipo 8b y $10^{7.91}$ TCID₅₀/ml para el serotipo 11.

La PCR convencional consiguió amplificar hasta la dilución 10^{-3} en ambos serotipos (Figura 2), lo que correspondió a un título vírico de $6,32 \times 10^3$ TCID₅₀/ml y $1,62 \times 10^5$ TCID₅₀/ml, para los serotipos 8b y 11 respectivamente. Por otro lado, la PCR a tiempo real detectó hasta la dilución 10^{-6} en ambas suspensiones víricas (Figura 3), lo que equivalió a un título vírico de 6 TCID₅₀/ml y $1,62 \times 10^2$ TCID₅₀/ml, para los serotipos 8b y 11 respectivamente.

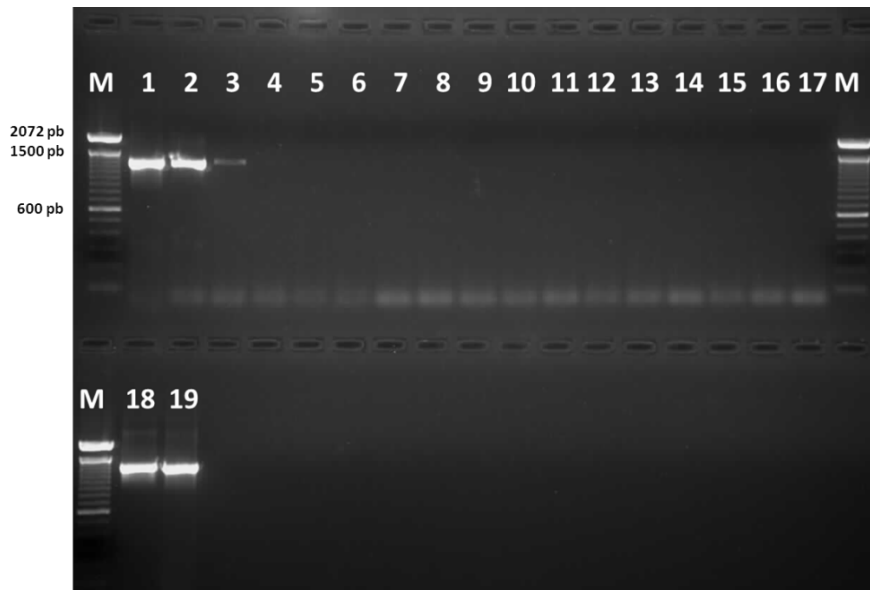


Figura 2. Electroforesis de los productos de la PCR convencional realizada a partir de las diluciones decimales seriadas de la suspensión vírica del serotipo 8b. Pocillo M: Marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder, Invitrogen). Pocillos 1-4: diluciones 10^{-1} a 10^{-4} ; Pocillos 6-9: diluciones 10^{-5} a 10^{-8} ; Pocillos 11-14: diluciones 10^{-9} a 10^{-12} ; Pocillo 16: dilución 10^{-13} ; Pocillos 5, 10, 15: Controles negativos de PCR; Pocillo 17: Control negativo de extracción; Pocillos 18 y 19: Controles positivos de extracción y de PCR, respectivamente.

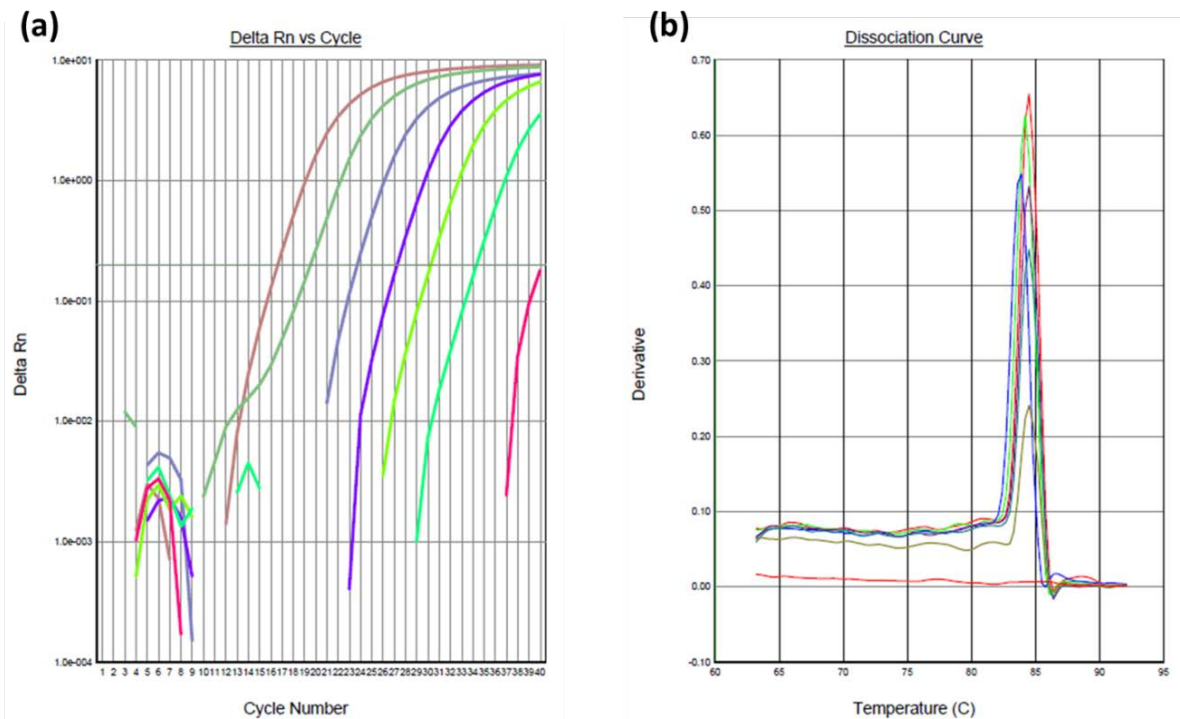


Figura 3. PCR a tiempo real de las diluciones 10^{-1} a 10^{-7} de la suspensión vírica perteneciente al serotipo 8b. (a) Gráfico de amplificación. El threshold, detectado automáticamente por el software, fue de 0,2. (b) Curva de fusión. La temperatura de fusión de las muestras amplificadas fue de $84,2 \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Por lo tanto, la PCR a tiempo real puesta a punto en nuestro centro fue aproximadamente 10^3 veces más sensible que la PCR convencional. Lo que nos permitirá analizar cuantitativamente muestras de IBH con una mayor sensibilidad, quedando el uso de la PCR convencional enfocado a la elaboración

de estudios filogenéticos ya que los productos obtenidos con esta técnica tienen una mayor longitud de secuencia.

Conclusiones

Gracias a estas dos técnicas se podrá clasificar los serotipos de FAdV implicados en los brotes estudiados de una manera más rápida que por serología y detectar con elevada sensibilidad la carga viral presente en diferentes tipos de muestras de aves infectadas por FAdV.

Bibliografía

- BENKÖ M., HARRACH B., BOTH G.W., RUSSELL W.C., ADAIR B.M., ÁDÁM É., DE JONG J.C., HESS M., JOHNSON M., KAJON A., KIDD A.H., LEHMKUHL H.D., LI Q.G., MAUTNER V., PRING-AKERBLOM P., WADELL G.** (2005). Family Adenoviridae. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J. (Eds.), *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, New York, NY, 213–228.
- DAR A., GOMIS S., SHIRLEY I., MUTWIRI G., BROWNLIE R., POTTER A., GERDTS V., AND TIKOO S.K.** (2012). Pathotypic and Molecular Characterization of a Fowl Adenovirus Associated with Inclusion Body Hepatitis in Saskatchewan Chickens. *Avian diseases*, **56**:73–81.
- GRGIC H., YANG D.H., NAGY E.** (2011). Pathogenicity and complete genome sequence of a fowl adenovirus serotype 8 isolate. *Virus Research*, **156**: 91–97.
- GÜNES A., MAREK A., GRAFL B., BERGER E., HESS M.** (2012). Real-time PCR assay for universal detection and quantitation of all five species of fowl adenoviruses (FAdV-A to FAdV-E). *Journal of Virological Methods*, **183**: 147-153.
- HESS M.** (2000). Detection and differentiation of avian adenoviruses: a review. *Avian Pathology*, **29**: 195–206.
- MASE M., NAKAMURA K., MINAMI F.** (2012). Fowl Adenoviruses Isolated from Chickens with Inclusion Body Hepatitis in Japan, 2009-2010. *Journal of Veterinary Science*, **74**: 1087-1089.
- OJKIC, D., KRELL, P.J., TUBOLY, T., NAGY, É.** (2008). Characterization of fowl adenoviruses isolated in Ontario and Quebec, Canada. *Canadian Journal of Veterinary Research*, **72**: 236–241.
- RAUE R., HESS M.** (1998). Hexon based PCRs combined with restriction enzyme analysis for rapid detection and differentiation of fowl adenoviruses and egg drop syndrome virus. *Journal of Virological Methods*, **73**: 211–217.