

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Sanidad Animal



TESIS DOCTORAL

Detección, prevalencia y epidemiología molecular de virus en cetáceos del Mediterráneo.

Detection, prevalence and molecular epidemiology of virus in cetaceans from Mediterranean sea

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Consuelo Rubio Guerri

Director

José Manuel Sánchez-Vizcaíno

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**Departamento de Sanidad Animal
Centro VISAVET**



**Detección, prevalencia y epidemiología molecular de virus en
cetáceos del Mediterráneo**

**Detection, prevalence and molecular epidemiology of virus in
cetaceans from Mediterranean Sea**

MEMORIA DE TESIS DOCTORAL

Dña. Consuelo Rubio Guerri

DIRIGIDA POR EL DOCTOR

Prof. Jose Manuel Sánchez-Vizcaíno

MADRID 2015



D. Jose Manuel Sánchez-Vizcaíno Rodríguez, Doctor en Veterinaria y Catedrático de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN

Que Dña Consuelo Rubio Guerri, licenciada en Veterinaria, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “ Detección, prevalencia y epidemiología molecular de virus en cetáceos del Mediterráneo”, considerando que reúne los requisitos necesarios para ser presentado como Tesis Doctoral.

En Madrid, a 6 de Julio de 2015

Prof. Dr. José Manuel Sánchez-Vizcaíno

A mis padres y a Josito

AGRADECIMIENTOS



AGRADECIMIENTOS

TEXTO

Sabemos lo que somos pero no lo que podemos llegar a ser

William Shakespeare

ÍNDICE

<i>GLOSARIO DE ABREVIATURAS</i>	<i>i</i>
<i>ÍNDICE DE TABLAS</i>	<i>iii</i>
<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i>	<i>v</i>
<i>RESUMEN/ABSTRACT</i>	<i>vii</i>
CAPÍTULO I: Introducción	1
1. GENERALIDADES DE LOS CETÁCEOS	3
2. ENFERMEDADES EMERGENTES Y REEMERGENTES ...	4
3. MORBILLIVIRUS DE LOS CETÁCEOS	9
3.1. Características de la enfermedad.....	9
3.1.1. Etiología.....	9
3.1.2. Caracterización del virus.....	10
3.1.3. Patogenia.....	12
3.1.4. Epidemiología.....	14
3.1.5. Signos clínicos.....	16
3.1.6. Lesiones.....	17
3.1.7. Diagnóstico.....	18
3.1.8. Tratamiento.....	22
3.1.9. Vacunas y medidas de control.....	22
3.2. Distribución de la enfermedad.....	24
3.2.1. Europa.....	24
3.2.2. Norte América.....	28
3.2.3. Sudamérica.....	32
3.2.4. Australasia.....	32

4. ADENOVIRUS	35
4.2. Características del virus.....	35
4.1.1. Etiología.....	35
4.1.2. Replicación del virus.....	37
4.1.3. Clasificación del virus.....	38
4.1.4. Patogénesis.....	39
4.1.5. Adenovirus en especies no marinas.....	40
4.2. Adenovirus en mamíferos marinos.....	41
CAPÍTULO II: Justificación y objetivos	45
CAPÍTULO III: Resultados	53
OBJETIVO 1 : Avance en el conocimiento de morbillivirus de los cetáceos	55
Subobjetivo 1.1.: Evaluar nuevas técnicas de diagnóstico para la detección rápida, sensible y específica de las tres cepas de CeMV.....	57
Subobjetivo 1.2.: Actuación y detección ante un brote de CeMV y profundizar en los posibles orígenes del brote.....	65
Subobjetivo 1.3.: Seguimiento epidemiológico de CeMV en los cetáceos varados en las costas mediterráneas en periodos interepizoóticos.	73
OBJETIVO 2: Identificación de nuevos virus en cetáceos.	
Adenovirus: clínica, diagnóstico, filogenia y aislamiento viral.	87
CAPÍTULO IV: Discusión general	99
CAPÍTULO V: Conclusiones	111
BIBLIOGRAFÍA	117
ANEXOS	131

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ALS	Alanina aminotrasferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
BWMV	Morbillivirus del zifio
CAR	Receptores coxsackie-adenovirus
CDV	Virus del moquillo canino
CeMV	Morbillivirus de los cetáceos
CE	Centroeste
CSLAdV-1	California sea lion adenovirus-1
DMV	Morbillivirus del delfín
ELISA	Inmunoabsorción ligado a enzimas
H	Hemaglutinia
iELISA	ELISA indirecto
IHQ	Inmunohistoquímica
IRL	Lago del río Indio
ITR	Repeticiones terminales
L	ARN dependiente de la polimerasa
M	Proteína de la matriz
MeV	Virus del sarampión
MSMV	Morbillivirus de la foca monje
N	Neuraminidas
NE	Noreste
P	Fosfoproteína
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

PDV	Moquillo de las focas
PMV	Morbillivirus de la marsopa
PRNT	Test de neutralización en placa
PWMV	Morbillivirus del calderón
RPV	Peste bovina
RRPV	Peste de los pequeños rumiantes
rt RT_PCR	PCR a tiempo real
SNC	Sistema nervioso central
TP	Proteína terminal
UPL	Librería de sondas universal
VN	Neutralización viral

INDICE DE TABLAS

- **Tabla 1:** Enfermedades emergentes y reemergentes conocidas en cetáceos hasta el momento
- **Tabla 2:** Resumen para poder diferenciar las tres cepas hasta el momento conocidas de CeMV
- **Tabla 3:** Proteínas virales de Adenovirus. Localización y función de cada una.

ÍNDICE DE FIGURAS

- **Figura 1:** Estructura de CeMV.
- **Figure 2:** Clasificación filogenética molecular del género Morbillivirus
- **Figura 3:** Signos clínico típicos de CeMV.
- **Figura 4:** Lesiones macroscópicas típicas de infección de CeMV.
- **Figura 5:** Inmunohistoquímica en cerebro de animal infectado con CeMV.
- **Figura 6:** Mapa del Mar del Norte, CE y NE Atlántico
- **Figura 7:** Mapa del Mar Mediterráneo.
- **Figura 8:** Mapa del Mar Negro.
- **Figura 9:** Mapa de la costa atlántica americana.
- **Figura 10:** Mapa del Golfo de Méjico.
- **Figura 11:** Mapa del Norte del Pacífico
- **Figura 12:** Mapa de Sudamérica.
- **Figura 13:** Mapa de Australasia.
- **Figura 14:** Estructura de Adenoviridae.
- **Figura 15:** Esquema del genoma de adenovirus.
- **Figura 16:** Esquema de la entrada de adenovirus a la célula y su posterior entrada al núcleo
- **Figura 17:** Análisis filogenético de las secuencias parciales del gen del hexón
- **Figura 18:** Árbol filogenético por el método maximum likelihood que representa la relación de CSLAdV-1 con representantes de cada uno de los géneros (excepto Ichtadenovirus) de la familia Adenoviridae

RESUMEN



ABSTRACT

RESUMEN

Las enfermedades infecciosas en cetáceos tienen mucha repercusión en estos animales por las consecuencias que acarrear su presencia. Hasta el momento, sólo se conocen unas pocas, de las cuales las enfermedades víricas ocupan un pequeño porcentaje. Estas enfermedades se pueden dividir en enfermedades emergentes y reemergentes, aunque muchas de ellas han sido recientemente descubiertas. **Morbillivirus de los cetáceos** (CeMV) es la enfermedad vírica reemergente más letal conocida hasta el momento en cetáceos. Es un virus ARN que afecta fundamentalmente a los sistemas respiratorio, linfático y nervioso de estos animales produciéndoles la muerte. Han sido descritos varios brotes en todo el mundo, dos de ellos localizados en la costa mediterránea española, convirtiéndose en una zona de alto riesgo. Por otro lado, **adenovirus**, es un virus descrito anteriormente en leones marinos, y que está asociado a hepatitis letales en estos animales. Sin embargo, en cetáceos sólo existen un par de trabajos sobre la asociación de este virus a hisopos y biopsias gastrointestinales pero no se había asociado a ninguna patología hasta ahora.

Esta tesis doctoral con el título “**Detección, prevalencia y epidemiología molecular de virus en cetáceos del Mediterráneo**” se ha centrado en estos importantes virus de los cetáceos para intentar aportar mejoras en su conocimiento y control. El trabajo desarrollado en la presente tesis, ha generado cuatro artículos científicos publicados en revistas de impacto internacional. Estos artículos abarcan desde el diseño de una PCR a tiempo real, la validación de la misma en casos reales durante un brote de CeMV, en el que se utilizó la técnica para su diagnóstico y su posterior seguimiento epidemiológico; hasta la identificación de un nuevo virus, adenovirus, desconocido hasta ahora en cetáceos, su aislamiento y confirmación mediante distintas técnicas.

El primer objetivo de esta tesis doctoral fue estudiar CeMV en el Mediterráneo español, más concretamente en las costas de la Comunidad Valenciana. Ya que la zona de estudio era una zona de alto riesgo para este virus, se decidió realizar un diagnóstico continuo de CeMV en todos los animales varados. Este objetivo se subdivide en tres subobjetivos. El primero fue **la mejora de las técnicas de diagnóstico molecular de CeMV**. Ante la falta de una técnica sensible, específica, asequible, rápida y que detectara las tres cepas de CeMV, se diseñó una PCR a tiempo real en la que se detectan las tres cepas de CeMV en solo una hora, y con una alta sensibilidad y especificidad. Se

realizó análisis de sensibilidad en el que se comprobó que detectaba hasta 2, 30 y 5 copias de DMV, PMV y PWMV respectivamente y que tenía al menos 1000 veces más sensibilidad que las técnicas convencionales utilizadas hasta el momento por otros grupos de investigación. El análisis de especificidad con otros virus de la familia *Paramyxoviridae* comprobó que sólo detectaba DMV y PMV o PWMV. Por último, se realizó las curvas estándar para las tres cepas de CeMV para poder cuantificarlas.

El **segundo subobjetivo fue la actuación ante un brote de CeMV**. Durante la primavera del 2011, se observó un incremento notable del número de varamientos en esta zona, teniendo en cuenta la media de varamientos mensual y anual. Dada la localización de estos varamientos (zona de riesgo de CeMV) y las lesiones observadas en los animales varados (típicas de una infección por CeMV) se pensó en un posible brote de CeMV. Se realizó el diagnóstico molecular de CeMV mediante las técnicas convencionales y la nueva técnica descrita en el subobjetivo 1 (UPL RT-PCR) dando positivos 8 de los 13 animales necropsiados (62%) y 8 de los 11 delfines listados (73%) en más de un tejido mediante la UPL RT-PCR y sugiriendo una infección sistémica de la enfermedad y adicionalmente pudiendo validar la nueva técnica en casos sospechosos. También se realizó el diagnóstico molecular mediante la PCR convencional, sin embargo, debido a la baja carga viral en los animales positivos sólo se detectó DMV en un animal en la muestra de cerebro. Por otro lado, se realizó el estudio epidemiológico del brote poniendo especial atención en la prevalencia del virus en las distintas poblaciones de cetáceos, en cada uno de los sexos, en las edades y localización de los varamientos. Se pudo observar que en este brote los animales eran muy jóvenes, las lesiones muy leves y la carga viral muy baja. Teniendo en cuenta los brotes anteriores, en el de 1990, los animales eran de todas las edades, afectaron a unos 1000 delfines listados, las lesiones fueron muy severas y la carga viral fue muy alta. Sin embargo, en 2007, los animales fueron subadultos, vararon alrededor de 100, las lesiones menos severas y las cargas virales mucho más bajas. Con toda esta información parece que los animales van creando inmunidad en cada uno de los brotes y esa fue la razón por la que en el brote de 2011 fue tan leve la infección y sobretodo afectó a animales muy jóvenes. Por último, el análisis filogenético de la secuencia obtenida en los animales positivos nos permitió comparar esta misma con las secuencias de brotes anteriores, así como intentar sacar conclusiones sobre el posible origen del brote. La secuencia obtenida era prácticamente idéntica a la del 2007, sugiriendo que el brote podría provenir del mismo mar Mediterráneo.

El **tercer y último subobjetivo fue el seguimiento epidemiológico de CeMV en los animales varados en las costas valencianas tras el brote del 2011 hasta diciembre del 2014**.

Habiéndose estandarizado y validado la UPL RT-PCR durante el brote, fue esta técnica la utilizada para realizar el diagnóstico de los animales necropsiados en este periodo. De los 177 delfines varados sólo tres animales resultaron positivos a DMV habiendo más de un año de diferencia entre la fecha de varamiento de cada uno de ellos. En dos de ellos se pudo encontrar una infección sistémica por morbillivirus del delfín (DMV) muy severa, con alta carga viral en todos los tejidos analizados pudiéndose detectar el virus mediante técnicas moleculares convencionales y UPL RT-PCR, inmunohistoquímica y microscopía electrónica y en el restante sólo se encontró el antígeno restringido al SNC pero la carga viral era altísima. Sin embargo el análisis filogenético de las secuencias obtenidas demostraba que eran diferentes entre ellas. La del primer animal era casi idéntica a la secuencia encontrada en el brote del 2011, pero la encontrada en el segundo y tercer animal eran idénticas entre sí y distinta a la del primer animal siendo más cercana filogenéticamente hablando a la secuencia de 1990 que a la del 2011 y 2007. Estos casos son los primeros reportes de infección sistémica en periodos interepizoóticos en el Mediterráneo.

El **segundo objetivo** de esta tesis doctoral fue **la detección de nuevos virus en cetáceos**, siendo **adenovirus** el virus identificado en este objetivo. Ante el desconocimiento de virus en cetáceos, y que además solo unos pocos están bien caracterizados, se intentó identificar virus desconocidos hasta el momento, con una sintomatología sospechosa de enfermedad vírica. Durante octubre del 2013, cuatro delfines mulares pertenecientes al Oceanogràfic de Valencia presentaron gastroenteritis con síntomas virales (diarrea, anorexia y vómitos) que hicieron sospechar de un nuevo virus. Se descartó que esta gastroenteritis estuviera causada por bacterias, debido a que no se encontró ningún hallazgo significativo en heces. También se descartaron otros agentes que podrían haber sido los causantes como calicivirus, rotavirus, parvovirus, *Cryptosporidium*. Sin embargo al encontrarse en el suero anticuerpos frente adenovirus canino (CAV-1) en los animales con síntomas se desarrollaron dos PCR convencionales genéricas para la detección de nuevos adenovirus amplificando los genes de la proteína de la polimerasa y del hexón. Adenovirus fue identificado mediante métodos moleculares convencionales en las heces de los animales con síntomas y fue confirmado mediante secuenciación. Los animales sin sintomatología no presentaron ni anticuerpos frente a CAV-1 ni se detectó adenovirus por métodos convencionales. Las secuencias parciales obtenidas de los genes de la polimerasa y del hexón sugirieron que podría tratarse de una nueva especie de adenovirus. Por último, se realizó un estudio de la enfermedad, realizando una cuantificación relativa en heces de los 4 animales a lo largo de la enfermedad pudiendo observar que

los animales seguían eliminando el virus al menos 5 días tras la desaparición de los síntomas. Para poder confirmar su presencia, se intentó aislar este adenovirus en cultivo celular. Ya que no existe ninguna línea celular del delfín, y que adenovirus es especie específico, se buscaron alternativas encontrando un trabajo en el que se describía el aislamiento de CAV-1 en células HeLa. 5 días tras la infección de estas células con el adenovirus del delfín, el sobrenadante pasó a ser positivo a adenovirus y la secuencia de la misma era idéntica a la obtenida en heces. Aun así se realizó microscopía electrónica en el cultivo celular fijado con metanol, y se encontraron unas partículas extrañas en el núcleo de la célula con el tamaño de adenovirus. Sin embargo, la morfología (espículas en la cápside) no se veía claro. Por ello, se realizó una inmunohistoquímica utilizando como anticuerpo primario un anticuerpo monoclonal de CAV-1, y como secundario Alexa 488-conjugated goat anti-mouse. Con esta técnica se pudo confirmar que las células estaban infectadas con adenovirus, ya que sólo en las muestras infectadas se observó fluorescencia en el núcleo y algo en el citoplasma, cosa que no pasó en el negativo. Este ha sido la primera descripción de adenovirus en cetáceos y su asociación a gastroenteritis autolimitante

Finalmente, hay que destacar que esta **tesis doctoral** aporta una información **muy relevante** en el campo de los **cetáceos**, ya que mejora las técnicas de diagnóstico de CeMV, describe un nuevo brote de CeMV y ha ampliado el número de enfermedades víricas que se conocían hasta el momento en estos animales.

ABSTRACT

Infectious diseases are very important in cetaceans because the consequences of their presence in these animals. Within these diseases, only a few are characterized at that moment, in special the viral diseases. However, these diseases could be classified in emerging and reemerging diseases, although many of them have been discovered recently. In one hand, **cetacean morbillivirus** (CeMV) is the most lethal viral disease in cetacean population along the history. It is RNA virus that mainly affects to respiratory, lymphatic and nervous systems and kills the animals. Different outbreaks have been described worldwide, although two of them have been located on Spanish Mediterranean Sea, becoming a high risk location. On the other hand, **adenovirus** had been the cause of two outbreaks of lethal hepatitis in sea lions. However, in cetaceans, only a few reports of presence of adenovirus in swabs and biopsies samples from gastrointestinal tract have been described, but any association between the virus and pathology has been published.

This Ph.D titled **“Detection, prevalence, and molecular epidemiology of viruses in cetaceans from Mediterranean Sea”** has focused in these important viruses for cetaceans to improve their knowledge and control. This work that has been presented in this Ph.D. has generated four scientific articles that have been published in international impact journals. These papers encompass from real time PCR design, validation of this technique in real cases during the 2011 CeMV outbreak where it was used for rapid diagnosis and the following epidemiological tracing after the outbreak; to the identification of a novel virus, adenovirus that was unknown in cetaceans at that moment and was isolated and confirmed by different techniques.

The first objective in this Ph.D was CeMV study on Spanish Mediterranean Sea, in particular on Valencian Community Coasts. Because the studied zone was a high risk location for this virus, a continuous study of CeMV was performed in all stranded cetaceans. This objective is divided in three subobjectives. **The first one** was the improvement of molecular diagnosis techniques for CeMV. There was no method rapid, affordable, sensitive and specific method that was able to detect the three strains of CeMV. Therefore a real time PCR was designed to detect the three CeMV strains in only 45 minutes and with high sensitivity and specificity. A sensibility analysis was carried out and was showed this PCR detects to 2, 30 and 5 copies of DMV, PMV and PWMV respectively and it had 1000 times more sensibility than conventional techniques that were used for other research groups. Only DMV/PMV or PWMV was detected by this UPL-PCR and was confirmed by

specificity analysis with other viruses from family *Paramyxoviridae*. Finally, standard curves for the three strains were performed to quantify them.

The second subobjective was the performance during a CeMV outbreak. During spring 2011, many cetaceans were stranded on Spanish Mediterranean Coast (more than usual). Because the location of these strandings (high risk location) and the observed lesions in stranded animals (typical lesions of CeMV infection) suggested the possibility of new CeMV outbreak. Molecular diagnosis was performed by conventional methods and by the new technique that has been described in subobjective 1 (UPL RT-PCR). Eight of 13 necropsied animals (62%) and eight of 11 striped dolphins (73%) were positive to CeMV by UPL RT-PCR in more than one tissue suggesting a systemic infection of the disease and additionally the new technique could be validated in suspected cases. Additionally, molecular diagnosis by conventional PCR was performed. Because the low viral charge, conventional PCR could only detect one positive sample (brain) from one animal. The epidemiological study of the outbreak was performed and was observed the prevalence of the virus in different cetacean population, or sex, age or location. In this outbreak the animals were young, the lesions were really poor and the viral charge was really low. However, comparing with the previous outbreaks, in 1990, around 100 animals were stranded, they were all ages, the lesions were severe and the viral charge was high. In 2007, around 100 animals stranded, they were subadults, the lesions were less severe and the viral charge was lower. Therefore these results suggest the animals could have immunity from previous outbreaks, and this is why the viral charge was so low and the dolphins were so young. Phylogenetic analysis was also carried out with the obtained sequences and was compared with the previous outbreaks sequences to get a hypothesis about the origin of this outbreak. The obtained sequence was almost identical to 2007 sequence, suggesting it could come from Mediterranean Sea.

The last subobjective was the epidemiological tracing of CeMV, in all cetaceans that stranded on Valencian Community Coasts after 2011 outbreak until December 2014. Because the UPL RT-PCR had been validated and standardized during 2011 outbreak, this method was used for CeMV diagnosis in necropsied animals in this period. Only three dolphins were positive to DMV and one year was the difference between their stranding dates. A severe systemic infection of dolphin morbillivirus (DMV) was found with a high viral title finding the virus by conventional and real time PCRs in all analyzed samples, by immunohistochemistry and electron microscopy. However obtained sequences from the three animals were different between them by phylogenetic

analysis. On one hand, the first animal sequence was almost identical to DMV 2011 outbreak sequence. On the other hand, the second and third sequences were identical between them and different to first animal sequence. In addition, this sequence was phylogenetically closer to 1990 outbreak sequence than to 2007 or 2011 sequences. This is the first report of a DMV systemic infection in an interepizootic period.

The second objective of this Ph.D was the detection of unknown viruses in cetaceans, being adenovirus the identified virus in this objective. Because the ignorance of the majority of viruses in cetaceans, we tried to identify any virus when the animal present any symptom suspected of viral infection. During October 2013, four bottlenose dolphins from Oceanografic of Valencia started with gastroenteritis with viral symptoms (diarrhea, vomiting and anorexia) suggesting a new virus could be implicated. Bacterial infection was discarded because any significant bacterium was found in fecal samples. Additionally, other agents were discarded as calicivirus, rotavirus, parvovirus or *Cryptosporidium*. However, the presence of antibodies against canine adenovirus (CAV-1) in serum samples from symptomatic animals made us to develop two conventional PCRs to detect novel adenoviruses. These two PCRs amplified the genes of polymerase and hexon proteins. Adenovirus was identified by molecular diagnosis from fecal samples from symptomatic animals and was confirmed by sequencing. No antibodies against CAV-1, and no adenovirus were found in samples from asymptomatic animals. The obtained sequences from polymerase and hexon protein of this virus suggest a new species of adenovirus. Finally, the study of the disease was performed, with a relative quantification in fecal samples along the disease. The conclusion was the animals still eliminate the virus 5 days after the symptoms disappear. To confirm the adenovirus presence, the virus was isolated in cell culture. Because no dolphin cell line exists and adenovirus is specie specific, alternatives were looked for and a report was found where CAV-1 could infect HeLa. Therefore the HeLa cells culture were infected with this adenovirus and 5 days after infection, the supernatant became positive and the obtained sequence was identical to obtained sequence in fecal samples. Electron microscopy was performed to confirm the adenovirus presence. Strange particles with similar size to adenovirus were found in the nucleus of the cell. However the morphology was not the identical to adenovirus morphology (capsid spikes). Finally immunohistochemistry was performed with monoclonal CAV-1 antibody as primary antibody and Alexa 488-conjugated goat anti-mouse as secondary antibody. The infected cells showed fluorescence in the nucleus and cytoplasm. But in negative samples no fluorescence was showed.

RESUMEN/ABSTRACT

This has been the first description of adenovirus in cetaceans and the association of this virus with self-limiting gastroenteritis.

Finally, this **Ph.D** contributes with relevant information to **cetacean field** because it improves the diagnosis techniques for CeMV, describes a new CeMV outbreak and has incorporated a new virus to the known viral list at that moment.

CAPÍTULO I



INTRODUCCIÓN

1. GENERALIDADES DE LOS CETÁCEOS

Actualmente existen **tres órdenes** distintos en los mamíferos marinos: *Cetacea* (ballenas, marsopas y delfines), *Carnivora* (osos polares, nutrias, focas, leones marinos y morsas), y *Sirenia* (manatíes y dugongs). Gracias a las técnicas moleculares, varios estudios han propuesto insertar a los cetáceos dentro del **orden Artiodactyla** (ungulados de pezuña plana). Hasta el momento 78 especies de cetáceos vivos forman dos subórdenes, **el de los Mysticeti** (ballenas barbadas) y **el de los Odontoceti** (ballenas dentadas) (Reidarson, 2003).

Misticetos y Odontocetos comparten muchas características pero pueden diferenciarse gracias a que los **misticetos poseen barbas** (aparato filtrador) compuestas por queratina, dos espiráculos externos, mandíbula no sinfiseal y “dimorfismo sexual inverso” (hembras adultas más grandes). En cuanto a la perspectiva anatómica, los cetáceos tienen una serie de modificaciones que son de mayor grado que las de cualquier otro mamífero. Para adaptarse al medio acuático, poseen diferencias morfológicas obvias y fisiológicas algo más sutiles. Pueden moverse libremente en el agua, regular el intercambio de calor y visualizar la presa en un medio oscuro.

En los últimos años el mundo de los mamíferos marinos ha generado un gran interés, tanto científico como sanitario, así como una gran sensibilidad por parte de la población general. Posiblemente, la motivación de las nuevas generaciones por cuidar el medio ambiente y el mantenimiento de los ecosistemas, ha hecho que se preste una especial atención en **mantener y proteger** las diferentes especies tanto terrestres como marinas. De hecho, la protección y conservación de los ecosistemas marinos es actualmente una prioridad mundial, por lo que es esencial mejorar nuestro conocimiento acerca de los mecanismos básicos que influyen en los mismos y su estado sanitario. Se dice que los mamíferos marinos son los mejores embajadores que existen para el medio marino debido a su popularidad en la población en general. Es por ello que en los últimos años se ha hablado de los mamíferos marinos como centinelas del mar. Por ejemplo, un aumento del número de varamientos de cetáceos, ya sean vivos o muertos, pueden crear inquietud sobre la salud de nuestros mares y océanos (Geraci and Lounsbury, 1993). Así que la necesidad de un seguimiento toxicológico e infeccioso de estos animales se ha puesto de manifiesto en las últimas décadas ya que son el espejo de lo que puede estar ocurriendo en el ambiente marino.

2. ENFERMEDADES EMERGENTES Y REEMERGENTES

Las enfermedades emergentes y re-emergentes afectan tanto a los animales como a las plantas de todo el mundo. Cada vez que aparecen nuevas enfermedades zoonóticas suelen producir una preocupación en la sociedad por el impacto que puedan tener en la salud pública. Sin embargo, también existen otras enfermedades que a pesar de no ser zoonóticas, puede causar una gran morbilidad o mortalidad y por ello también son preocupantes por su importancia en la conservación de estos animales (Miller et al., 2000). Algunas de estas enfermedades pueden ser devastadoras en animales que estén en peligro de extinción, donde los niveles de población son excesivamente bajos (Harwood and Hall, 1990).

De hecho, las enfermedades emergentes se definen como aquellas enfermedades que no habían sido descritas previamente, o que están consideradas como una nueva amenaza para las especies afectadas (Wilson, 1999). En cambio las enfermedades re-emergentes son aquellas que históricamente se consideraban como erradicadas o que ya no suponían un problema importante. Desafortunadamente, es muy difícil definir correctamente una enfermedad como emergente o re-emergente en la fauna silvestre. Por ello, en estos animales en los que se incluyen los cetáceos es más apropiado hablar de enfermedades presuntamente emergentes o reemergentes, debido a la falta de datos históricos o valores de referencia que nos permitieran sacar conclusiones de si es un tipo u otro (Miller et al., 2000).

Se han descrito dos vías distintas a través de las cuales la fauna silvestre está expuesta a las enfermedades emergentes (Daszak et al., 2000). La primera de ellas dice que las enfermedades emergen en las especies de la fauna silvestre como resultado de la relación con las especies domésticas. Esta ruta se ha vuelto cada vez más común, ya que las especies domésticas invaden el hábitat de las especies salvajes y cada vez hay más contacto entre ellas. La introducción del virus del moquillo canino (CDV) en las focas es un ejemplo claro de esta ruta. Inicialmente, la etiología en los brotes de morbillivirus en focas ocurridas en los años 80 se caracterizó serológicamente como moquillo de las focas (PDV)1 y PDV-2 (Ross et al., 1992). Estas dos cepas eran antigénicamente distintas a CDV y cualquier otra (Visser et al., 1990). Sin embargo, posteriormente al realizar el análisis molecular de los aislados de tejidos de nerpa Baikal (*Phocasibirica*) reveló la cepa salvaje CDV (Visser et al., 1993). La transmisión de esta nueva cepa parece ser que podría haberse dado vía aerosoles de los perros domésticos o salvajes (Lyons et al., 1993). Además se ha demostrado que

especies terrestres adyacentes y susceptibles a esta enfermedad, como son los mapaches y los zorros, también juegan un papel importante en la transmisión por aerosoles de CDV.

La segunda ruta se produce como una desafortunada consecuencia de la reintroducción de especies con fines de conservación (Daszak et al., 2000). Esta práctica ha permitido el desplazamiento de estos hospedadores y de organismos patógenos, facilitando la exposición de animales previamente “naive” a nuevas enfermedades. En mamíferos marinos esta ruta es extremadamente rara aunque existe algún caso como la difusión de leptospirosis en foca común (*Phocavitulina*) durante la recuperación de estos animales. Probablemente fue debido a la exposición de estas focas a animales terrestres como las mofetas (Stamper et al., 1998).

Por último, un fenómeno natural como son los meteorológicos pueden tener efectos severos en las especies y pueden ayudar a la proliferación y/o transporte de organismos patogénicos (Fauquier et al., 1998; Hoegh-Guldberg, 1999). Esta tercera ruta es especialmente relevante para la fauna marina, y podría ser la mayor causa de reemergencia de las enfermedades (Harvell et al., 1999).

Por ello, ya sean enfermedades emergentes o reemergentes, estas enfermedades merecen especial atención por los efectos devastadores y por su etiología compleja. Las epizootias normalmente implican distintas entidades de la enfermedad, con una etiología primaria muy difícil o imposible de determinar. Por ejemplo, en las infecciones por morbillivirus, que no hay ningún brote descrito ni en pinnípedos ni en cetáceos antes de 1988, ha resultado en más de 7 epizootias en mamíferos marinos, y ha estado implicado en mortalidades masivas en poblaciones de foca monje (*Monachusmonachus*) (Kennedy, 1998; Osterhaus et al., 1997). Sin embargo algunos estudios atribuyeron a un bloom de algas nocivas de *Alexandrium*spp. la principal causa de este evento de mortalidad masiva (Hernández et al., 1998), resultando en un debate posterior en la sociedad científica (Harwood, 1998). Es por todo esto que se ha visto la necesidad del trabajo conjunto con equipos multidisciplinarios.

Gracias a todas estas circunstancias, la última tecnología en laboratorio se ha puesto en marcha para identificar estos procesos y la etiología del mismo. La reacción de la cadena de la polimerasa (PCR), microscopía electrónica, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia e incluso metagenómica son algunas de las técnicas que se aplican actualmente en mamíferos marinos para su diagnóstico. La combinación de todas estas técnicas con el seguimiento de las poblaciones marinas

ha sido la clave para la comprensión de algunas enfermedades en la fauna salvaje. Gracias a estas herramientas muchas enfermedades han podido ser clasificadas como emergentes o reemergentes.

En los cetáceos, que es el tema que nos atañe, las enfermedades virales, bacterianas y neoplásicas son las más importantes dentro de las enfermedades emergentes y reemergentes (Tabla 1). Algunos papilomas y/o fibropapilomas benignos se han caracterizado microscópicamente y macroscópicamente tanto en mucosa como en piel de distintas especies de cetáceos. Papilomavirus se ha relacionado a lesiones encontradas en orcas (*Orcinus orca*), cachalote (*Physeter macrocephalus*), belugas (*Delphinapterus leucas*), en marsopa común y de Burmeister (*Phocoena spinipinnis*), en el delfín oscuro y en delfines mulares (Bossart et al., 2001; De Guise et al., 1994; Lamberts et al., 1987; Van Bresse et al., 1996; Van Bresse et al., 1999). Además, el ADN de papilomavirus se ha conseguido amplificar con técnicas moleculares en verrugas encontradas en la hendidura genital de marsopas negras, delfines oscuros, y de delfines mulares recuperados en la costa peruana (Cassonnet et al., 1999).

Por otro lado algunas enfermedades bacterianas también han generado problemas a los cetáceos. Entre ellas se encuentra la brucelosis. Aparentemente es una enfermedad infecciosa nueva en estos animales, y su aparición conlleva implicaciones tanto por su carácter zoonótico y como por las pérdidas económicas que conlleva. Las primeras detecciones de brucelosis que se han descrito se dieron en marsopas, en delfines (Foster et al., 1996) y en un delfín mular abortado (Miller et al., 1999). Sin embargo, en un estudio retrospectivo en sueros de pinnípedos y cetáceos varados en las costas de Inglaterra y Gales entre 1989 y 1995 revelaron que la primera muestra positiva se dio antes de 1990 (Jepson et al., 1997). Recientemente, se aisló una nueva especie de *Helicobacter* de la mucosa gástrica de delfines del Atlántico (*Lagenorhynchus acutus*) y se identificó usando PCR (Fox et al., 2000). Además se demostró la asociación de la presencia de las espiroquetas del *Helicobacter* con la gastritis linfoplasmocítica proliferativa. Por ello se llegó a la conclusión de que *Helicobacter* podría tener un rol importante en la patogénesis en la gastritis y ulceración en delfines. Por último, *Erysipelothrix rhusiopathiae* es el agente etiológico de la enfermedad de erisipela. Existen tres formas de la enfermedad en humanos pero en cetáceos sólo se ha descrito la dermatológica y la sistémica aguda. Esta enfermedad se ha descrito en distintas especies de cetáceos que incluyen: *Tursiops truncatus*, *Stenella plagiodon*, *Globicephala melas*, *Tursiops aduncus*, *Lagenorhynchus albirostris*, *Lagenorhynchus obliquidens*, *D. leucas*, *Grampus griseus*, *O. orca* y *Phocoena phocoena* (Boseret et al., 2002; Buck and Spotte, 1986;

Chastel et al., 1975; Kinsel et al., 1997; Melero et al., 2011; Seibold and Neal, 1956; Thurman et al., 1983; Young et al., 1997). En cetáceos, que son la especie de mamíferos marinos más susceptible a esta enfermedad, las lesiones aparecen como marcas romboidales de tonalidad grisácea con los lados marcados por todo el cuerpo. Tradicionalmente se ha asociado esta enfermedad a los cetáceos en cautividad por la ingesta de pescado contaminado por la mala preservación del mismo. Sin embargo, también existen reportes de esta enfermedad en cetáceos salvajes(Chastel et al., 1975), uno de ellos procedente del Mediterráneo(Melero et al., 2011).

<i>Enfermedad/Organismo</i>	<i>Especie</i>	<i>Referencia</i>
Papilomavirus	<i>Orcinus orca</i> (Orca)	Bossart et al., 1997; 2001[29]
	<i>Tursiops truncatus</i> (Delfin mular del Atlántico)	Cassonnet et al., 1999
	<i>Phocoena phocoena</i> (Marsopacomún)	Van Bressemer et al., 1999
	<i>Lagenorhynchus obscurus</i> (Delfinoscuro)	
	<i>Phocoenaspiniipinnis</i> (Marsopanegra)	
	<i>Tursiops truncatus</i> (Delfin mular del Atlántico)	
Morbillivirus de la marsopa	<i>Tursiops truncatus</i> (Delfin mular del Atlántico)	Barrett et al., 1993[30]
	<i>Phocoenaphocoena</i> (Marsopacomún)	Taubenberger et al., 1996[31]
Morbillivirus del delfín	<i>Tursiops truncatus</i> (Delfin mular del Atlántico)	Domingo et al., 1990[32]
	<i>Stenellacoeruleoalba</i> (Delfinlistado)	Lipscomb et al., 1994[33]
	<i>Delphinusdelphis</i> (Delfin común del Pacífico)	Taubenberger et al., 1996
	<i>Delphinusdelphisponcticus</i> (Delfin común del Mar negro)	Reidarson et al., 1998; [34] Birkun et al., 1999[35]
Morbillivirus del calderón	<i>Globicephalamelaena/melas</i> (Calderón común)	Taubenberger et al., 2000[36]
Morbillivirus desconocido	<i>Balaenoptera physalus</i> (Rorcualcomún)	Jauniaux et al., 1998[37]
Arbovirus (Togavirus) encefalitis	<i>Orcinus orca</i> (Orca)	
Hepatitis hepadnaviral	<i>Lagenorhynchusobliquidens</i> (Delfin del Pacífico de lados blancos)	Bossart et al., 1990; [38] Bossart, unpublished data
	<i>Tursiops truncatus</i> (Delfin mular del Atlántico)	
	<i>Tursiops truncatus</i> (Delfin mular del Atlántico)	Foster et al., 1996[25]
	<i>Lagenorhynchusacutus</i> (Delfin de flancos blancos del	Clavareau et al., 1998[39]

<i>Brucella</i>spp.	Atlántico)	
	<i>Stenella coeruleoalba</i> (Delfín listado)	
	<i>Delphinus delphis</i> (Delfín común)	
	<i>Phocoenaphocoena</i> (Marsopacomún)	
	<i>Orcinus orca</i> (Orca)	
	<i>Globicephala</i> spp. (Calderón)	
	<i>Balaenoptera acutorostrata</i> (Rorcual blanco)	Miller et al., 1999[26]
	<i>Balaenoptera physalus</i> (Rorcual común)	
	<i>Balaenoptera borealis</i> (Rorcual norteño)	
<i>Helicobacter</i>spp.	<i>Lagenorhynchus acutus</i> (Delfín de flancos blancos del Atlántico)	Fox et al., 2000[28]
Lobomycosis	<i>Tursiops truncatus</i> (Delfín mular del Atlántico)	Haubold et al., 1998[40]
Histoplasmosis	<i>Tursiops truncatus</i> (Delfín mular del Atlántico)	Jensen et al., 1998[41]
Coccidioidomycosis	<i>Tursiops truncatus</i> (Delfín mular del Pacífico)	Reidarson et al., 1998[42]
Linfoma inmunoblástico maligno	<i>Tursiops truncatus</i> (Delfín mular del Atlántico)	Bossart et al., 1997[29]
	<i>Stenella frontalis</i> (Delfín pintado)	
	<i>Stenella attenuata</i> (Delfín manchado tropical)	
Carcinoma oral de células escamosas	<i>Tursiops truncatus</i> (Delfín mular del Atlántico)	Renner et al., 1999[43]
Adenoma renal	<i>Tursiops truncatus</i> (Delfín mular del Atlántico)	Cowan and Turnbull, 1999[44]
Carcinoma pulmonar	<i>Tursiops truncatus</i> (Delfín mular del Atlántico)	Ewing and Mignucci-Giannoni, 2003[45]
Angiomatosis	<i>Tursiops truncatus</i> (Delfín mular del Atlántico)	Turnbull and Cowan, 1999[46]
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	<i>Tursiops truncatus</i> (Delfín mular del Atlántico)	Melero et al. 2011
	<i>Stenella plagiodon</i> (Delfín pintado)	
	<i>Globicephalamelas</i> (Calderón común)	Chastel et al. 1975
	<i>Tursiops aduncus</i> (Delfín del Indo-Pacífico)	Thurman et al. 1983
	<i>Lagenorhynchus albirostris</i> (Delfín del hocico blanco)	Buck et al. 1986
	<i>Lagenorhynchus obliquidens</i> (Delfín del Pacífico de flancos blancos)	Kinsel et al. 1997

<i>Delphinapterus leucas</i> (Beluga)	
<i>Grampus griseus</i> (Calderón gris)	
<i>Orcinus orca</i> (Orca)	Young et al. 1997
<i>Phocoena phocoena</i> (Marsopa común)	Seibold et al. 1956

Tabla 1: Enfermedades emergentes y reemergentes conocidas en cetáceos hasta el momento. Fuente: Miller et al. 2000

Sin embargo, las enfermedades virales son las que han tenido mayores efectos dramáticos en la población mundial de cetáceos. Por ejemplo, en las últimas décadas, morbillivirus ha surgido como uno de los patógenos más significativos tanto en pinnípedos como en cetáceos. El origen de esta enfermedad no se ha determinado y su patogénesis y epidemiología se está estudiando actualmente por varios grupos de investigación. Es por ello que en el resto del capítulo se contarán los aspectos más relevantes de estas enfermedades emergentes y/o re-emergente en las que se centra esta tesis doctoral.

3. MORBILLIVIRUS DE LOS CETÁCEOS

3.1. Características de la enfermedad

3.1.1. Etiología

Los **morbilivirus de los cetáceos (CeMV)** son virus ARN de cadena simple, lineal, no segmentada, y en sentido negativo, y tiene un tamaño de aproximadamente 18kb. Son virus con envoltura. Pertenecientes a la familia *Paramyxoviridae*. Poseen un virión esférico de aproximadamente 250 nm de diámetro y una nucleocápside helicoidal de 18 nm. El mayor porcentaje de su composición está ocupado por proteínas (73%), aunque también presenta ARN (1%), carbohidratos (6%) y lípidos (20%). Su genoma codifica por 8 proteínas: 2 no estructurales y 6 estructurales (Figura 1). En su envoltura contiene a la glicoproteína viral, la hemaglutinina (H), que a veces posee una actividad neuraminidasa, y a la glicoproteína de fusión (F). Son antigénicamente estables, poseen partículas lábiles, pero que son muy infectantes. Por otro lado está la nucleoproteína (N), que forma la nucleocápside helicoidal y forma un complejo con el ARN viral, representando la principal proteína interna; además de ella se unen al complejo dos proteínas grandes designadas como fosfoproteína (P) y ARN dependiente de la polimerasa (L), y que probablemente realicen la actividad polimerasa viral (Figura 1). En la formación de la envuelta viral participan tres proteínas importantes: la proteína de la matriz (M) y las glucoproteínas de la superficie viral.

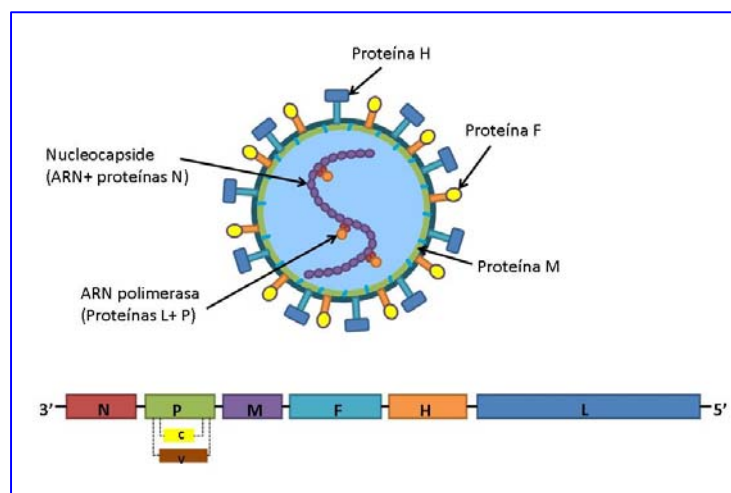


Figura 1: Estructura de CeMV. Se muestran las proteínas que conforman la estructura. Hemaglutinina (H), proteína de fusión (F), proteína de la matriz (M), proteína grande (L), fosfoproteína (P) y nucleoproteína (N). En la parte de debajo de figura se muestra el orden de codificación de cada una de las proteínas y su tamaño relativo respecto al tamaño total del genoma. C y V son dos factores de virulencia (Fuente: Elaboración propia)

3.1.2. Caracterización del virus

Hasta 1988 solo se conocían 4 especies del género *Morbillivirus*: virus del sarampión (MeV), virus de la peste bovina (RPV), virus de la peste de los pequeños rumiantes (RRPV) y virus del moquillo canino (CDV). Sin embargo en 1988 se describió por primera vez un morbillivirus en mamíferos marinos, a éste se le llamó virus del moquillo de las focas (PDV) por su similitud con CDV. Sin embargo en 1994, Bolt y col. (1994) introdujo una nueva especie de morbillivirus, CeMV, actualmente reconocida por la Comisión Internacional en Taxonomía de los virus (ICTV, 2002). Por otro lado CeMV se divide en 3 subgrupo de virus: morbillivirus del delfín (DMV) (Barrett et al., 1993; Domingo et al., 1990), morbillivirus de la marsopa (PMV) (Kennedy et al., 1988; McCullough et al., 1991) y morbillivirus del calderón (PWMV) (Taubenberger et al., 2000). Sin embargo sólo CeMV está reconocido como una especie de morbillivirus (ICTV, 2002), así que DMV, PMV y PWMV son nombres no oficiales.

El primer CeMV que se describió fue PMV en 1988, encontrado en una marsopa común (*P. phocoena*) (Kennedy et al., 1988), éste apareció antes incluso que el término de CeMV apareciera. DMV se identificó por primera vez en 1990 en un delfín listado (*Stenellacoreuleoalba*), que había varado en el mar Mediterráneo español (Domingo et al., 1990). PWMV fue la cepa que se ha descrito más recientemente de todo el grupo de los CeMV. Estas secuencias de morbillivirus se encontraron en 2 *G. melas* y se vio que aunque eran diferentes, estaban genéticamente relacionadas con las secuencias ya existentes de CeMV (Taubenberger et al., 2000). Sin embargo, recientemente, se han identificado 3 secuencias de CeMV, en especies de cetáceos nuevas que no pertenecen a ninguna de las 3 cepas conocidas hasta el momento. La primera apareció en un zifio Indo-Pacífico (*Indopacetus pacificus*) de Hawai (West et al., 2013), otro en un delfín costero (*Sotalia guianensis*) de Brasil (Groch et al., 2014), y el último en dos delfines del Indo-Pacífico (*T. aduncus*) de la parte oeste de Australia (Stephens et al., 2014). En la figura 2 (Van Bresse et al., 2014) se observa como pertenecen al grupo de CeMV pero no se encuentran en el mismo clado ni que DMV, ni PMV, ni PWMV. Sin embargo, habrá que estudiar más fragmentos del genoma para poder confirmar que son cepas nuevas.

Al realizar un árbol filogenético basado en la proteína P se puede observar como PWMV forma un tercer clado en CeMV (Figura 2). Estudios genéticos y serológicos indican que los morbillivirus de los cetáceos (DMV, PMV, PWMV) son más cercanos filogenéticamente a los

morbillivirus de los rumiantes (RPV y PPRV) que a los de los carnívoros (CDV y PDV) (Figura 2) (Barrett et al., 1993; Blixenkroner-Moller et al., 1994; Blixenkroner-Moller et al., 1996; Haffar et al., 1999; Taubenberger et al., 2000; Visser et al., 1993).

De hecho, basándose en la comparación de las secuencias de nucleótidos del gen P, en el extremo 3', los aislados de DMV y PMV forman un clado en el cual están separados por una divergencia del 18,3%, mientras que CDV y PDV forman un segundo cluster con divergencia interna del 39,3%. Las cepas de MeV forman un tercer cluster en los que la máxima divergencia que se puede encontrar entre las distintas cepas es de un 12,4% (Figura 2). Se obtiene resultados similares cuando se comparan el extremo 3' del gen H: DMV y PMV forman un cluster con una divergencia interna del 15,5%, CDV y PDV forman un segundo cluster con una divergencia interna del 38%, y las cepas de MeV forman el tercer cluster con una divergencia interna del 7% (van de Bildt et al., 2005).

Como en el 2000 apareció el tercer miembro que conforma CeMV, que es PWMV, la secuenciación y los análisis filogenéticos demuestran que forma un clado diferente que DMV y PMV y por eso se reconoció como cepa. Es por ello que en los árboles filogenéticos tanto del gen H, N y P contienen tres clados diferentes: uno para DMV, otro para PMV, y el último para PWMV. A su vez los tres clados conforman un mismo cluster (Figura 2) (Bellière et al., 2011a).

En 2005, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendó que los morbillivirus deberían ser genotipados usando la secuencia C-terminal de N y la secuencia completa de H. Por ello basándose en esto, DMV y PMV están considerados como dos cepas de la misma especie viral debido a su baja divergencia de los aminoácidos.

En un artículo publicado en 1995, se sugería que en condiciones naturales cada morbillivirus infecta uno o más hospedadores de un mismo orden (Osterhaus et al., 1995). Sin embargo, se ha podido comprobar que esta hipótesis en condiciones naturales y experimentales no se cumple. Por ejemplo, en condiciones naturales, CDV y PDV pueden infectar a todas las especies del orden *Carnivora*. En condiciones experimentales, MeV puede infectar a roedores; RPV, a conejos; PMV a perros; y CDV a roedores (Osterhaus et al., 1995).

Los pinípedos, por ejemplo se pueden infectar no solamente por PDV sino también con el morbillivirus de la foca monje (MSMV), llamado así porque se encontró en una foca monje del

mediterráneo (*Monachusmonachus*). Aunque MSMV afecta a pinípedos, este virus se clasifica filogenéticamente dentro de los CeMV(Osterhaus et al., 1997; van de Bildt et al., 2000). Esto lo que implica es la transmisión entre hospedadores de distintos órdenes (*Carnivorae/Cetacea*) (como ocurre en la transmisión de CeMV entre *M. monachus* y las especies de odontocetos (van de Bildt et al., 1999).

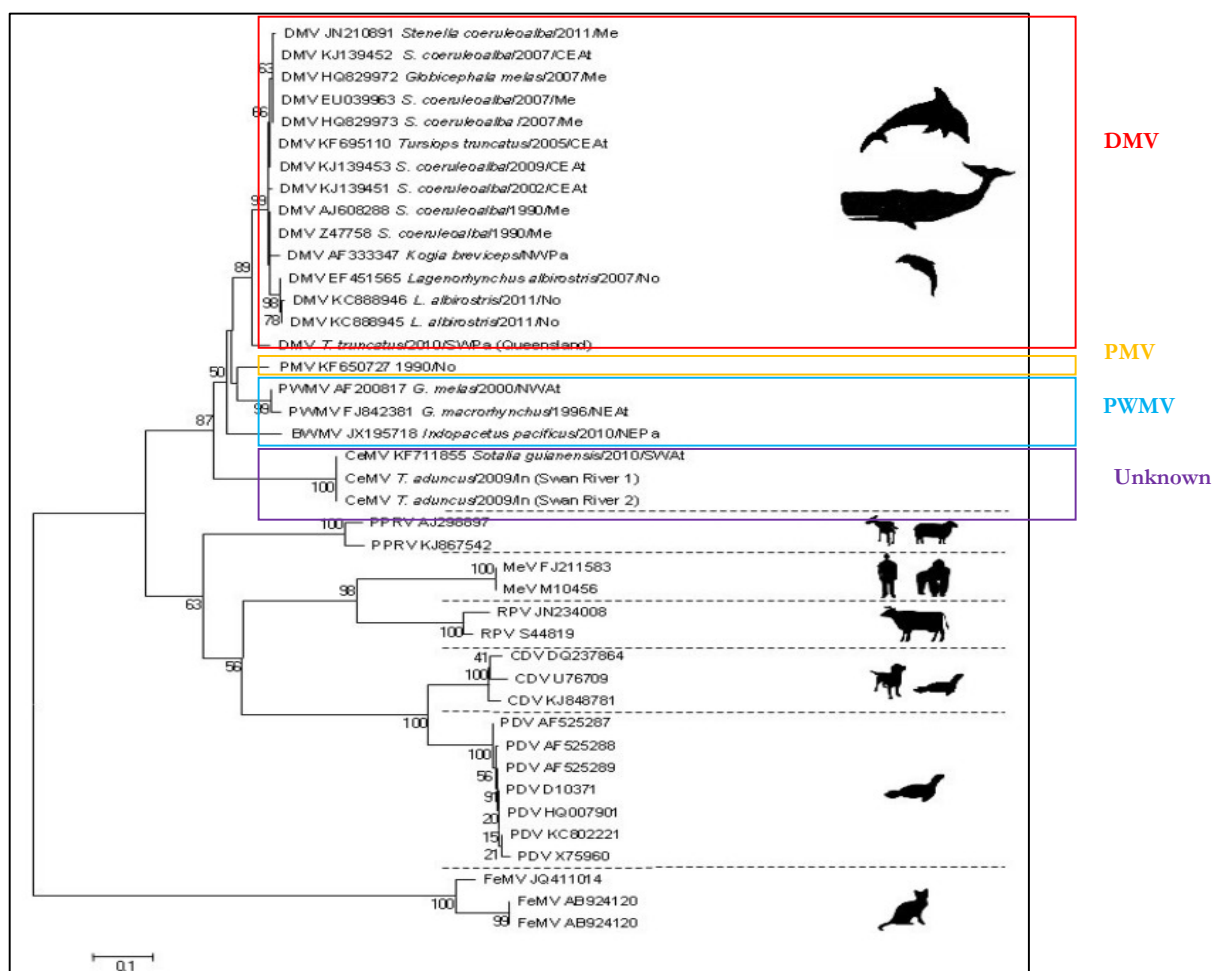


Figure 2: Clasificación filogenética molecular del género Morbillivirus. En los recuadros rojo, amarillo y azul se encuentran las 3 cepas conocidas y en el púrpura las nuevas cepas identificadas recientemente. (Fuente: Van Bressemer et al. 2014)

3.1.3. Patogenia

No se conoce mucho acerca de la patogenia pero viendo las lesiones de los animales y sabiendo que pertenece al género morbillivirus se cree que una vez el virus ingresa, la replicación viral comienza en el bazo, nódulos linfáticos y tonsilas, causando viremia, pirexia y leucopenia inicialmente. Posteriormente, el virus continua replicándose asociado a tejidos linfoides, pero al mismo tiempo éste comienza a diseminarse, asociado a leucocitos de la piel, membranas mucosas del sistema respiratorio, gastrointestinal, urogenital y sistema nervioso; causando un segundo periodo febril. Los sistemas más afectados son el sistema respiratorio y el sistema nervioso (Doignan, 1999). Sin embargo, en los últimos tiempos se han descrito distintas formas de la enfermedad aunque, algunas de ellas no están todavía bien caracterizadas. Son las siguientes:

3.1.3.1. Forma sistémica aguda

Esta forma de la enfermedad es la que generalmente se asocia con las lesiones típicas de CeMV (apartado 3.1.6) y que tiene un fin fatal para los animales que lo sufren. En estos casos se puede encontrar el virus en cualquier tejido del animal, ya que, aunque las mayores lesiones se encuentran a nivel pulmonar, nervioso y linfático, el virus ya se ha diseminado en todo el organismo del animal y conlleva su muerte en poco tiempo. Los signos clínicos y las lesiones son severas en estos animales. Esta es la forma que apareció en los primeros brotes de esta enfermedad tanto en la costa atlántica de los Estados Unidos (Kennedy et al., 1991) como en la costa mediterránea española (Domingo et al., 1992).

3.1.3.2. Forma sistémica subaguda

Esta forma se da en aquellos animales que han sido capaces de sobrevivir al estado agudo pero que la inmunosupresión producida por el virus hace que aparezcan infecciones oportunistas como *Toxoplasma gondii*, brucelosis, herpesvirus, bacterias y hongos. Ésta, se ha descrito en distintos cetáceos que vararon durante brotes de la enfermedad en Europa (Keck et al., 2010; Mazzariol et al., 2012), Suramérica (Groch et al., 2014) y Australia (Stone et al., 2011). Aunque aparecen lesiones típicas de la infección aguda, suelen ser más moderadas, pueden incluso no estar presentes o estar escondidas por la respuesta inflamatoria de los organismos oportunistas. Es por ello que la confirmación de la enfermedad se hará mediante técnicas como la inmunohistoquímica o la PCR que sí identificarán el virus en varios sistemas del animal (normalmente pulmonar y nervioso).

3.1.3.3. Forma crónica o localizada

Esta forma se describió por primera vez en 1995 tras dos brotes de DMV en el mar Mediterráneo (Domingo et al., 1995) y se caracteriza porque tanto las lesiones que aparecen en el animal como la detección de CeMV queda restringida al sistema nervioso. De hecho las lesiones que se encuentran sugieren que podría ser similar a la panencefalitis esclerosante subaguda, que se da en humanos o la encefalitis del perro viejo. Esta forma se ha descrito en varios artículos (Domingo et al., 1995; Sierra et al., 2014a; Soto et al., 2011). En todos los casos se detectaron por PCR convencional o inmunohistoquímica.

3.1.4. Epidemiología

3.1.4.1. Hospedadores afectados

Las especies afectadas hasta el momento son todos cetáceos de vida libre. Por un lado están los delfines mulares (Di Guardo et al., 2013; Krafft et al., 1995; Lipscomb et al., 1996; Lipscomb et al., 1994; Reidarson et al., 1998b; Taubenberger et al., 1996), delfines listados (Aguilar and Raga, 1993; Di Guardo et al., 2013; Domingo et al., 1990; Raga et al., 2008), en el delfín común (Birkun et al., 1999), en el rorqual común (Jauniaux et al., 2000; Kennedy, 2001), en la marsopa común (Kennedy et al., 1992), en las ballena piloto (Di Guardo et al., 2013; Mazzariol et al., 2012; Taubenberger et al., 2000), en los calderones tanto tropical como común (Bellière et al., 2011a; Fernandez et al., 2008; Taubenberger et al., 2000), delfines oscuros (Van Bressem et al., 1998) y delfines comunes costeros (Doignan, 1999; Groch et al., 2014; Lipscomb et al., 1994) (Tabla 2). Por último las nuevas incorporaciones son el zifio Indo-Pacífico (West et al., 2013), el delfín costero (Groch et al., 2014) y el delfín del Indo-Pacífico (Stephens et al., 2014)

3.1.4.2. Excreción y transmisión

Los mamíferos terrestres infectados con morbillivirus excretan grandes cantidades de virus, y la transmisión horizontal vía aerosoles es muy común. En *P. phocoena* y otros cetáceos se cree que las rutas de transmisión de la infección son similares ya que el comportamiento gregario de estos animales puede facilitar su diseminación (Van Bressem et al., 1999). De hecho, la densidad de las poblaciones podría ser un factor clave en la propagación de las infecciones tanto vía aerosol como por contacto directo (Domingo et al., 2002).

Se han identificado antígenos de morbillivirus en prácticamente todos los tejidos del cuerpo en los animales infectados, y esto sugiere que la excreción viral podría ocurrir a través de todos los

orificios corporales y piel (Domingo et al., 1992; Kennedy, 1998). Sin embargo, ya que los cetáceos pasan toda su vida en el agua, la transmisión horizontal a través de orina o heces es muy poco probable.

Por otro lado respecto a la transmisión vertical, se han encontrado antígenos de CeMV en el pene y epitelio prepucial de *P. phocoena* del mar del norte (Kennedy, 1998), en el oviducto de una hembra de *T. truncatus* que varó durante el brote de la costa atlántica estadounidense entre 1987-88 (Schulman et al., 1997) y en una hembra de *S. coreuleoalba* del brote del mediterráneo de 1990 (Domingo et al., 1992). Esto sugiere una transmisión vertical entre madre e hijo (Kennedy, 1998). Además, un fibroma testicular obtenido de un *D. delphis ponticus* del mar negro fue positivo a CeMV por PCR (Birkun et al., 1999). Sin embargo la primera evidencia de que había transmisión vertical fue cuando se encontró ARN de DMV en cerebro, pulmón, bazo, ganglios linfáticos e hígado de un feto sietemesino de una hembra *G. melas* infectada con DMV y que varó en las islas Baleares en el 2007 (Van Bresse et al., 2001a). Este dato sugiere que las hembras infectadas con CeMV podrían transmitir la infección a sus fetos y neonatos en el útero y durante la lactación respectivamente. La transmisión en útero ya ha sido descrita en humanos con MeV. Los efectos en el feto depende del estado del embarazo, pero puede producir abortos, muerte in útero o partos prematuros (Chiba et al., 2003). Si una mujer embarazada se infecta con MeV en el periodo perinatal, los neonatos tienen el riesgo de contraer el sarampión congénito, y un mayor riesgo de desarrollar una temprana y fulminante panencefalitis esclerosante subaguda ya que la transmisión de anticuerpos protectores es incompleta (Giusti et al., 2013). Una situación similar podría haber pasado en una cría de *S. coreuleoalba* que varó en Italia en 2009 con una infección crónica de CeMV (Di Guardo et al., 2011) y en un neonato de *Physeter macrocephalus* encontrado en Hawái en 2011 (West et al., 2015)

Por último, miembros del género Morbillivirus son altamente contagiosos y pueden producir enfermedades epizooticas en poblaciones hospedadoras que nunca hayan estado en contacto con el virus (Kennedy, 1998). Se cree que la transmisión de morbillivirus entre especies podría ser uno de los modos más mayoritarios de transmisión (Kennedy, 1998) ya que está facilitado por las alteraciones de los patrones migratorios de algunas especies como es la *Globicephala spp.* donde la infección por morbillivirus parece enzoootica (Duignan et al., 1995b). No se sabe muy bien como *G. melas* actúa como reservorio. Sin embargo, algunos estudios realizados en *P. phocoena* en las costas de UK

sugieren que podrían tener una inmunidad protectora (Black, 1991) y por eso la infección se convierte en enzoonótica en esta población causando bajos niveles de mortalidad.

3.1.5. Signos clínicos

Los signos clínicos son muy difíciles de observar en los cetáceos de vida libre. Aun así es bastante frecuente encontrar a estos animales con una condición corporal baja o muy baja (Figura 3A) y con alta carga parasitaria tanto de ectoparásitos como de endoparásitos (Figura 3B), así como también la presencia de enfermedades micóticas o bacterianas secundarias debido a inmunosupresión que sufren estos animales por la depleción linfoide. Otra cosa que también se puede observar es distrés respiratorio, cianosis de membranas mucosas, signos nerviosos de encefalitis (como convulsiones), descarga nasal y ocular; en hembras preñadas puede producirse aborto (Kennedy, 2001).



Figura 3: Signos clínicos típicos de CeMV. A) Condición corporal baja; B) Abundancia de ectoparásitos (*Penella* spp); C) Abundancia de endoparásitos en duodeno (Fuente: Elaboración propia)

3.1.6. Lesiones

Como se dice en el apartado anterior los sistemas más afectados son el respiratorio y el nervioso. Es por ello que el hallazgo más común es la neumonía bronquial y alveolitis. Los pulmones suelen estar edematosos con áreas de enfisema y consolidación. Histológicamente se encuentra una neumonía broncointersticial con congestión, edema, exudación serofibrinoso en los alveolos, proliferación de los neumocitos tipo II, y sincitios (Figura 4A). Sin embargo, lo más común es encontrar sincitia e inclusiones (tanto intracitoplasmáticas como intranucleares) en el pulmón (Kennedy, 2001; Lipscomb et al., 1994). En el sistema nervioso, el órgano que se ve más comúnmente afectado es el cerebro. Suele encontrarse una encefalitis caracterizada por necrosis neuronal, gliosis, manguitos perivasculares y desmielinización con astrocitosis y sincitios (Figura 4C) (Kennedy, 2001). Cuando ha habido una infección aguda es común encontrar depleción linfocítica (Figura 4B) (Kennedy, 2001). En el último brote de DMV en el mediterráneo español aparecieron lesiones en la lengua de varios animales tal y como aparece en la peste bovina (Rubio-Guerri et al., 2013).

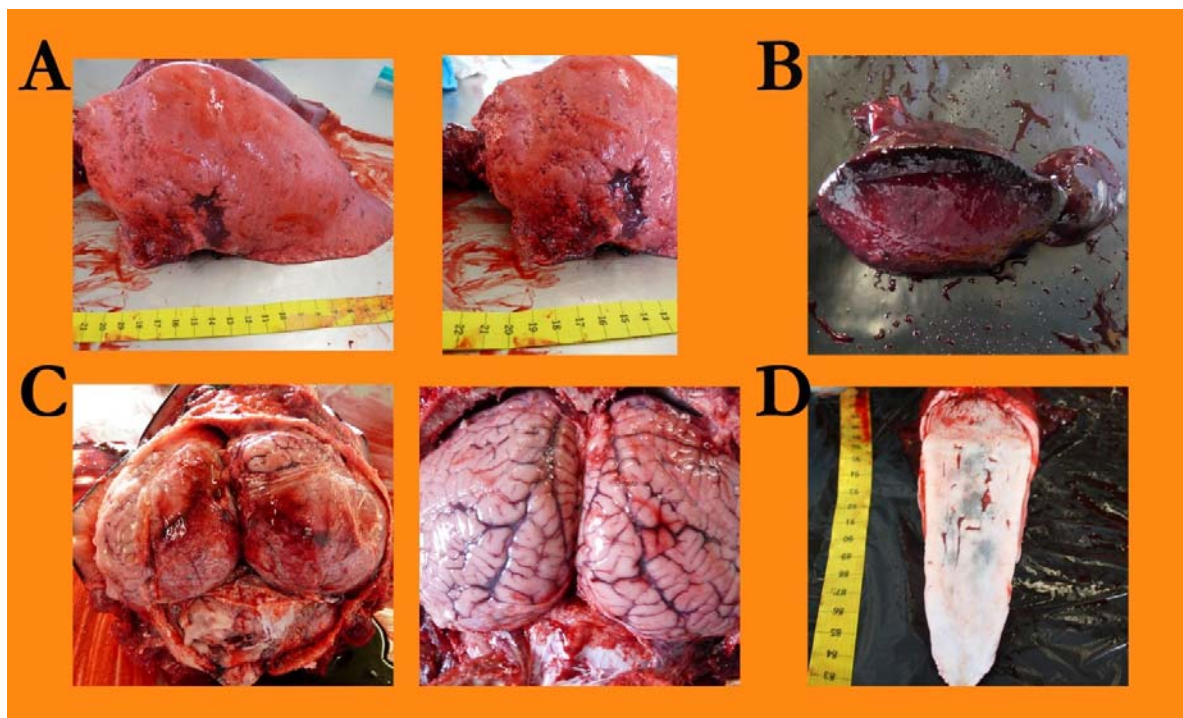


Figura 4: Lesiones macroscópicas típicas de infección de CeMV. A) Pulmón con zonas de consolidación pulmonar; B) Ganglio linfático pulmonar reactivo: hemorrágico y aumentado de tamaño; C) Meninges hemorrágico y encéfalo congestivo. (Fuente: Elaboración propia)

3.1.7. Diagnóstico

El diagnóstico de esta enfermedad se basa en la observación histológica de las lesiones típicas de la infección de CeMV y la detección del virus en los tejidos (normalmente en pulmón, cerebro y ganglios linfáticos) tanto por inmunohistoquímica como por técnicas de PCR y confirmadas por secuenciación (Barrett et al., 1993; Kennedy et al., 1991; Lipscomb et al., 1996). También ha habido casos del aislamiento viral (Kennedy, 2001), algún reporte de la utilización de la microscopía electrónica para la identificación del virus (Doignan, 1999) y ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) en el que se captura del antígeno de morbillivirus.

Ya que el diagnóstico atañe a unos de los objetivos de esta tesis doctoral, a continuación se revisan en profundidad cada uno de ellos:

- Histopatología e Inmunohistoquímica: Las técnicas histológicas clásicas son las que se utilizaron para investigar la infección por CeMV en los primeros casos descritos tanto en *P.phocena* varado en el Atlántico como en los *S. coreuleoalbav* varados en el Mediterráneo y sospechosos de una infección por morbillivirus (Domingo et al., 1990; Kennedy et al., 1988). Con la introducción de la inmunohistoquímica (IHC) como método de diagnóstico de CeMV se avanzó muchísimo con respecto a las técnicas histológicas ya que esta técnica tiene mucha más sensibilidad y especificidad en la detección del virus en aquellos tejidos que su estado de preservación no es el adecuado y en los que las lesiones típicas de la infección por CeMV se tapan por las organismos oportunistas. Los estudios de IHC se realizan con la utilización de un anticuerpo monoclonal comercial isotipo IgG2B frente a la nucleoproteína del virus de CDV (Groch et al., 2014; Stephens et al., 2014; West et al., 2013), con un anticuerpo monoclonal frente a la hemaglutinina del virus PDV (Domingo et al., 1990; Kennedy et al., 1988; Lipscomb et al., 1994), o con un antisuero policlonal de conejo frente a sarampión (Yang et al., 2006). Como presentan reacción cruzada con CeMV se unen a los antígenos que se encuentren en el tejido fijado y se verá en el microscopio con una tonalidad rojiza (Figura 5). El problema de esta técnica es que la especificidad y sensibilidad no es la óptima ya que no existen en el mercado anticuerpos monoclonales específicos frente a DMV y PMV, aunque este sería un gran avance para poder realizar un diagnóstico más preciso. La IHQ junto a las técnicas moleculares son las técnicas de referencia para confirmar un caso o un brote de CeMV.

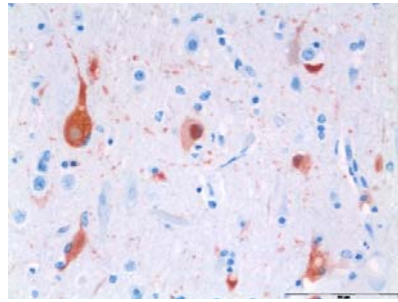


Figura 5: Inmunohistoquímica en cerebro de animal infectado con CeMV. Se muestra una inmunohistoquímica usando anticuerpo monoclonal IgG-2B frente a CDV en tejido nervioso infectado con CeMV. En tonalidad rojiza se muestran las zonas en las que los anticuerpos se han unido y por lo tanto han reaccionado. En este caso el antígeno se encuentra intraneuronal. Fuente: IUSA

- Aislamiento viral: Se ha descrito el aislamiento tanto de DMV y PMV a partir de macerados de pulmón de un *S. coreuleoalba* y de *P. phocoena* respectivamente, e inoculándolos en monocapas de células epiteliales de riñón de mono verde africano (Vero) y siguiendo la metodología estándar (McCullough et al., 1991; Van Bresseem et al., 1991; Visser et al., 1993). Además, también se ha comprobado que CeMV se puede aislar directamente o tras el cocultivo en células Vero, en cultivo primario de células epiteliales de riñón canino, en células pulmonares de un feto bovino y en células mononucleares procedentes de sangre periférica de un *T. truncatus* (Blixenkronne-Moller et al., 1994; McCullough et al., 1991; Van Bresseem et al., 1993). Incluso en cultivo celular primario de células de riñón que provenían de un *P. phocoena* enfermo, se consiguió el aislamiento viral directamente (Visser et al., 1993). Sin embargo, recientemente se ha comprobado que en células Vero, que expresaban el receptor SLAM canino, se reducía el tiempo de aislamiento de PDV de semanas a días (Nielsen et al., 2008). Estas mismas células son las que se utilizaron para crear reservas de DMV y PMV que se habían pasado inicialmente en células Vero (Grant et al., 2010) y también son las que se utilizaron para aislar DMV del cerebro de un *G. melas* que había varado en Valencia durante el brote de 2006-2007 (Raga et al., 2008). Por último, en el último brote de 2013 en las costa atlántica estadounidenses, se han realizado investigaciones en *T. truncatus* y se ha probado la utilidad de aislar CeMV de los tejidos frescos (NOAA, 2014). Gracias al aislamiento viral se pueden hacer reservas de antígeno para luego montar las pruebas serológicas (como queda explicado en el siguiente apartado). Además se puede obtener material genómico para poder realizar un análisis filogenético más completo

- Técnicas moleculares (PCR): estas técnicas como se ha comentado anteriormente son las más utilizadas conjuntamente con la IHQ, y son las técnicas de referencia para el diagnóstico de CeMV. Existen varias PCRs convencionales frente a distintas proteínas de CeMV. La primera que apareció y la más ampliamente utilizada es la que utiliza un par de cebadores “universales” frente a morbillivirus y que amplifica la fosofoproteína, una de las proteínas más conservadas (Barrett et al., 1993). Esta PCR es la más utilizada en los distintos brotes de CeMV a lo largo de la historia (Groch et al., 2014; Reidarson et al., 1998b; Stephens et al., 2014; Yang et al., 2006). Por otro lado Krafft et al. (1995) usó algo similar, pero diseñó un protocolo que permitía la amplificación de ARN degradado en las muestras fijadas en formalina y en las muestras no fijadas pero que precedieran de tejidos autolisados. Esta técnica fue muy útil para confirmar la infección de CeMV en tejidos que habían sido fijados en *D.delphis* que había varado en la costa de California entre 1995-1997 y que no habían guardado muestras sin fijar (Reidarson et al., 1998b). También se utilizó en un estudio retrospectivo de casos de *S. coreuleoalba* que habían varado en el Mediterráneo y que tenían encefalitis crónica (Soto et al., 2011). Posteriormente apareció otra PCR, también convencional, que amplifica la región N terminal del gen de la nucleoproteína, también muy conservada, y que se utiliza para la filogenia (Taubenberger et al., 2000). Sin embargo se ha demostrado que estas PCRs tenían la misma sensibilidad que la IHQ, y además no diferencian entre las tres cepas de CeMV. Es por ello que en el 2009 se publicó una PCR a tiempo real (rt RT-PCR) que amplificaba el dominio terminal de la C hipervariable del gen de la nucleoproteína y que era rápida y que tenía más sensibilidad que las convencionales (Grant et al., 2010). Además era capaz de diferenciar DMV y PMV y no tenía reacción cruzada con CDV, PDV, RPV, PPRV y MeV (Grant et al., 2010). Sin embargo no era capaz de detectar PWMV. El otro inconveniente que tiene es que utiliza dos sondas, por lo que era una técnica costosa. Sin embargo suplió una necesidad que había en el diagnóstico. Además se diseñó una rt RT-PCR que amplificaba el gen del gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), como gen constitutivo, para determinar qué total de ARN extraído de los tejidos de los cetáceos varados era amplificable (Grant et al., 2010). Este test permitió la detección de GAPDH en 14 especies de mamíferos marinos y es esencial para poder interpretar los resultados que nos den negativos con las RT-PCRs. Más recientemente se ha descrito una RT-PCR semi-anidada que utiliza un par de cebadores degenerados y que amplifica el gen de P para detectar morbillivirus en pinnípedos y cetáceos (Sierra et al., 2014a.). Esta PCR es útil

para poder detectar morbillivirus en distintas especies de mamíferos marinos. Por último unos cebadores que amplifican el gen de L (Woo et al., 2012) podrían ser útiles para detectar CeMV en odontocetos y misticetos. Estas técnicas han de utilizarse conjuntamente con otras ya explicadas para poder, no solo realizar el diagnóstico de CeMV, sino también diferenciar la cepa, y saber si es sistémico o crónico. Las técnicas moleculares deben siempre acompañarse de una confirmación mediante la secuenciación.

- Serología: los test de neutralización viral (VN), los test de neutralización por reducción en placa (PRNT) y los ELISAs indirectos (iELISA) son las técnicas más utilizadas para la detección de anticuerpos frente a CeMV. Los iELISA permiten la detección de anticuerpos frente a las proteínas N, P, F y H de CeMV (Orvell et al., 1990) mientras que en VR y PRNT solo detectan los anticuerpos frente a las glicoproteínas de la superficie (H y F) (Barrett et al., 1993). Ya que los morbillivirus son antigénicamente muy parecidos entre sí, pueden existir reacciones cruzadas entre ellos. Sin embargo si se produce suero frente un morbillivirus neutralizará al virus homólogo a un título mayor que si lo hace en morbillivirus heterólogos (Saliki and Lehenbauer, 2001). Es por ello, que en cetáceos es muy importante utilizar suero frente a CeMV para evitar falsos negativos. Existen unos ELISAs indirectos que se diseñaron para analizar muestras de suero hemolizadas que podían ser citotóxicas y que además podían evitar la detección de CeMV a bajos títulos con técnicas VN (Van Bresse et al., 1998). Esas técnicas utilizaban al virus completo de DMV o a la proteína N de RPV para la detección de anticuerpos de CeMV. Los anticuerpos frente CeMV se detectaban usando la proteína A conjugada con la peroxidasa de rábano picante, un constituyente de la pared celular de *Staphylococcus aureus* que se une no específicamente a las inmunoglobulinas de distintas especies entre las que se encuentran los odontocetos (Lindmark et al., 1983; Van Bresse et al., 1993) Hace poco, se ha diseñado otro iELISA que detecta anticuerpos de CeMV en el suero de odontocetos. Este utiliza como antígeno de recubrimiento una proteína purificada DMV-N y expresada en un vector de baculovirus (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) (Grant et al., 2010). Por último, existe un ELISA competitivo para testar sueros de distintas especies de mamíferos marinos y que usa anticuerpos monoclonales de CDV y PDV. Su principal ventaja sobre los iELISA es que se puede utilizar el conjugado de inmunoglobulina anti-ratón en sueros de cualquier especie animal (Saliki and Lehenbauer, 2001). El único problema es que la sensibilidad es baja para la

detección de anticuerpos frente a CeMV comparado con los morbillivirus de los carnívoros. Es por ellos que la técnica serológica más sensible es iELISA y por ello es la más utilizada.

3.1.8. Tratamiento

No existe tratamiento efectivo. El tratamiento es de soporte ya que la mortalidad es muy alta en las poblaciones susceptibles. Como ya se ha dicho anteriormente CeMV afecta al sistema linfático, por lo que crea una inmunosupresión y por lo tanto son muy viables las infecciones secundarias. Se recomienda la cuarenta para evitar la diseminación de la misma (Kennedy, 2001).

3.1.9. Vacunas y medidas de control

Se ha puesto de manifiesto la necesidad de unas medidas de control para reducir al máximo los efectos de esta enfermedad en las poblaciones de cetáceos salvajes. Es por ello, que una medida sería el desarrollo de una vacuna efectiva frente a CeMV. Aunque no existe ninguna vacuna de CeMV con licencia para uso en cetáceos, existen vacunas frente a CDV (atenuadas o inactivadas con el virus completo o con subunidades virales) que se ha demostrado que son efectivas en conferir inmunidad y en controlar los brotes. Mientras este tipo de vacunas sean ilegales, todos los esfuerzos deberían centrarse en el desarrollo de una vacuna que pueda utilizarse en cetáceos.

Ya se han realizado importantes progresos en este campo. El programa de mamíferos marinos de la U.S. Navy, en colaboración con la industria y otros grupos académicos, han desarrollado y evaluado una vacuna de ADN que tiene como diana DMV (West et al., 2013). El principal objetivo fue inducir ambas inmunidades celular y humoral, para así dar protección frente a un amplio rango de patógenos potenciales. Esta vacuna de ADN codifica los genes F y H, que son las proteínas importantes en la patogenicidad de los virus de la familia *Paramyxoviridae* (West et al., 2013).

En este estudio, desarrollaron dos vacunas, una que es la que codifica para la proteína F (pVR-DMV-F) y la otra para la proteína H (pVR-DMV-H), y probaron primero por expresión *in-vitro* y posteriormente por inmunogenicidad en el ratón. Por último un grupo de delfines mulares (machos y hembras) se inmunizaron con ambas vacunas y otro grupo con vacuna mock (sin el vector pVR) como control negativo. Los animales se inocularon en la semana 0, y posteriormente se revacunaron en las semanas 8 y 14. El título de anticuerpos frente a las proteínas F y H de DMV se incrementaron significativamente entre las semanas 0 y 20 (West et al., 2013). El único problema es

que estos resultados necesitan ser validados en tamaño de poblaciones mayores y sobretodo bajo condiciones naturales en el huésped.

CEPAS DE MORBILLIVIRUS DE LOS CETÁCEOS

Tipo de Morbillivirus	Signos clínicos más importantes	Diagnóstico	Tratamiento
DMV	Pobre condición corporal, distrés respiratorio, signos nerviosos, alta carga parasitaria tanto de ectoparásitos como de endoparásitos.	Neutralización viral, cultivo viral, inmunohistoquímica, PCR, microscopia electrónica	No hay tratamiento o vacunas disponibles, terapia de soporte, cuarentena.
PMV	Pobre condición corporal, distrés respiratorio, signos nerviosos, alta carga parasitaria tanto de ectoparásitos como de endoparásitos.	Neutralización viral, cultivo viral, inmunohistoquímica, PCR, microscopia electrónica	No hay tratamiento o vacunas disponibles, terapia de soporte, cuarentena.
PWMV	Pobre condición corporal, distrés respiratorio, signos nerviosos, alta carga parasitaria tanto de ectoparásitos como de endoparásitos.	Neutralización viral, cultivo viral, inmunohistoquímica, PCR, microscopia electrónica	No hay tratamiento o vacunas disponibles, terapia de soporte, cuarentena

Tabla 2: Resumen para poder diferenciar las tres cepas hasta el momento conocidas de CeMV

3.2. Distribución de la enfermedad

La principal causa del incremento de varamientos en cetáceos es la infección por morbillivirus (van de Bildt et al., 2000). Morbillivirus necesita poblaciones muy grandes de individuos susceptibles para poder ser considerada endémica (por ejemplo en sarampión unas 3.000.000 personas), además no se conoce que puedan existir portadores y se sabe que produce una inmunidad protectora larga (Black, 1991).

Se han utilizado distintas técnicas para la detección de las infecciones por CeMV tanto en odontocetos como en mysticetos que se han ido dando a lo largo de la historia y en distintas partes del mundo en forma de brote o como casos aislados (Anexo I). Como se indica en la tabla, DMV ha sido la cepa más veces identificada en el hemisferio norte, seguida de PMV y PWMV. Además estudios serológicos sugieren que CeMV es endémico en especies de odontocetos gregarios del norte del Atlántico y, posiblemente también en el suroeste Atlántico y en el sur del Pacífico (Duignan et al., 1995a; Van Bressemer et al., 2001a). Por otro lado, se ha encontrado que distintas poblaciones de *Globicephala spp*, *L. obscurus*, *Lagenodelphis hosei* y *Peponocephala electra* tiene una prevalencia muy alta de seropositivos a DMV y podrían ser reservorios vectores de la infección en especies susceptibles (Stone et al., 2012; Van Bressemer et al., 2001b). De hecho, se sabe que en poblaciones susceptibles, cuando tienen inmunosupresión o ausencia de inmunidad, es cuando se suelen dar los brotes de la enfermedad produciendo cientos de muertes, tal y como ha ocurrido desde los años 80.

3.2.1. Europa

3.2.1.1. Mar del Norte, NE y CE atlántico

Entre 1988 y 1990 se dieron las primeras mortandades a causa de CeMV en las costas de Irlanda, Inglaterra y Países Bajos (Figura 5). De hecho este brote empezó en 1988, en el que seis *P. phocoena* con lesiones típicas de CeMV vararon en las costas irlandesas y fueron positivos a la prueba de la IHQ, además de aislarse el virus en los seis (Kennedy et al., 1991; Kennedy et al., 1988; McCullough et al., 1991). PMV fue la cepa que identificaron gracias a las técnicas moleculares como responsable de este brote (Kennedy et al., 1988; Visser et al., 1993). Además entre 1990-2011 se han visto casos esporádicos de infección por CeMV en el norte de Europa en *L. albirostris* y *B. physalus* (Jauniaux et al., 1998; Jauniaux et al., 2000). Estudios serológicos de *D. delphis* y *P. phocoena* varados entre 1988-1999, mostraron que la prevalencia de la seropositividad a DMV fue

disminuyendo a lo largo del tiempo solo adultos de estas dos especies fueron positivos entre 1997-1999. Esto sugería que el virus no había persistido como una infección endémica en estas poblaciones (Van Bressem et al., 2014; Van Bressem et al., 2001b). Además, en ninguna marsopa varada en las costas de Bélgica, norte de Francia, Inglaterra, y Alemania se encontró una infección sistémica por CeMV entre 1990-2000 excepto un *P. phocoena* que varó en Kent, Inglaterra (Jauniaux et al., 2002; Jepson et al., 2000; Kennedy et al., 1992; Siebert et al., 2001). Por otro lado, en el canal de Inglaterra en 1996 se encontró un *G. melas* juvenil que su suero tenía altos títulos de anticuerpos frente DMV sugiriendo que esta especie podría tener algún papel en el mantenimiento de del virus en NE Atlántico. (Van Bressem et al., 2014). Sin embargo hasta que no se realicen más estudios serológicos y moleculares en esta zona no se sabrá cómo se comporta CeMV en la cuenca oceánica.

Recientemente, se han realizado estudios de CeMV en CE del océano Atlántico y han encontrado infecciones por CeMV en *Delphinidae*. En el cerebro de un *G. macrohynchus* que había varado en Tenerife en 1996 se pudo identificar un virus que era muy parecido a PWMV (Bellière et al., 2011a) (Figura 6). Además, en las Islas Canarias han realizado un estudio retrospectivo, en el que han testado la presencia de CeMV mediante IHC y RT-PCR en *S. coeruleoalba* y *D. delphis* que habían varado allí entre 2002-2011 y que presentaban meningoencefalitis no supurativa, encontrando DMV restringido al SNC por lo que sugieren que la forma crónica de la enfermedad era la responsable de la lesión (Sierra et al., 2014a). Por último, se ha descrito una infección sistémica de CeMV en un *T. truncatus* varado en Lanzarote en 2005 y DMV fue identificado como el responsable de la muerte del animal (Sierra et al., 2014b)

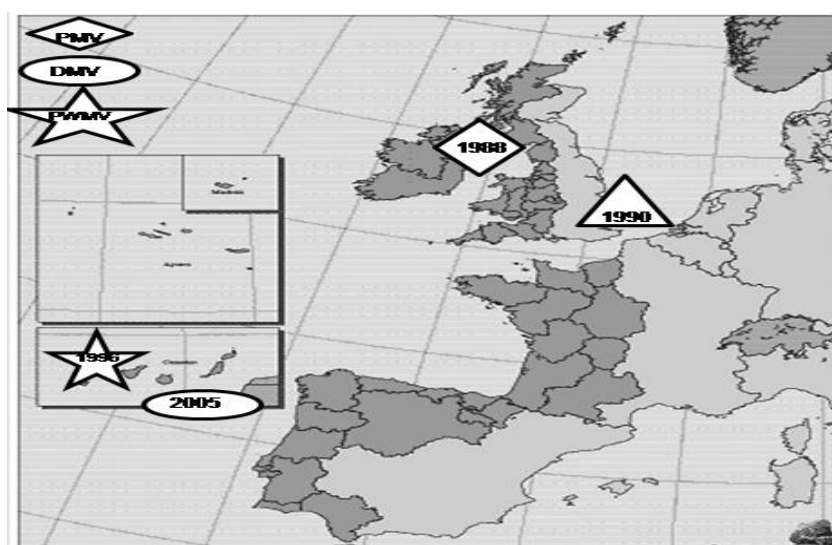


Figura 6: Mapa del Mar del Norte, CE y NE atlántico. Se representan la localización de los brotes de CeMV ocurridos a lo largo de la historia, la cepa responsable del mismo y la fecha. Fuente: Elaboración propia.

3.2.1.2. Mar Mediterráneo

Hasta el 2010 se habían descrito dos brotes de CeMV en esta zona. El primer episodio se dio entre 1990 y 1992 en el que alrededor de 1000 *S.coreuleoalba* vararon en las costas mediterráneas europeas (Aguilar and Raga, 1993) (Figura 7). En este momento que solo se había descrito la cepa PMV, se identificó un virus parecido pero suficientemente diferente para que lo describieran como una cepa distinta (DMV) (Barrett et al., 1993). En la primera fase, el brote comenzó en la costa mediterránea española, en Valencia (Domingo et al., 1990) y con el tiempo fue extendiéndose a las costas mediterráneas de Francia (Bompar et al., 1991), Italia, Argelia y Marruecos, llegando hasta la costa atlántica del estrecho de Gibraltar (Aguilar and Raga, 1993; Van Bressemer et al., 2014). En la segunda fase, el brote afectó sobretodo a animales de la costa de Italia (Bortolotto et al., 1992) y Grecia (Webb, 1991) en el verano de 1991. Por último, en la tercera y última fase el brote se extendió durante la primavera de 1992 desde las Islas Griegas hasta el Mediterráneo oriental y noreste (Aguilar and Raga, 1993).

Desde 1994, no había habido ningún episodio anormal de mortalidades en esta zona, sin embargo en 2006, DMV se identificó en un *G.melas* (Raga et al., 2008). Esta cepa, que ya había sido la responsable del brote anterior fue también la causa del episodio de mortalidades que se achacó a *G.melas*, *S.coreuleoalba* y *T. truncatus* a lo largo de las costas mediterráneas españolas y francesas y que duró hasta finales del 2008 (Keck et al., 2010; Raga et al., 2008) (Figura 7). Este brote comenzó en el estrecho de Gibraltar y continuó a lo largo de las costas mediterráneas españolas entre Octubre de 2006 y Abril de 2007. Al menos 60 *G. melas* murieron en este periodo (Raga et al., 2008). Además, más de 100 *S. coreuleoalba* vararon entre Enero y Octubre del 2007. La primera carcasa de *S. coreuleoalba* fue encontrada en el Golfo de Valencia y posteriormente fueron apareciendo en las Islas Baleares, Cataluña, sur de España y el mar de Liguria (Raga et al., 2008). Entre Agosto de 2007 y marzo de 2008, aproximadamente 100 *S.coreuleoalba*, un *G. melas* y 5 *T.truncatus* se vieron afectados en las costas francesas (Keck et al., 2010).

Durante este brote de 2006-2007, vararon *G. melas* de todas las edades, aunque las mayoría eran adultos (Raga et al., 2008). Esta distribución de edades sugiere que no hubo contacto con el virus anteriormente (Bellière, 2012). Sin embargo, DMV parecía que había afectado primordialmente a jóvenes *S.coreuleoalba* que eran más jóvenes que los animales que habían varado durante el brote de 1990 (Keck et al., 2010; Raga et al., 2008). Es por ello, que parecía que la población de *S.coreuleoalba* podría haber tenido memoria inmunológica del brote de 1990. Esto es consistente con el

hecho con que todos los morbillivirus son capaces de persistir durante largos periodos en los hospedadores supervivientes(Black, 1991).

Entre epizootias, hasta el momento, sólo se habían reportado la forma crónica de la infección, ya que en 50 *S.coreuleoalba* analizados en periodo post-epizoótico sólo habían encontrado el antígeno de DMV restringido al SNC (Soto et al., 2011). En estas publicaciones sugieren que esto pasa porque DMV no persiste en la población de *S.coreuleoalba* del mediterráneo entre epizootias y que por eso esto no apoya la teoría de que DMV se esté haciendo endémica en el Mediterráneo sin embargo, se necesitarían más estudios para confirmar esta hipótesis.

Recientemente, en 2011, en la costa italiana se encontraron varios casos de infección por DMV en 2 *S. coreuleoalba*, 1 *T. truncatus* y 2 *B. physalus*(Di Guardo et al., 2013)(Figura 7). En 3 de estos animales (2 *S.coreuleoalba* y 1 *T.truncatus*) se detectó DMV por IHC y/o RT-PCR sólo en el cerebro y sólo en 2 animales (1 *S. coreuleoalba* y 1 *T.truncatus*) presentaba meningoencefalitis no supurativa (Di Guardo et al., 2013). Por otro lado uno de los *B.physalus* además de identificar el antígeno de DMV tanto por IHC como por RT-PCR en cerebro, se encontró una coinfección por *Toxoplasma gondii* (Di Guardo et al., 2013). Por último, en el mar Tirreno italiano, se produjo un evento de mortalidades inusuales durante el 2013 (Casalone et al., 2014). CeMV se ha detectado mediante RT-PCR en muestras de cerebro y pulmón de animales que habían varado(Casalone et al., 2014). Entre ellos encontraron 22 positivos de 52 *S. coreuleoalba*, en uno de tres *T. truncatus* y en un *B. physalus*(Casalone et al., 2014). Sin embargo, como ninguno de estos animales positivos tenía lesiones típicas de CeMV y, además se encontraron otros agentes infecciosos en la mayoría de estos individuos, no se pudo determinar finalmente la causa de este evento(Casalone et al., 2014).

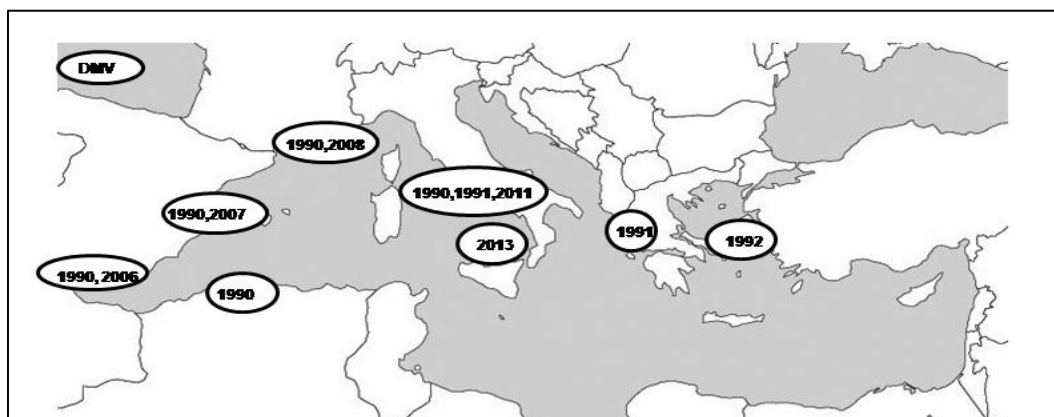


Figura 7: Mapa del Mar Mediterráneo. Se representan la localización de los brotes de CeMV ocurridos a lo largo de la historia, la cepa responsable del mismo y la fecha.Fuente: Elaboración propia.

3.2.1.3. Mar Negro

En 1994, 26 delfines comunes del Mar Negro (*Delphinus delphis ponticus*) murieron a lo largo de la costa de Crimea (Ucrania) y otros 21 a lo largo de la costa del mar Negro (Rumanía, Bulgaria, Rusia y Ucrania) (Birkun et al., 1999; Tsur et al., 1997) (Figura 8). CeMV fue detectado por técnicas de IHC y RT-PCR. Se desconoce la cepa responsable de estos varamientos ya que no se realizó secuenciación. Se piensa que *S. coreuleoalba* infectados con DMV y que sobrevivieron al brote del mediterráneo de 1990 fueron los responsables de la dispersión del virus desde el mar Mármara al mar Negro, donde la población de *D. delphis* se infectaron dando lugar al episodio de mortandades de 1994. Esta hipótesis se apoya por el hecho de que *S. coreuleoalba* y *D. delphis* suelen nadar juntos, y por lo tanto aumenta la probabilidad de una transmisión horizontal (Birkun et al., 1999).

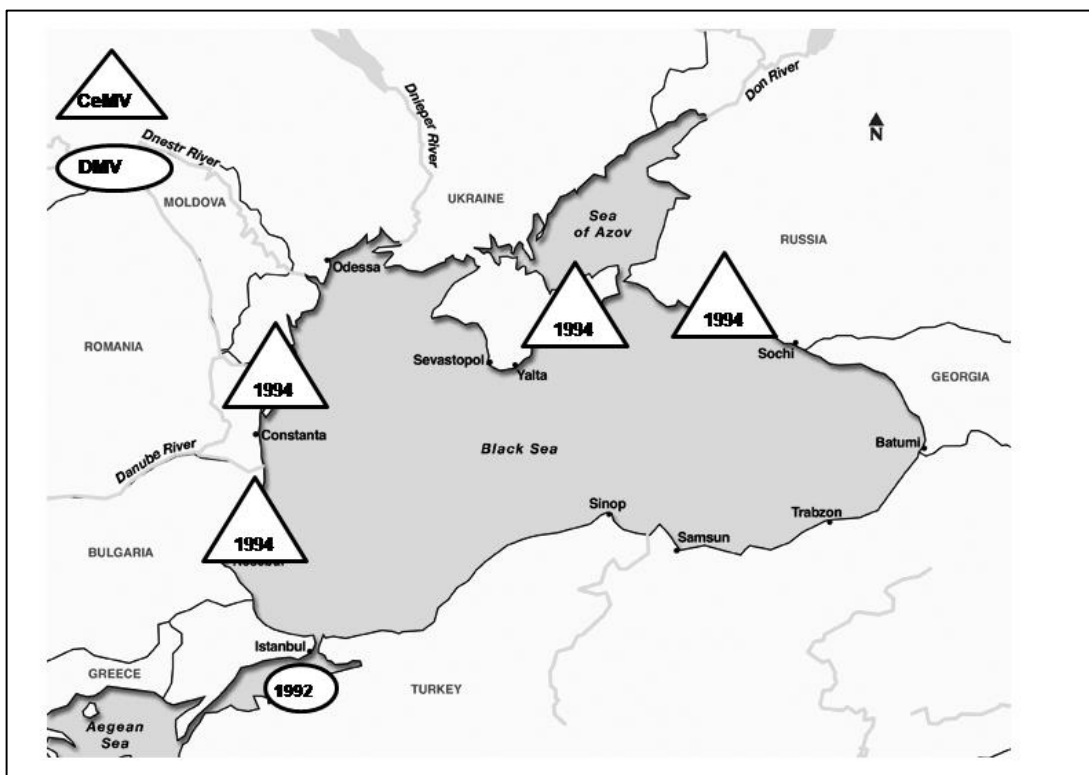


Figura 8: Mapa del Mar Negro. Se representan la localización de los brotes de CeMV ocurridos a lo largo de la historia, la cepa responsable del mismo y la fecha. Fuente: Elaboración propia.

3.2.2. Norte América

3.2.2.1. Costa Atlántica

Entre Enero y Mayo 1982, en el Sistema del Lago del Río Indio (IRL), en Florida, se encontraron 43 carcasas, teniendo en cuenta que la comunidad de estos animales se estimaba que era de 211 individuos (Hersh et al., 1990). Los datos serológicos indicaron que el brote se había debido a una infección por morbillivirus y se hipotetizó que la fuente de la infección había sido el contacto con especies endémicamente infectadas como son los *T. truncatus* (Duignan et al., 1996). Además, estudios serológicos que se realizaron en muestras recogidas entre 2003 y 2007 indicaron que los del delfines de IRL nacidos después del evento de mortalidad ocurrido en 1982 tenían anticuerpos frente a DMV-like, indicando que había habido exposición e infección, aunque después de 1982 no ha habido ningún brote ni muertes asociadas a infección por morbillivirus después de 1982 (Bossart et al., 2010).

Desde 1987 a Mayo 1988, CeMV infectó al menos a 645 *T. truncatus* tanto de estuario como costeros, empezando en Nueva Jersey llegando a Florida (Duignan et al., 1996; Lipscomb et al., 1994; Taubenberger et al., 1996) (Figura 9). Esto representaba el 50% de los *T. truncatus* de esta zona (Lipscomb et al., 1994). Además *S. coreuleoalba* también se vio afectado en este brote, estando dos especies de cetáceos implicados en la epizootia. En un estudio retrospectivo en 1996 (Taubenberger et al., 1996), se identificó mediante RT-PCR y confirmación por secuenciación que tanto DMV como PMV habían estado involucrados en estas muertes. De hecho, PMV o DMV se encontró en 20 *T. truncatus*, ambos virus se determinó en 4 *T. truncatus* y sólo DMV se encontró en un *S. coreuleoalba* (Taubenberger et al., 1996).

En Julio de 2013, el último brote de CeMV afectó a las poblaciones de cetáceos a lo largo de la costa atlántica, comenzando en Nueva York hasta el norte de Florida (NOAA, 2014). Alrededor de 1500 *T. truncatus* murieron y el 93% de ellos fueron positivos a DMV mediante RT-PCR (NOAA, 2014) (Figura 9). La posible causa de los brotes tanto de 1987 como el de 2013 podría haber sido el contacto entre *T. truncatus* costeros y especies del litoral (*T. truncatus* del litoral, *Globicephalaspp.*, *S. coreuleoalba*, *L. bosei*, y *Pseudorca crassidens*) en las que CeMV es endémico (Duignan et al., 1995a; Duignan et al., 1996). El solapamiento estacional entre las poblaciones residentes de *T. truncatus* costeros en ciertas épocas del año, y la migración de las poblaciones migratorias costeras, podría haber favorecido la transmisión de la enfermedad por la costa (Rosel et al., 2009). Sin embargo, un

estudio serológico realizado en muestras recogidas entre 1994-2004 de *T.truncatus* de estuario y costeros procedentes de la costa este atlántica de USA, que eran de vida libre y que fueron capturados y posteriormente soltados, indicó que la seroprevalencia disminuía a lo largo del años del estudio, sugiriendo que CeMV no se mantenía como infección endémica en estas poblaciones, como se había predicho anteriormente (Duignan et al., 1996; Rowles et al., 2011). Por ello, la inmunidad de la población probablemente siguió disminuyendo en la población, dando lugar a mayor número de individuos susceptibles y por lo tanto dando lugar al brote del 2013. De hecho, se están investigando qué papel juega el ambiente y factores antropogénicos en estas mortalidades y los impactos en la población (NOAA, 2014).

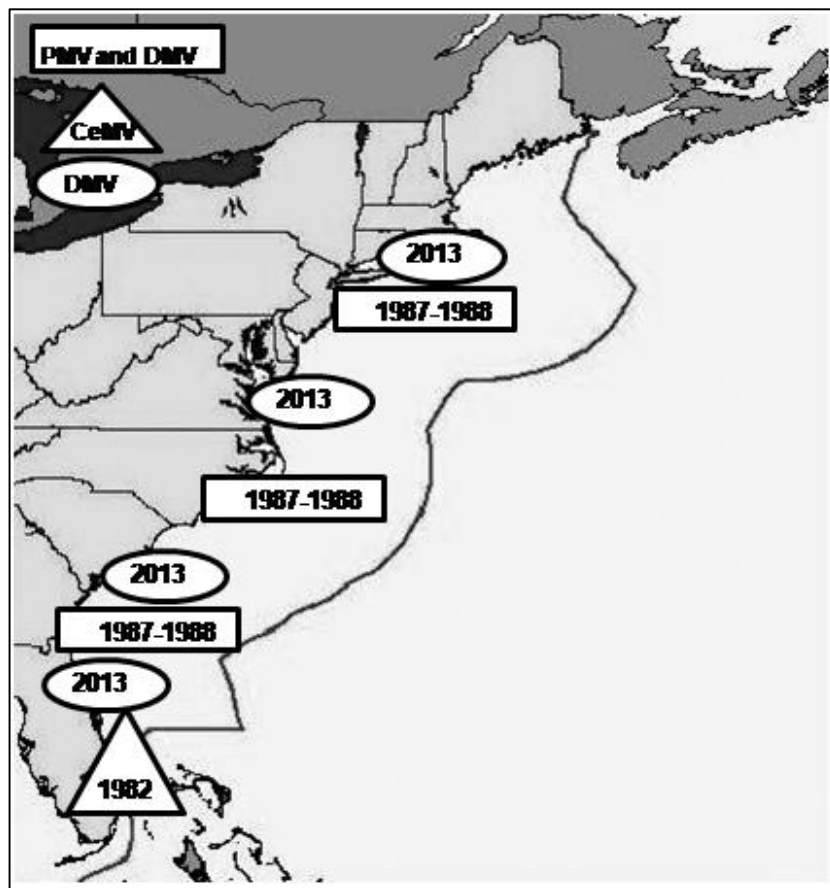


Figura 9: Mapa de la costa atlántica americana. Se representan la localización de los brotes de CeMV ocurridos a lo largo de la historia, la cepa responsable del mismo y la fecha. Fuente: Elaboración propia

3.2.2.2. Golfo de Méjico

La mortalidad de los *T.truncatus* se vio incrementada considerablemente desde Julio a Noviembre de 1993 a lo largo de la costa de Alabama; desde Agosto a Diciembre de 1993 a lo largo de la costa del Misisipi, y de Diciembre a Abril de 1994 a lo largo de la costa de Texas (Krafft et al., 1995; Lipscomb et al., 1996) (Figura 10). Alrededor de 50 *T.truncatus* atlánticos murieron. En este caso PMV fue la cepa que se identificó mediante RT-PCR en varias muestras de pulmones de animales afectados (Taubenberger et al., 1996).

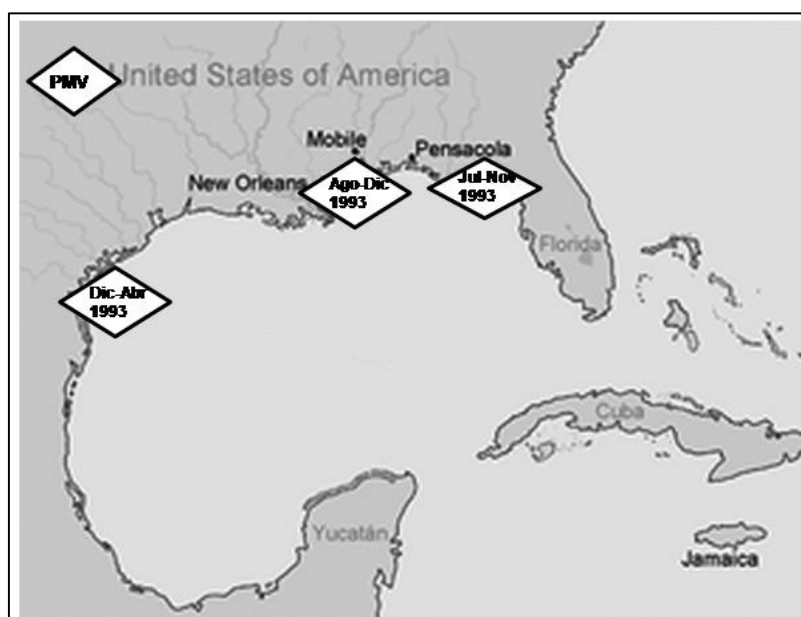


Figura 10: Mapa del Golfo de Méjico. Se representan la localización de los brotes de CeMV ocurridos a lo largo de la historia, la cepa responsable del mismo y la fecha. Fuente: Elaboración propia

3.2.2.3. Norte del Pacífico

Recientemente, en el 2010, se detectó en un joven *I.pacificus* que había varado en Hana, Maui, por una infección por CeMV (Figura 11). Este animal presentaba fracturas de los huesos maxilares y mandibular (West et al., 2013). Esta ballena presentaba una encefalitis crónica y se vio que tenía coinfección con un *alphaherpesvirus* (West et al., 2013). Aunque se detectó CeMV mediante RT-PCR en pulmones, bazo, timo y ganglios linfáticos, no se pudo encontrar ninguna lesión típica de infección de morbillivirus en ninguno de estos órganos. La secuenciación del virus, confirmó que era una CeMV, sin embargo parecía una nueva cepa ya que era filogenéticamente diferente y por ello sugirieron ponerle el nombre de morbillivirus del zifio (BWMV). Esta misma secuencia se ha

encontrado también por RT-PCR en el ganglio traqueobronquial y bazo de un *P. macrocephalus* varado en la isla de Oahu, Hawai en 2011. Sin embargo tampoco encontraron lesiones típicas (West et al., 2015).

Por otro lado, se hizo un estudio retrospectivo de *D. delphis* varados en la costa del sur de California entre 1995 y 1997. En éste se vio que en los sueros de los 6 animales analizados (100%) detectaron anticuerpos frente a CeMV mediante ELISA y VN (Reidarson et al., 1998b). Además en 3 de los 6 animales (50%) amplificaron el gen P de CeMV mediante RT-PCR y la secuenciación.

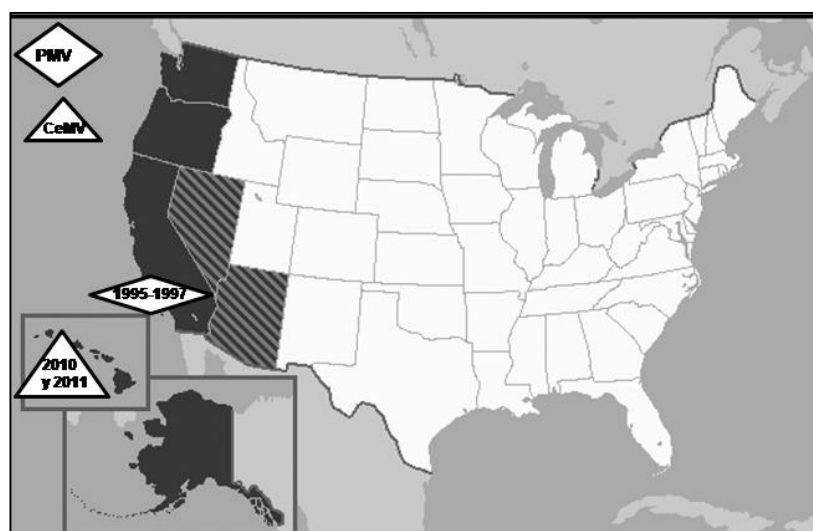


Figura 11: Mapa del Norte del Pacífico. Se representan la localización de los brotes de CeMV ocurridos a lo largo de la historia, la cepa responsable del mismo y la fecha. Fuente: Elaboración propia

3.2.3. Sudamérica

Aunque en esta zona había datos de infección por CeMV a finales de los 90, ya que se había detectado mediante serología en odontocetos gregarios de la zona de Perú, Argentina y Brasil (Van Bresse et al., 2014; Van Bresse et al., 2001b), ninguna muerte se había asociado a CeMV hasta hace muy poco. En una cría de *S guianensis* hallada muerta en Guriri, Brasil, en Noviembre de 2010, se detectó una nueva secuencia de CeMV (Groch et al., 2014) (Figura 12). Este animal apareció con marcada depleción linfocítica, neumonía intersticial y meningoencefalitis. Aunque esta especie no se la ha observado mezclándose con otras especies en esta región, se lleva bien con *Steno bredanensis*, *T. truncatus*, *Megaptera novaeangliae* y *Eubalaena australis* (Martins et al., 2001; Wedekin et al., 2004). Es por

ello que las interacciones estas especies pudieron resultar en la infección del *S. guianensis*. Estudios preliminares con IHC sugieren que CeMV podrían haber infectado a otras especies de cetáceos a lo largo de la costa brasileña (Groch et al., 2013).



Figura 12: Mapa de Sudamérica. Se representan la localización de los brotes de CeMV ocurridos a lo largo de la historia, la cepa responsable del mismo y la fecha. Fuente: Elaboración propia

3.2.4. Australasia

3.2.4.1. Asia

En esta zona se han identificado infecciones por CeMV mediante serología, RT-PCR o IHC en tres casos: en un *L. obliquidens* varado en Japón, en un *Kogia breviceps* varado en Taiwan y en un *T. aduncus* en cautividad de Taiwan (Uchida et al., 1999; Yang et al., 2006) (Figura 13). En el caso del *L. obliquidens* se diagnosticó con una encefalitis crónica producida por CeMV mientras en el *K. breviceps* se le encontró una infección sistémica aguda (Uchida et al., 1999; Yang et al., 2006). Al realizar el análisis filogenético de las P secuencias obtenidas en estos animales se vio que la encontrada en el *K. breviceps* tenía una similitud del 97,6% con DMV. En el caso de *T. aduncus* se le encontró títulos muy altos de anticuerpos frente a DMV, por lo que lo más probable es que los adquiriera cuando aún estaba en medio salvaje (Van Bressemer et al., 2001b). Aunque estos datos indican que CeMV está

presente en odontocetos del noroeste del Pacífico, aunque no se ha descrito ningún evento de mortalidades en esta zona.

3.2.4.2. Australia

Los estudios serológicos que se han realizado en esta zona indican que CeMV infecta a muchas especies de cetáceos desde las aguas del noreste de Australia, Tasmania y Nueva Zelanda y que existe la posibilidad de que sea endémico en *G.melas* y *P.electra*, con una evidencia de la circulación de CeMV en esta zona desde por lo menos 1985 (Stone et al., 2012; Van Bresse et al., 2014). En la costa del océano Indio australiano, se diagnosticó CeMV en dos *T.aduncus* que habían varado durante un evento de mortalidades en la pequeña población de aproximadamente 25 individuos en Swan River, en Australia occidental, durante junio de 2009 (Stephens et al., 2014) (Figura 13). Poco después de este evento, CeMV también se asoció a dos muertes de 2 *T. truncatus* inmaduros en Queensland, en Australia oriental (Stone et al., 2011; Stone et al., 2012) (Figura 13). Uno de ellos se encontró varado en la Isla de North Stradbroke en 2009, y el otro en la Isla de Fraser en 2010. Las secuencias obtenidas de estos dos animales se comprobó que eran DMV y que estaban filogenéticamente muy relacionadas a las secuencias obtenidas en los brotes de Europa y Estados Unidos y que ambos mostraban una infección sistémica aguda (Stone et al., 2011; Stone et al., 2012). Sin embargo en la secuencia obtenida del *T.aduncus* era diferente a las secuencias conocidas de CeMV, por lo que se clasificó como CeMV pero no se pudo definir la cepa. Además presentaba lesiones como una depleción linfoide muy severa y tenían muchas infecciones oportunistas (Stephens et al., 2014).

Entre Marzo y septiembre del 2013, se produjo otro brote de CeMV que afectó tanto a la población de *T.aduncus* y *T.truncatus* del sur de Australia (Kemper et al., 2013) (Figura 13). Los datos preliminares del análisis filogenético de las secuencias obtenidas sugieren que las cepas obtenidas de Australia oriental y sur son más parecidas que las obtenidas en Queensland (Van Bresse et al., 2014).

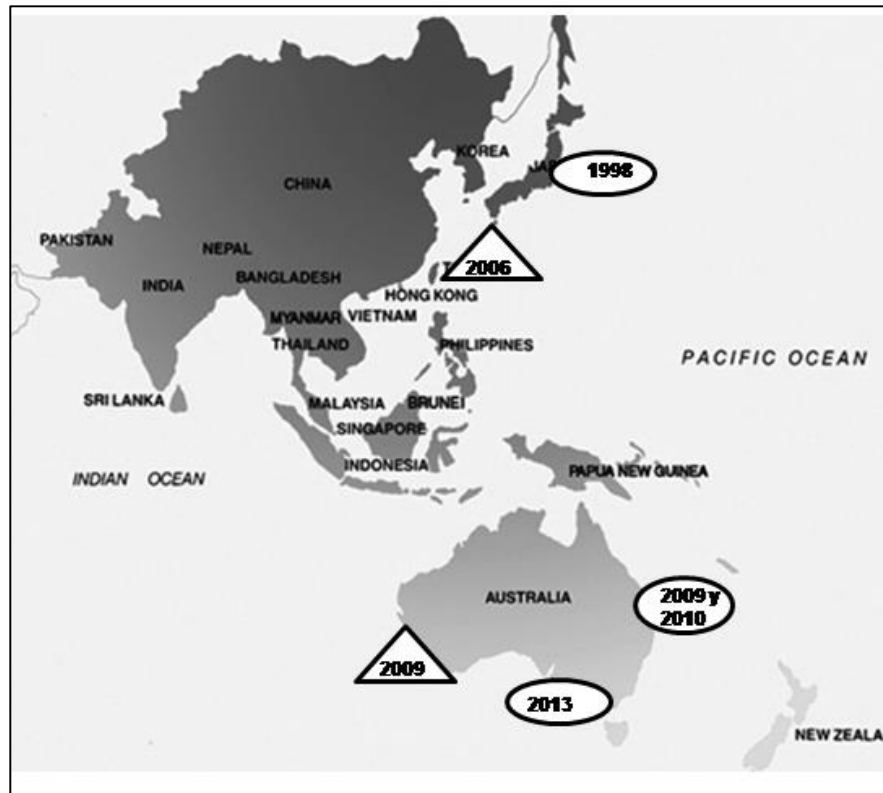


Figura 13: Mapa de Australasia. Se representan la localización de los brotes de CeMV ocurridos a lo largo de la historia, la cepa responsable del mismo y la fecha. Fuente: Elaboración propia

4. ADENOVIRUS

4.1. Características del virus

4.1.1. Etiología

Los adenovirus son virus ADN de 60-90 nm de diámetro. Se encuentran entre los virus sin envoltura más complejos que existen y poseen una cápside icosaédrica. El virión se compone de una cápside proteica que se constituye por 252 capsómeros y que representan el 87% de su peso y de un núcleo que contiene el genoma de ADN viral y 4 proteínas internas. De los 252 capsómeros, 240 son hexones (la proteína mayor de la cubierta) y 12 pentones. Los hexones se disponen conformando los lados de la superficie icosaédrica y los pentones son los que conforman los vértices (Figura 14). Por otro lado existe una glicoproteína que protruye desde el centro de cada pentón y que se llama fibra. Tanto el pentón el hexón y la fibra están formados por proteínas específicas (Tabla 3). Para que el ensamblaje se produzca correctamente se requiere de alguna de estas proteínas: IIIa, VI y VIII que están en la superficie de la cápside interna, y la IX que está en la cápside externa.

Por otro lado, el núcleo del virión está formado por ADN bicatenario de doble cadena que codifica para 30-40 genes y que tiene un tamaño de unos 35kb. Además el núcleo está conformado por las siguientes proteínas: la proteína terminal (TP) que es la el que sirve como cebador para la replicación y que además se encuentra al final del genoma, de ahí su nombre; la proteína Mu, que es la proteína pequeña transactivadora; y por último las proteínas básicas V, VII; que son similares a las histonas y por lo tanto estabilizan las hebras de ADN.

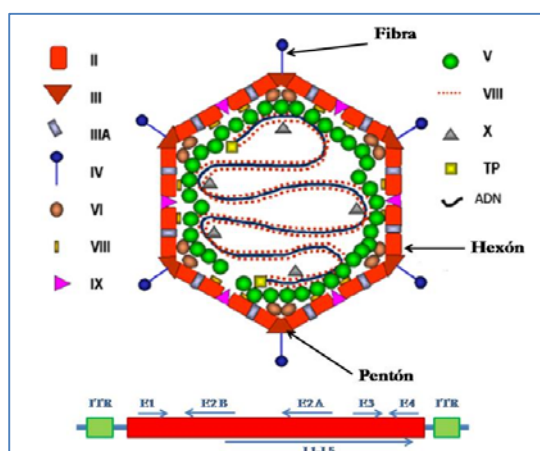


Figura 14: Estructura de Adenoviridae. Se muestran las proteínas que conforman la estructura. Hexón (Hx), pentón (Pe) y la fibra (F). El resto de proteínas marcadas se explican en la que hay a continuación (Tabla 3). Fuente: University of South Carolina.

Además el genoma viral, está flanqueado por repeticiones terminales (ITR) de unos 100-140 nucleótidos y una señal de empaquetamiento (*psi*) cerca del ITR izquierdo. Contiene una gran cantidad de genes que se agrupan en regiones tempranas (*early*) y tardías (*late*), que depende del momento en el que transcriben tras la infección. Es por ello, que las regiones tardías se transcriben tras la replicación del genoma viral y son las que contienen los genes para codificar las proteínas estructurales del virus. Mientras que las regiones tempranas se transcriben antes de la síntesis del ADN viral, y cumplen las siguientes funciones (Figura 15):

- Por un lado las proteínas codificadas en E1 incluyen a la E1, por ejemplo, que es la proteína necesaria para transactivar la transcripción de los demás genes virales y E1B 55kd que se une a E4. Además estas proteínas interfieren en las funciones de la célula huésped, como ocurre con E1A que es una oncoproteína.
- La región E2 codifica proteínas que ayudan a adenovirus, necesarias para la replicación viral: ADN polimerasa, proteína terminal...
- La región E3 codifica algunas proteínas que ayudan a adenovirus a pasar desapercibido para el sistema inmune del hospedador, como es la proteína gp19kd que inhibe la presentación del antígeno con moléculas clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad
- Por último la región E4 codifica diversas proteínas que silencian genes endógenos, regulando el transporte de ARN mensajeros fuera del núcleo.



Figura 15: Esquema del genoma de adenovirus. Se muestran en los extremos las repeticiones terminales (ITR) y las regiones tempranas (*early*) y tardías (*late*) según el orden de transcripción. Fuente: Elaboración propia.

Nombre	Localización	Función conocida
II	Monómero de hexón	Estructural
III	Base pentón	Penetración
IIIa	Asociado con base pentón	Penetración
IV	Fibra	Unión a receptor, hemoaglutinación
V	Núcleo: asociado a ADN y base del pentón	Similar a histona: empaquetamiento
VI	Polipéptido menor hexón	Estabilización/ensamblaje de partículas
VII	Núcleo	Similar a histona
VIII	Polipéptido menor hexón	Estabilización/ensamblaje de partículas
IX	Polipéptido menor hexón	Estabilización/ensamblaje de partículas
TP	Proteína terminal del genoma	Replicación de genoma

Tabla 3: Proteínas virales de Adenovirus con su localización y función correspondiente a cada una de ellas.
Fuente: Bernaola et al. 2002

4.1.2. Replicación del virus

La replicación de Adenovirus está constituida por varios pasos que son los siguientes (Figura 16):

- a) **Unión a la célula:** Este paso se basa en la unión de la fibra con receptores celulares (moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y receptores coxsackie-adenovirus (CAR)).
- b) **Internalización:** Implica la interacción del pentón con las integrinas V3 y V4. Este paso viene regulado por segundos mensajeros celulares, que a su vez favorecen la progresión del ciclo celular, y la reorganización del citoesqueleto de actina. Este último tiene un papel importante en la penetración del virus (endocitosis mediada por clatrina).
- c) **Penetración:** Este paso se da por endocitosis de vesículas que están revestidas con clatrina. La membrana de la vesícula fagocítica se rompe por la acción tóxica del pentón. Es en este momento cuando se liberan las partículas virales dentro del citoplasma, perdiendo las proteínas de la cápside y produciéndose el desnudamiento del ADN viral.
- d) **Migración:** El core migra desde el citoplasma al núcleo vía microtúbulos y el ADN viral entra al núcleo a través de los poros nucleares. El ADN viral una vez está en el núcleo se convierte en un complejo de histonas celulares- ADN viral y se inicia la replicación.

- e) **Replicación:** Este paso ocurre en el núcleo, la proteína viral (TP) actúa como cebador. Dos proteínas más codificadas por el virus participan en la replicación: AdDBP y AD ADN pol. Además hay proteínas celulares en el núcleo que participan en la replicación del genoma viral. Además se producen las siguientes proteínas de las que se ha hablado anteriormente. Por un lado las proteínas tempranas inmediatas (E1A), las proteínas tempranas (E1B, E2A, E2B, E3, E4), y por último las proteínas tardías que son las proteínas virales.
- f) **Ensamblaje del virión:** Antes del ensamblaje es cuando se sintetizan las proteínas estructurales, que son sintetizadas a partir de los genes virales tardíos, siendo los genes virales tempranos los responsables de la síntesis de productos que modifican el metabolismo celular y de los factores de virulencia. El ensamblaje ocurre en el núcleo, sin embargo empieza en el citoplasma, donde los polipéptidos individuales se ensamblan en capsómeros (hexones y pentones). Las cápsides inmaduras y vacías son ensambladas en el núcleo celular, y allí el core es formado por el ADN genómico y proteínas asociadas al core.

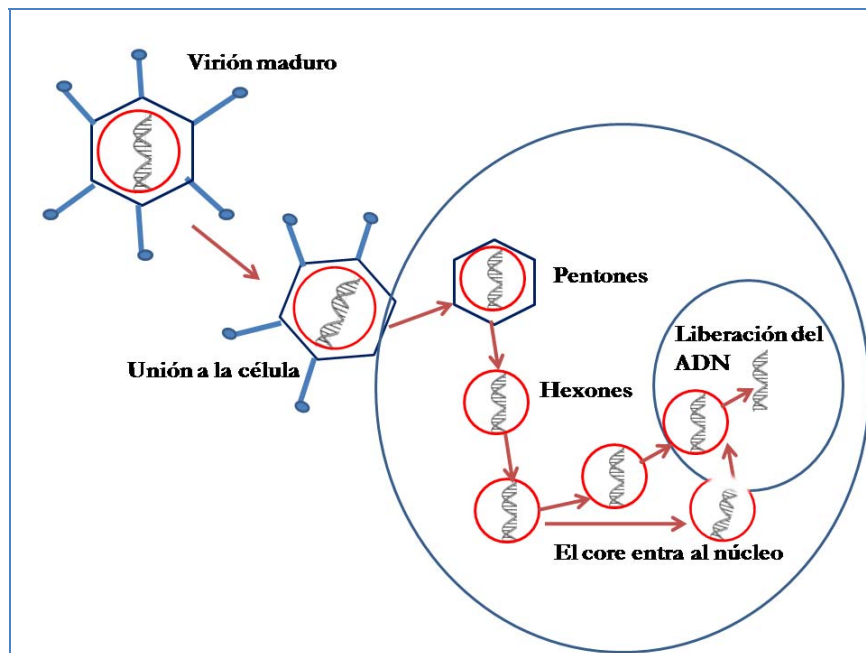


Figura 16: Esquema de la entrada de adenovirus a la célula y su posterior entrada al núcleo. Fuente: Elaboración propia.

4.1.3. Clasificación del virus

Los Adenovirus son virus ADN pertenecientes a la familia *Adenoviridae*. Se han descrito cinco géneros distintos (Figura 17):

- *Mastadenovirus*. Se encuentra en todo tipo de mamíferos (Benkö et al., 2000; Russell and Benko, 1999).
- *Aviadenovirus*. Se ha encontrado sólo en aves (Harrach, 2002).
- *Atadenovirus* (Benkö and Harrach, 1998; Both, 2002). Se ha aislado en rumiantes (Bartha, 1969; Boros et al., 1985; Dan et al., 1998; Lehmkuhl and Cutlip, 1999; Lehmkuhl et al., 2001), aves (Harrach et al., 1997; Hess et al., 1997), serpientes (Benko et al., 2002; Farkas et al., 2002; Marschang et al., 2003) y un marsupial (Thomson et al., 2002).
- *Siadenovirus*. Encontrado solamente en una rana (Davison et al., 2000) y en aves de corral (Pitcovski et al., 1998).
- *Ichadenovirus*. Descrito muy recientemente al ser aislado en esturiones (Kovacs et al., 2003).
- Recientemente se ha descrito un posible sexto género, que lo han llamado *Testadenovirus*, porque se ha aislado en tortugas del orden *Testudines* (Doszpoly et al., 2013).

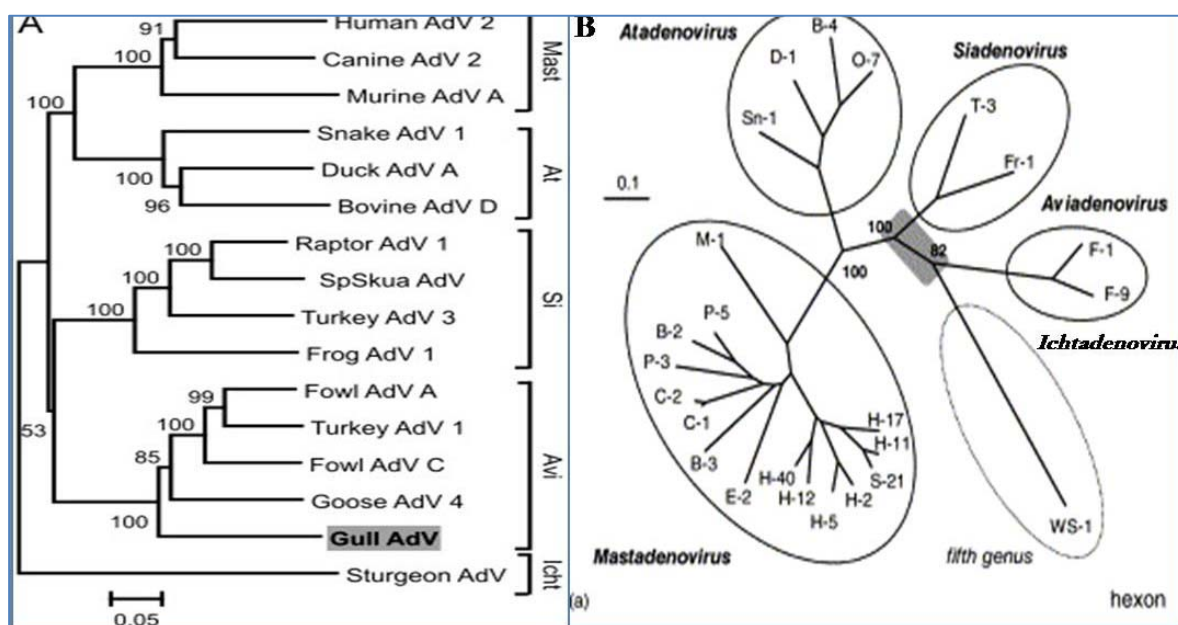


Figura 17: Análisis filogenético de las secuencias parciales del gen del hexón (A) árbol filogenético por el método neighbour-joining que representa distintas secuencias de los 5 géneros de la familia Adenoviridae (Bodewes et al., 2013); (B) Árbol filogenético sin raíces por el método maximum likelihood en el que se representan 24 secuencias de los 5 géneros de adenovirus Fuente: (Kovacs et al., 2003)

4.1.4. Patogénesis

La patogénesis de los adenovirus está muy bien descrita en la especie humana y por ello se relata a continuación. Los adenovirus se transmiten por contacto directo, por vía feco-oral, por vía inhalatoria y por último se ha descrito en algunos casos a través de aguas estancadas. Tiene predilección por las células epiteliales, y esto conlleva que afecte a casi todas las mucosas. Se han descrito 3 tipos de interacciones entre el adenovirus y las células huésped (Mandell et al., 2000):

- Infección lítica: se da el ciclo replicativo completo. Se producen entre 10000 y 1000000 de virus por célula, de los cuales 1-5% son infecciosos. Se dan en células epiteliales (Hogg, 2000; Keicho et al., 1997; Singh-Naz and Rodriguez, 1996).
- Infección latente: es una infección crónica y se da principalmente en células linfoides. Está descrita la reactivación del virus en individuos inmunodeprimidos. Esta infección latente produce la transcripción de factores que favorecen la producción de citoquinas inflamatorias (IL8, ICAM, FNT alfa), con la consiguiente amplificación del proceso inflamatorio a dicho nivel.
- Transformación oncogénica: por otro lado los adenovirus son capaces de inducir a las células quiescentes a entrar en fase S del ciclo replicativo e inhibir la apoptosis de las células huésped (Hogg, 2000). Algunos productos de los genes tempranos virales inhiben a los antioncogenes. El ADN viral es aparentemente integrado y replicado con el ADN celular, no se producen viriones infecciosos.

4.1.5. Adenovirus en especies no marinas

Los adenovirus se habían considerado virus específicos de especie, que coevolucionaban con el hospedador (Harrach et al., 2011). De hecho como se ha dicho anteriormente tanto *Mastadenovirus* y *Aviadenovirus* solo se encuentran en mamíferos y aves respectivamente. Sin embargo, se ha visto un salto de especie entre hospedadores relacionados como el tití adenovirus-1 (TMAdV-1), en el que se demostró que una población de titís con este virus que presentaba problemas respiratorios severos, se lo pasó a los humanos que trabajaban con ellos (Chen et al., 2011). Los adenovirus se han descrito en todo tipo de especies, desde humanos hasta esturiones. Sin embargo en cada una de estas especies se presenta de una manera distinta.

En humanos existen 7 especies con 67 tipos de adenovirus. Se ha asociado a brotes de enfermedad respiratoria en barracones militares (Ecker et al., 2005; Gray et al., 2000), también

puede producir gastroenteritis en niños (Matsushima et al., 2013; Yolken et al., 1982), conjuntivitis (Jawetz, 1959), cistitis e incluso sarpullidos. En algunos casos la morbilidad y mortalidad es muy alta, estando asociado también a hepatitis fulminante, neumonía y encefalitis en pacientes inmunocomprometidos.

Los perros se ven afectados por dos tipos de adenovirus, el tipo 1 (CAV-1) y el 2 (CAV-2), causando la hepatitis infecciosa canina, una enfermedad que es potencialmente mortal y que produce vasculitis y hepatitis (Murphy et al., 1999). CAV-1 también les puede producir infecciones respiratorias y oculares. Sin embargo CAV-2 es uno de los causantes potenciales de la tos de las perreras.

Los adenovirus también pueden causar infecciones respiratorias en caballos (Cavanagh et al., 2012; Giles et al., 2010), ganado vacuno (Roshtkhari et al., 2012), cerdos, ovejas y cabras (Murphy et al., 1999). Equine adenovirus 1 puede producir una infección fatal en potros inmunodeprimidos, dando lugar a neumonía y destrucción de la glándula pancreática y salivar.

En las tupayas, se ha aislado el Tupaia adenovirus 1. Los adenovirus de los *Galloanserae* (Fowl adenovirus) están asociados con distintas manifestaciones de la enfermedad en Galloanserae domésticos como la hepatitis, el síndrome del hidropericardio, el síndrome de la caída del huevo, bronquitis de la codorniz, y otras formas respiratorias (Kumar et al., 2010). Recientemente adenovirus se ha aislado en milanos negros salvajes (*Milvus migrans*).

En reptiles, se han aislado en varias tortugas de tierra, en serpientes.. pero no se conoce la implicación del virus en procesos patológicos (Wellehan et al., 2004).

En peces se ha conseguido aislar adenovirus en esturiones (Sturgeon adenovirus 1) dando lugar a un género nuevo *Ichtadenoviridae* (Bodewes et al., 2013).

Además, adenovirus se ha conseguido aislar en murciélagos *Myotis* y *Scotophilus kublüi* en China (Chen et al., 2012), dando lugar a Bat adenovirus TJM, que es una especie del género *Mastadenovirus*, que están filogenéticamente relacionados a los adenovirus de los perros y de la tupaya (Kohl et al., 2012; Li et al., 2010; Raut et al., 2012).

4.2. Adenovirus en mamíferos marinos

En mamíferos marinos, los adenovirus se han detectado en leones marinos de California (Goldstein et al., 2011; Inoshima et al., 2013). En estudios serológicos, encontraron en leones marinos de Steller (*Eumetopias jubatus*) y en morsas (*Odobenus rosmarus*) presencia de anticuerpos frente a CAV-1 y CAV-2 (Burek et al., 2005; Philippa et al., 2004). En cambio los primeros reportes de enfermedad por adenovirus en leones marinos de California (*Zalophus californianus*) fue a finales de los 70, pero sin identificación genética del virus. Debido a similitudes en la morfología del virus y la presentación clínica, se pensó que CAV-1 podría ser el agente etiológico de las hepatitis de estos animales (Britt Jr. et al., 1979).

Sin embargo fue en 2011, cuando se obtuvieron por vez primera secuencias de adenovirus en leones marinos. Al examinar los tejidos de dos leones marinos de California que habían varado vivos y muerto al poco tiempo en un centro de recuperación, y que eran sospechosos de infección por adenovirus, confirmaron la sospecha. El primer caso era un animal varado en 2003 que presentaba arteritis severa, neumonía intersticial y hemorragia pulmonar asociada a infección parasitaria. La presencia de cuerpos de inclusión eosinofílicos en el endotelio venoso en distintos órganos como pulmón, ganglio linfático mediastínico, bazo y ojo sugirió la infección por adenovirus. En el segundo caso, que varó en el 2008, y que presentaba una hepatitis necrotizante viral severa con cuerpos de inclusión eosinofílicos en los hepatocitos. En ambos casos se realizó microscopía electrónica y detección por PCR y posterior secuenciación. El adenovirus que se pudo aislar de estos animales era un virus perteneciente al género *Mastadenovirus* pero diferente a CAV-1. A este virus se le llamó California sea lion adenovirus-1 (CSLAdV-1) (Goldstein et al., 2011).

En 2012, en un acuario de Japón tres especies distintas de otáridos, un león marino de California (*Zalophus californianus*), un lobo marino de Sudáfrica (*Arctocephalus pusillus*), y un león marino de Sudamérica (*Otaria flavescens*), mostraron diarrea y estaban sumamente abatidos, muriendo los tres en un periodo de tres días. Los tres animales tenían los niveles de alanina amino transferasa (ALT) y aspartato amino transferasa (AST) elevados en suero. Se encontró una hepatitis necrótica con presencia cuerpos de inclusión intranucleares eosinofílicos en los hepatocitos del hígado y en las células epiteliales intestinales del león marino sudamericano. En los tres animales se detectó CSLAdV-1 por PCR y posterior secuenciación, y se pudo comprobar que la secuencia era la misma en los tres animales y al brote de 2011 (Inoshima et al., 2013).

Respecto a la secuencia aislada en estos dos brotes, recientemente se ha obtenido el genoma completo de CSLAdV-1. Se ha podido comprobar que es un *Mastadenovirus* aunque tiene muy poco porcentaje de GC (37%) que esto es una característica de los *Atadenovirus*. Sin embargo con el árbol filogenético no se puede precisar el sitio exacto que le corresponde en el árbol a CSLAdV-1, pero sí que observan que se encuentra cerca de la raíz del árbol de los adenovirus laurasiaterianos (Figura 18). Además el análisis filogenético del genoma les hace hipotetizar sobre la posibilidad de un salto de hospedador, por una serie de incongruencias entre la secuencia y el huésped (Cortes-Hinojosa et al., 2015) y por el porcentaje tan bajo de GC que se ha visto que está relacionado con el salto de hospedador (Wellehan et al., 2004). Se necesitarían más secuencias que procedan de otros mamíferos marinos para poder ubicar correctamente a CSLAdV-1 en el árbol.

El problema es que solo se han podido aislar adenovirus de muestras gastrointestinales en otros mamíferos marinos incluyendo un rorcual norteño (*Balaenoptera borealis*) (Smith and Skilling, 1979), en dos ballena boreales (*Balaena mysticetus*) (Smith et al., 1987) y en una beluga (*D. leucas*) (De Guise et al., 1995). Sin embargo en estos animales no se pudo asociar la enfermedad con la presencia del virus. Por otro lado existe publicada en GenBank una secuencia parcial de la polimerasa de adenovirus obtenida de una marsopa común (*Phocoena phocoena*). Pero no existe ninguna publicación asociada a esta secuencia por lo que carecemos de más información.

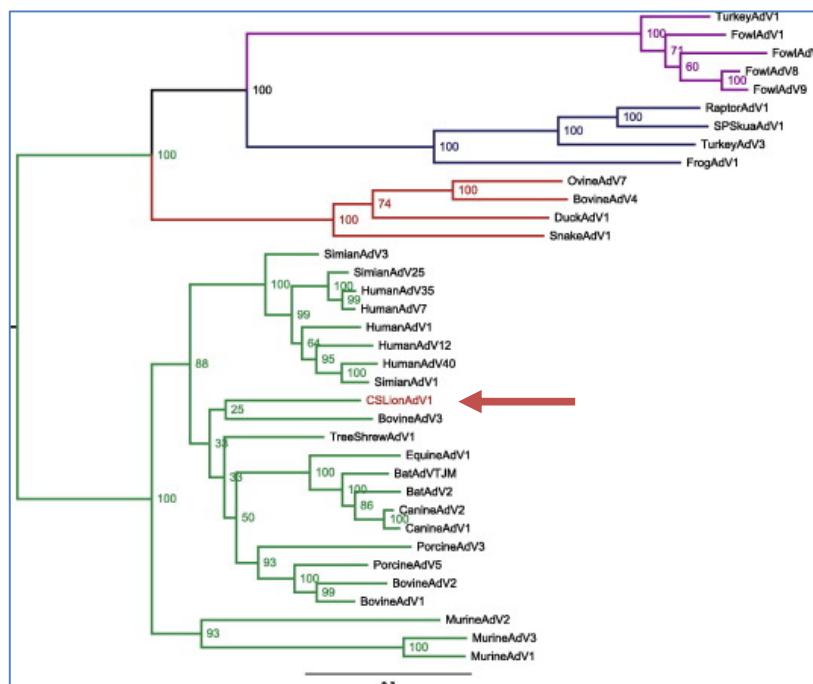


Figura 18: Árbol filogenético por el método maximum likelihood que representa la relación de CSLAdV-1 con representantes de cada uno de los géneros (excepto Ichtadenovirus) de la familia Adenoviridae. Fuente: (Cortes-Hinojosa et al., 2015)

CAPÍTULO II:



JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN

1. Enfermedades emergentes y re-emergentes

1.1. Morbillivirus de los cetáceos (CeMV)

Debido a que morbillivirus de los cetáceos (CeMV) es uno de los virus más letales que existen en cetáceos y que además la costa mediterránea española es una zona de alto riesgo por los dos brotes de CeMV ocurridos desde 1990, esta fue la principal razón por la que se decidió que esta tesis doctoral se centrara en este virus. Aunque es el virus en cetáceos más estudiado hasta el momento, siguen sin conocerse el origen de los brotes, ni la epidemiología de los mismos.

Por otro lado, al comenzar esta tesis doctoral había una clara deficiencia en las técnicas de diagnóstico para la detección de este virus, ya que se seguían utilizando las técnicas convencionales que tenían una baja sensibilidad (Barrett et al., 1993; Reidarson et al., 1998b). Existía una técnica molecular a tiempo real pero desde su publicación no se había utilizado porque es poco asequible y además no detecta las tres cepas de CeMV (Grant et al., 2010). Por todo ello, nos centramos en el diseño y evaluación de una técnica molecular que fuera asequible, sensible, específica y que detectara las tres cepas.

Aunque desde el 2007 no se detectaba ningún brote en el Mediterráneo, sí que había informaciones de animales positivos entre periodos interepizoóticos en los que se había encontrado el virus acantonado en cerebro (Soto et al., 2011). En esta zona sólo se realizaba el diagnóstico de CeMV en aquellos animales en los que se observaban lesiones compatibles con el virus o se sospechaba por el incremento del número de varamientos. Teniendo en cuenta que la severidad de las lesiones y las cargas virales habían decrecido en el brote del 2007 con respecto al de 1990 (Raga et al., 2008), las lesiones de los animales positivos era cada vez menos obvias. Es por ello, que el seguimiento epidemiológico de esta enfermedad **en todos los animales** varados en esta zona es importante para poder entender mejor la enfermedad y además poder detectar, si lo hubiera, un nuevo brote. Para este seguimiento epidemiológico era necesario utilizar las técnicas adecuadas (sensible y específica) para poder realizar un diagnóstico fiable del virus.

Por todo lo anteriormente expuesto, es necesario, por un lado de la mejora en la detección de CeMV a través de técnicas moleculares a tiempo real que puedan detectar las tres cepas

simultáneamente, e implementarlas en el diagnóstico rutinario. Además el seguimiento epidemiológico de los animales varados en el Mar Mediterráneo español es muy importante para poder entender mejor el origen de los brotes y su comportamiento en las distintas poblaciones del Mediterráneo tanto en periodos de brote como en periodos interepizooticos.

1.2. Nuevos virus: Adenovirus

Hasta el momento solo se conocen unos pocos virus en los cetáceos, tal y como se ha comentado en la introducción. A lo largo de la historia se han asociado sintomatologías clínicas o lesiones a virus por su parecido en otras especies (Kennedy, 2001). Sin embargo, en casi ningún virus se ha realizado su aislamiento viral o su detección por técnicas moleculares (Kennedy, 2001). Esto es un gran problema porque en humanos, por ejemplo, se conocen cientos de virus, sin embargo en cetáceos no llega a la decena, y de estos sólo unos pocos están bien descritos. Es por ello, la necesidad de la detección de virus desconocidos, que pueden estar en estos animales pero que nadie los ha descrito hasta el momento.

La detección de virus desconocidos se basa en la vigilancia de posibles sintomatologías o lesiones sospechosas en estos animales. En el caso de sintomatología, esto será mucho más sencillo realizarlo en animales en cautividad, ya que los animales salvajes que llagan a la costa son la mayoría carcasas. Sin embargo, en los cetáceos salvajes serán las lesiones las que nos hagan sospechas de nuevos virus.

Respecto a adenovirus, es un virus que se ha caracterizado por primera vez muy recientemente en mamíferos marinos, en leones marinos salvajes y en cautividad (Goldstein et al., 2011; Inoshima et al., 2013). No se conoce el origen del virus pero se piensa que podría estar en el agua marina. Además las únicas descripciones de adenovirus en cetáceos habían sido por detecciones de partículas virales de este virus en hisopos y/o biopsias gastrointestinales (De Guise et al., 1994; Smith and Skilling, 1979; Smith et al., 1987). Es por ello que, ante sintomatología parecida a la de leones marinos (diarrea, vómitos anorexia y muerte por hepatitis) en los cetáceos deberían ser sospechosos de esta enfermedad, ya que si está en el agua de mar, probablemente sufran también esta enfermedad aunque no haya sido descrita hasta el momento.

Por todo lo anteriormente contado, la observación de la sintomatología clínica o las lesiones de animales salvajes o en cautividad nos podrían revelar información sobre posibles nuevas enfermedades causadas por virus. En el caso de adenovirus, sabiendo que las pocas veces que se

había descrito en cetáceos se encontraba en el sistema digestivo y que en los leones marinos cursaba con gastroenteritis, se dio importancia a este sistema para la observación y vigilancia del virus. Es por todo esto la importancia de poder asociar a este virus con una patología y así poder introducirlo en el diagnóstico diferencial. Además, permitiría el estudio del virus, conocer el comportamiento del mismo en estos animales, y por último su aislamiento y secuenciación permitiría conocer el posible origen de la infección.

Por ello nos centramos en los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido un mayor conocimiento de dos de las enfermedades emergentes y reemergentes de los cetáceos (morbillivirus de los cetáceos y adenovirus) para así contribuir a la mejora del conocimiento sobre la sanidad marina. Dentro de este objetivo principal tenemos los siguientes objetivos concretos:

Objetivo 1: Avance en el conocimiento de morbillivirus de los cetáceos (CeMV). Este objetivo se subdivide en varios subobjetivos:

Subobjetivo 1.1.: Desarrollo y evaluación de nuevas técnicas de diagnóstico para la detección rápida, sensible y específica de las tres cepas de CeMV.

Subobjetivo 1.2.: Actuación y detección ante un brote de CeMV y profundizar en los posibles orígenes del brote.

Subobjetivo 1.3.: Seguimiento epidemiológico de CeMV en los cetáceos varados en las costas mediterráneas en periodos interepizooticos.

Objetivo 2: Identificación de nuevos virus en cetáceos. Adenovirus: clínica, diagnóstico, filogenia y aislamiento viral.

CAPÍTULO III



RESULTADOS

Objetivo 1:

Avance en el conocimiento de morbillivirus de los cetáceos (CeMV)



Fuente: <http://www.ciberdroide.com/wordpress/los-sonares-militares-son-los-causantes-de-varamientos-masivos-de-cetaceos/>

Subobjetivo 1.1.: Desarrollo y evaluación de nuevas técnicas de diagnóstico para la detección rápida, sensible y específica de las tres cepas de CeMV.

Ante la falta de estandarización de los métodos de diagnóstico de CeMV utilizados en los diferentes brotes se ha adaptado un método distinto. Se ponía de manifiesto la necesidad de una técnica que aunara todas las características que ha de tener una buena técnica de PCR.

Por ello, en este subobjetivo se diseñó una rt RT-PCR muy sensible y específica para la detección rápida y simultánea de las tres cepas de CeMV. Esta técnica está formada a su vez por dos PCRs, con sus respectivos cebadores y una sonda de hidrólisis comercial para cada PCR que proceden de la librería universal de sondas (UPL) (Roche), que amplifican la zona altamente conservada del gen de la proteína de fusión. Esta RT-PCR realiza con la misma muestra las dos PCRs en paralelo con sus respectivos cebadores y sonda ya que una de las PCR detecta las cepas virulentas (DMV y PMV); y la otra PCR detecta la cepa menos común PWMV. Ambas PCRs tienen las mismas temperaturas por lo que aunque el mix es distinto, de una vez obtendremos los resultados de las tres cepas. Los análisis de sensibilidad realizados a partir de muestras purificadas y diluidas de DMV, PMV y PWMV mostraron que los límites de detección del ARN viral con la UPL RT-PCR fueron más bajos que con las PCRs convencionales publicadas hasta el momento. Además con esta técnica se vio que no había ninguna señal de amplificación cuando se utilizaban muestras positivas a virus relacionados con CeMV como es PDV, y positivas a otros virus de cetáceos como herpesvirus o papilomavirus. Además esta UPL RT-PCR se verificó usando muestras que habían sido previamente analizadas por métodos convencionales, y también con un conjunto de muestras clínicas sospechosas de ser positivas a CeMV.

Todos estos resultados sugieren que esta nueva UPL RT-PCR es más sensible y específica que los métodos convencionales, y que esta podría ser una técnica asequible y rápida en el diagnóstico rutinario de las tres cepas de CeMV.

Artículos científicos:

- ❖ Rubio-Guerri, C.; Melero, M., Rivera-Arroyo, B., Bellière, EN.; Crespo, JL.; García-Párraga, D.; Esperón, F.; Sánchez-Vizcaíno, JM. (2013) **Simultaneous diagnosis of Cetacean morbillivirus infection in dolphins stranded in the Spanish Mediterranean sea in 2011 using a novel Universal Probe Library (UPL) RT-PCR assay.** *Veterinary Microbiology*, 165: 109-114

Ponencias en congresos:

- ❖ Rubio-Guerri, C.; Melero, M.; Esperón, F.; Bellière, EN; Arbelo, M.; Crespo, JL.; Sierra, E.; García-Parraga, D.; Sánchez-Vizcaíno, JM. (2012) **Morbillivirus: health evaluation of stranded cetaceans in Spanish Mediterranean Sea during 2011.** IX international congress of veterinary virology and joint meeting with the European Society of Clinical Virology. Madrid, Spain. 4-7 Septiembre, 2012.



Simultaneous diagnosis of Cetacean morbillivirus infection in dolphins stranded in the Spanish Mediterranean sea in 2011 using a novel Universal Probe Library (UPL) RT-PCR assay

Consuelo Rubio-Guerri^{a,*}, Mar Melero^a, Belén Rivera-Arroyo^a, Edwige Nina Bellière^b,
Jose Luis Crespo^{a,c}, Daniel García-Párraga^c, Fernando Esperón^b,
Jose Manuel Sánchez-Vizcaíno^a

^a VISA VET Center and Animal Health Department, Veterinary School, Complutense University of Madrid, Avda. Puerta del Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

^b National Institute for Agricultural and Food Research and Technology, Ctra. de Algete a El Casar s/n, 28130 Madrid, Spain

^c Veterinary Services, Oceanographic Aquarium of the Ciudad de las Artes y las Ciencias, C/Junta de Murs i Valls s/n, 46023 Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 October 2012

Received in revised form 21 December 2012

Accepted 22 December 2012

Keywords:

Cetaceans

Pilot whale morbillivirus (PWMV)

Porpoise morbillivirus (PMV)

Dolphin morbillivirus (DMV)

Universal Probe Library

Fusion protein gene

ABSTRACT

A highly sensitive and specific real-time (rt) RT-PCR assay has been developed for rapid, simultaneous detection of three strains of cetacean morbillivirus (CeMV). In this assay, two PCR primers and a hydrolysis probe from a commercially available Universal Probe Library (UPL) are used to amplify a highly conserved region within the fusion protein gene. RT-PCR is carried out on the same sample using two primer sets in parallel: one set detects the more virulent strains, dolphin morbillivirus (DMV) and porpoise morbillivirus (PMV), and the other set detects the least virulent and least common strain, pilot whale morbillivirus (PWMV). Sensitivity analysis using dilute samples containing purified DMV, PMV and PWMV showed that viral RNA detection limits in this UPL RT-PCR assay were lower than in a conventional RT-PCR assay. Our method gave no amplification signal with field samples positive for viruses related and unrelated to CeMV, such as phocine distemper virus (PDV). The reliability and robustness of the UPL RT-PCR assay were verified using tissue samples previously analyzed by conventional methods, as well as a panel of clinical samples suspected of containing CeMV. Using the UPL RT-PCR assay, we were able to associate DMV with a mass stranding of striped dolphins in the Spanish Mediterranean in 2011 with greater reliability than was possible with a conventional RT-PCR method. These results suggest that this UPL RT-PCR method is more sensitive and specific than the conventional approach, and that it may be an affordable and rapid test for routine diagnosis of three CeMV strains.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cetacean morbillivirus (CeMV) is an enveloped, negative-strand RNA virus of the genus *Morbillivirus* (family Paramyxoviridae) (Kennedy, 1998). Over the last 25 years, CeMV has caused outbreaks of serious diseases affecting

the upper respiratory tract and central nervous system (CNS) in marine mammals, ultimately leading to numerous strandings and deaths. The first such epizootic was reported in 1987–88 off the Atlantic coast of the USA (Lipscomb et al., 1994), in which the virus killed an estimated 50% of the population of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). Subsequent epizootics in the Mediterranean and the Gulf of Mexico killed, respectively, approximately 1000 striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) (Aguilar and Raga, 1993) and 100 Atlantic bottlenose dolphins (Krafft et al., 1995; Lipscomb et al.,

* Corresponding author. Tel.: +34 913943702; fax: +34 913943908.
E-mail addresses: consuelo@sanidadanimal.info,
crubioguerri@gmail.com (C. Rubio-Guerri).

1994). The last documented outbreak of CeMV infection occurred in the Mediterranean Sea in 2007, when approximately 100 striped dolphins died (Fernandez et al., 2008; Raga et al., 2008). Since the initial report of CeMV, three main viral strains have been identified: dolphin morbillivirus (DMV) (Domingo et al., 1990) and porpoise morbillivirus (PMV) (Kennedy, 1998), which cause mass mortality; and pilot whale morbillivirus (PWMV) (Bellière et al., 2011; Taubenberger et al., 2000), which is considered less virulent and has been reported in only a few individuals so far.

In March–April 2011, 26 striped dolphins, 3 bottlenose dolphins and 8 dolphins of unknown species stranded along the Valencian Mediterranean coast of Spain. This stranding of 37 animals in only two months far exceeded the normal stranding rate of 28.4 dolphins/year on this coast (Gozalbes et al., 2010). Since DMV had caused dolphin mass mortality episodes in this region in 1990 and 2007, we suspected that this spike in stranding/mortality might be associated with CeMV. Given the risk that this spike was part of a larger mass-mortality episode, we wanted to be able to use a rapid, highly sensitive and specific laboratory assay to test for all CeMV strains simultaneously (Rubio-Guerri et al., 2012). However, although laboratory diagnosis of CeMV has evolved from serological detection to conventional reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) (Barrett et al., 1993; Lipscomb et al., 1996; Reidarson et al., 1998), standard assays do not allow for simultaneous detection of multiple CeMV strains and they are not always reliable. A recently developed real-time (rt) RT-PCR assay offers the highest accuracy, sensitivity and specificity so far for detecting DMV and PMV (Grant et al., 2009), but it has not yet been validated for PWMV.

We now report a highly sensitive, multi-typing rt RT-PCR method based on the Universal Probe Library (UPL) platform, which is a commercial library (Roche) of short hydrolysis-locked nucleic acid probes labeled on the 5' end with 6-carboxyfluorescein (FAM) and on the 3' end with dark quencher. We applied this approach to primers targeting highly conserved sequences within the CeMV fusion protein gene *F* to make an assay allowing rapid, inexpensive, simultaneous, highly sensitive and specific detection of DMV, PMV, and PWMV. We show that this method is more sensitive for CeMV than the widely used conventional RT-PCR assay. As further validation of our method, we used it to associate DMV with a dolphin stranding episode on the Valencian coast with greater reliability than was possible with the conventional RT-PCR assay. Thus our UPL RT-PCR assay may help improve molecular diagnosis of CeMV.

2. Materials and methods

2.1. RNA extraction and tissues used

Test samples were 37 tissues from 9 necropsied striped dolphins from the stranding in March–April 2011 on the Valencian coast (Rubio-Guerri et al., 2012). Samples were homogenized at 4 °C in 10 volumes of phosphate-buffered saline (PBS) using a Dounce glass homogenizer. A volume

of 0.15 mL homogenate was used for RNA isolation in 60 µL of RNase-/DNase-free water using the NucleoSpin RNA II Kit (Macherey-Nagel). As positive controls, RNA was extracted from cetacean tissues known to be infected with DMV, PMV or PWMV based on the standard conventional RT-PCR assay and amplicon sequencing (Barrett et al., 1993; Reidarson et al., 1998). These control tissues came from the collection of the Animal Health Research Centre (AHRC), CISA-INIA, Madrid. Specificity testing was carried out using clinical samples infected with phocid distemper virus (PDV), dolphin herpesvirus (HeV), *T. truncatus* papillomavirus type 1 (TtPV1), and *Delphinus delphis* papillomavirus type 1 (DdPV1), all of which were provided by Dr. Ignacio G. Bravo (Catalonian Institute of Oncology, Barcelona, Spain), the AHRC-CISA-INIA (Madrid) and the Oceanographic Aquarium of the Ciudad de las Artes y las Ciencias (Valencia, Spain).

2.2. Primers and probes for UPL RT-PCR detection of CeMV

We used RT-PCR as previously described (Buh Gasparic et al., 2008) to amplify the *F* gene in the positive control samples (Section 2.1), and we compared these sequences with CeMV *F* sequences deposited in Genbank (accession nos. HQ829972, HQ829973, FJ842382.1, NC_005283.1 and AJ608288.1) using MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007). This allowed us to define a 71-nt sequence within the *F* gene suitable for PCR amplification of DMV and PMV without amplification of PWMV, and a 74-nt sequence suitable for amplifying PWMV but not DMV or PMV (Table 1). Simultaneous detection of DMV and PMV was achieved using the amplification primer pair DMV-UPL25-F and DMV-UPL25-R and the hydrolysis probe UPL#25, collectively referred to hereafter as the “DMV/PMV probe set” (Table 1). The amplification primer pair PWMV-UPL92-F/PWMV-UPL92-R and the hydrolysis probe UPL#92, referred to as the “PWMV probe set”, were used to detect PWMV only (Table 1). Amplification primers and hydrolysis probes were designed using Probe Finder software (www.universalprobelibrary.com, Roche) and synthesized by Roche.

2.3. RT-PCR assays

Each sample was subjected to parallel rt RT-PCR amplifications using the DMV/PMV or PWMV probe sets; amplifications were performed in 48-well microtiter plates in an Eco Real-Time PCR System (Illumina) fitted with a FAM filter. The reaction mixtures contained 1.5 µL of an appropriate dilution of RNA solution, 0.4 µL of each reverse and forward primer (both 5 µM), 0.2 µL of corresponding UPL probe (10 µM), 5 µL of KAPA PROBE FAST PCR Master Mix, 0.2 µL of RT KAPA SYBR FAST One-Step qRT-PCR Polymerase (both from Kapa Biosystems, Woburn, MA, USA), and 2.7 µL of water. The PCR protocol consisted of 15 min at 42 °C, 5 min at 95 °C and 40 cycles of 3 s at 95 °C and 30 s at 60 °C, after which the tubes were cooled to 4 °C.

The benchmark assay with which we compared our UPL RT-PCR approach was the conventional RT-PCR method (Barrett et al., 1993; Reidarson et al., 1998). In this conventional method, a set of universal Morbillivirus

Table 1
Primers and probes used for real-time amplification of CeMV RNA.

Virus	Primer/probe name	Sequence (5'–3')	Genomic position (nt)	Amplicon size (nt)
DMV and PMV	DMV-UPL25-F	TCTAGAGAATGTCAGGAGAAGTTCC	511–535 ^a	71
	DMV-UPL25-R	AAGCTCCTGCACATACAAGGAT	560–581 ^a	
	UPL#25	6FAM-TGAGGAG-dark quencher dye (Roche cat no. 04686993001)	537–544 ^a	
PWMV	PWMV-UPL92-F	GGAGGGGCAATGTATATAGGG	260–280 ^b	74
	PWMV-UPL92-R	CAGCAGTATATCAACACGCATAGA	310–333 ^b	
	UPL#92	6FAM-CAGGAGCC-dark quencher dye (Roche cat no. 04692098001)	294–302 ^b	

UPL, Universal Probe Library; FAM, 6-carboxyfluorescein.

^a Based on the numbering for dolphin morbillivirus *F* mRNA for envelope glycoprotein (GenBank accession no. Z30086.1).

^b Based on the numbering for the partial cds of the genes encoding the fusion protein and hemagglutinin protein of cetacean morbillivirus strain 20E (GenBank accession no. FJ842382.1).

primers (Barrett et al., 1993; Krafft et al., 1995) are used to PCR-amplify a 429-nt region of the phosphoprotein gene *P*. The amplicons are then sequenced and the virus is identified by comparing these sequences with those in Genbank (DMV, accession no. AJ608288; PMV, HQ829972.1; PWMV, FJ842382).

2.4. Generating RNA standards for copy number quantification in the UPL RT-PCR assay

RT-PCR reactions were carried out using positive control samples (Section 2.1) and appropriate primer pairs (Table 1) to generate the target 71- and 74-nt genomic fragments as double-stranded DNA. Amplicons were purified using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) and cloned into the pGem-T Vector System I (Promega). The corresponding recombinant plasmids were amplified in *E. coli* and purified using the QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). The correct identity of the inserted fragment was confirmed by sequencing. Plasmids were linearized with *Nco*I (Promega) and used as templates for T7 promoter-driven transcription using the Riboprobe[®] SP6/T7 System (Promega). Transcripts were purified on RNeasy columns (Qiagen) and quantified in triplicate based on UV absorption (NanoDrop 1000, Thermo Scientific). RNA copy number was estimated using the equation:

$$\text{copies RNA}/\mu\text{L} = 6.022 \times 10^{17} \times (\mu\text{g RNA}/\mu\text{l})/(\text{nt transcript length} \times 340). \quad (1)$$

RNA transcripts were diluted in RNase-/DNase-free water to yield stock solutions containing 10⁹ copies/μL of DMV/PMV target sequence or 10¹⁰ copies/μL of PWMV target sequence. These stocks were stored at –80 °C until use.

The UPL RT-PCR assay was performed using 10-fold serial dilutions of the synthesized target RNAs, such that the copies per assay ranged from 0 to 10⁸. Three independent runs were performed in order to construct semilogarithmic standard curves in which threshold cycle (Ct) values were plotted as a function of the logarithm of the RNA copy number per assay. This plot allowed estimation of the amplification efficiency, defined as

$$E = -1 + 10^{(-1/k)} \quad (2)$$

where *E* is efficiency and *k* is the slope of the linear regression line (Ginzinger, 2002; Pfaffl, 2001). An efficiency of 1 corresponds to 100% of the theoretical maximal efficiency of PCR amplification.

3. Results

3.1. Analytical specificity and assay design

During optimization of the UPL RT-PCR assay, we tested several reagents, reagent concentrations and DNA polymerases (data not shown), and we found that the combination of KAPA PROBE FAST PCR Master Mix and RT KAPA SYBR FAST One-Step qRT-PCR Polymerase gave the highest sensitivity. Using these reagents and the DMV/PMV probe set, we obtained a clear fluorescent signal with 0.01 ng RNA of the positive control samples for DMV and PMV after only 18–21 amplification cycles (Fig. 1A and B), but not with the same amount of RNA of the PWMV positive control (Fig. 1C). Conversely, when we repeated the analysis with the PWMV probe set, responses were negative for the DMV and PMV positive controls, but we observed a clear fluorescence signal with 0.01 ng RNA of the PWMV positive control after 22 cycles of amplification (Fig. 1C).

Although BLAST searches using our target sequences to query the genomes of other viruses, including complete and partial morbillivirus genomes and the complete *Tursiops truncatus* genome (GenBank accession no. NC_012059.1), suggested that our UPL RT-PCR would be highly specific, we sought to verify this directly. We applied our assay and both probe sets to samples that were positive for PDV, which is closely related to CeMV, or for other viruses affecting dolphins, namely HeV, TtPV1 and DdPV1. In all cases, both primer sets gave negative results, even when we used 100-fold higher amounts of RNA (Fig. 1D).

3.2. Analytical performance of the assay

The sensitivity of the UPL RT-PCR assay was based on known numbers of template RNA copies generated by in vitro transcription of the cloned target sequences of 71 or 74 nt (see Section 2). Significant fluorescent signal was observed with as few as 2 RNA copies in the case of DMV, 5

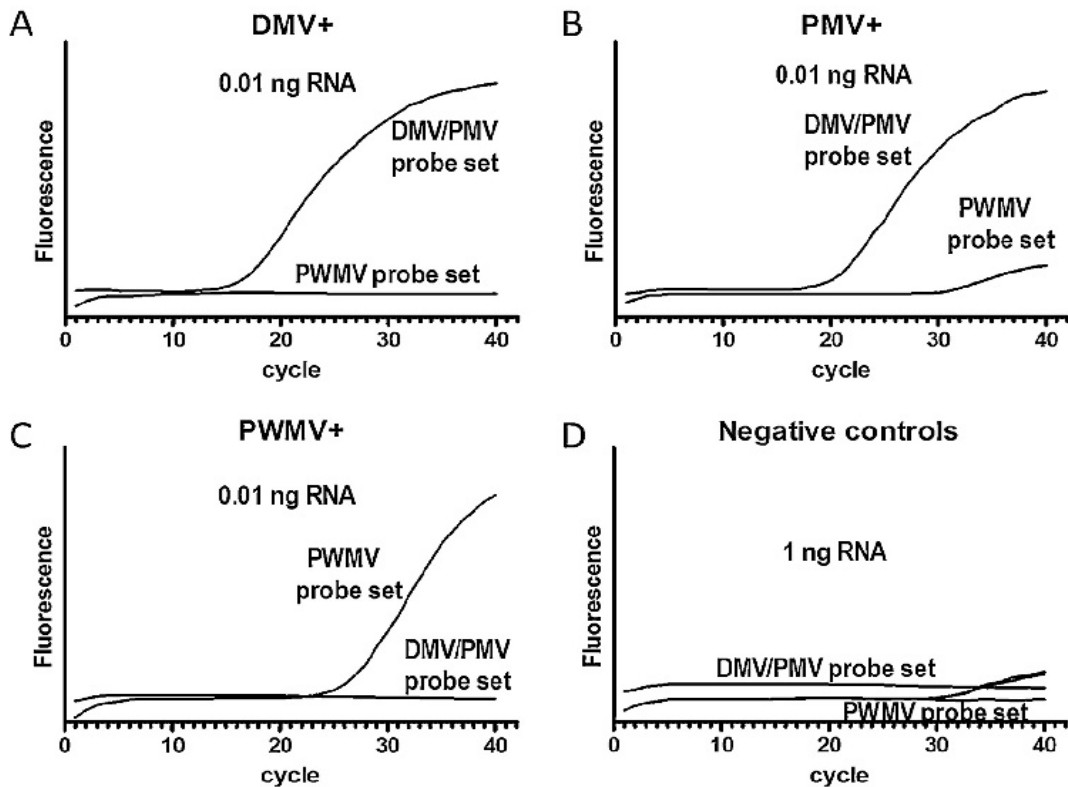


Fig. 1. Representative fluorescence results of positive control samples in the UPL RT-PCR assay using the two probe sets. The amount of RNA used in each assay is given in each panel. In panel D, the curves for all negative controls are shown together.

RNA copies in the case of PWMV, and ~ 30 copies in the case of PMV. These may be considered lower estimates of the assay detection limits for these target sequences. A perhaps more robust upper estimate for the detection limit for DMV and PWMV would be 20 and 50 RNA copies (for PWMV the value for 40 RNA copies was already highly significant). These limits are 2–4 orders of magnitude better than those reported for both the conventional RT-PCR assay and the more recent *rt* RT-PCR method (Barrett et al., 1993; Grant et al., 2009), as well as those obtained in our hands with the conventional RT-PCR assay (data not shown).

Plots of the number of amplification cycles necessary for detection as a function of the decimal logarithm of the initial RNA copy number are linear (Fig. 2), revealing a dynamic range spanning at least 6 orders of magnitude for DMV and PWMV and at least 5 orders of magnitude for PMV. In fact, although not shown, we also tested concentrations of target RNAs in 100-fold excess of 10^6 copies per assay and we found the linearity versus the logarithm of the copy number to span at least up to 10^8 target RNA copies per assay. Both intra and inter-assay variability was quite low, with all coefficients of variation 2% or less for mean RNA amount within the range shown in Fig. 2.

Plugging the slopes of these linear plots into Eq. (2) shows that the efficiency of the reaction is $\sim 100\%$ within experimental error; in other words, the amount of

template duplicates in each PCR cycle. Nearly identical slopes and efficiencies were obtained when the assays were carried out with 10-fold dilutions of the RNAs isolated from tissues infected with DMV (efficiency, 96.64%), PMV (108%) or PWMV (105%). Thus, amplification efficiency was essentially the same for RNA synthesized *in vitro* and for RNA isolated from tissues. In fact, when tissue samples were spiked with known numbers of copies of the RNA synthesized *in vitro* (tested with DMV), the increase in the fluorescent response with respect with the same sample without spiking, was that expected, within experimental error, for the number of RNA copies of target sequence added, supporting the value of the standard curves shown in Fig. 2 for quantifying viral RNA in tissues.

3.3. Validation of the UPL RT-PCR assay in field samples

Twenty field samples of dolphin tissues, previously analyzed by conventional RT-PCR (Barrett et al., 1993), were examined using our proposed UPL RT-PCR method. Seven of the samples that were positive by conventional RT-PCR were also positive by UPL RT-PCR (DMV/PMV probe set). UPL RT-PCR (#25) also detected a positive result in four additional samples that were negative by conventional RT-PCR, confirming the higher sensitivity of the novel UPL RT-PCR approach (data not shown).

Finally, striped dolphin tissue samples from the 2011 Mediterranean mass stranding were assayed for the

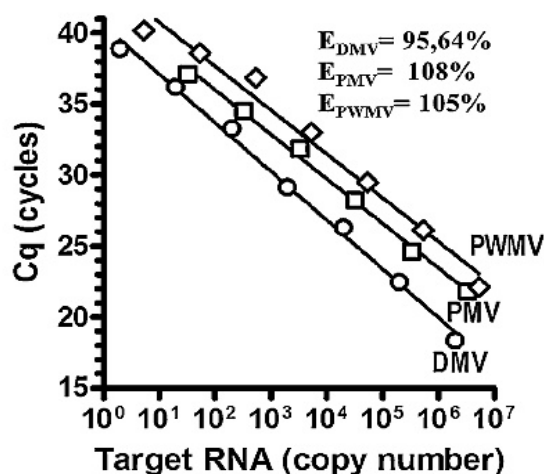


Fig. 2. Standard curves prepared with known amounts of target RNA synthesized in vitro. Lines reflect logarithmic regression according to the equation $Cq = A + k \log_{10}(\text{copy number})$, where values for A , k and r^2 (goodness of fit) are as follows: DMV, 40.5 ± 0.4 , -3.431 ± 0.100 and 0.9958 ; PMV, 42.3 ± 0.4 , -3.137 ± 0.099 and 0.9960 ; and PWMV, 43.8 ± 0.8 , 3.190 ± 0.198 and 0.9899 . Efficiency (E) was 95.64% for DMV, 108% for PMV and 105% for PWMV. Numbers of cycles necessary for detection are the mean of three independent experiments.

presence of DMV, PMV and PWMV using both the UPL RT-PCR method and the conventional RT-PCR method. Of 37 samples from 9 dolphins, only 1 (2.7%) was positive by conventional RT-PCR, while 17 (46%) were positive by UPL RT-PCR using the DMV/PMV probe set (Table 2). The amplicons from these positive samples were sequenced, and the virus was found to be DMV in all cases. In fact, the DMV strain identified here in the only sample that was positive by conventional RT-PCR was 98.5% identical with the phosphoprotein gene sequence of the DMV strain in the 2007 epizootic (GenBank accession no. EU039963). In addition, the fusion protein sequences obtained here by UPL RT-PCR showed 100% identity with that of the 1990 Spanish strain (GenBank accession no. AJ608288).

4. Discussion

This study describes a highly sensitive and specific UPL RT-PCR assay that detects DMV, PMV and PWMV in a single PCR. This assay differentiates the more virulent DMV and PMV from the less virulent PWMV. This rapid differentiation is important for rapid assessment in the early stages of an epizootic. The assay has been validated using clinical samples from well-studied epizootics, as well as using samples from an unusual striped dolphin mass stranding in 2011. The assay associated DMV with this recent epizootic.

Conventional RT-PCR methods to detect CeMV target the phosphoprotein gene (Barrett et al., 1993; Reidarson et al., 1998). These techniques have shown poor sensitivity for CeMV (Grant et al., 2009), consistent with the results reported here for field samples. In 2009, a more sensitive and specific rt RT-PCR assay was reported; this method detects nucleocapsid protein of DMV and PMV, but not of PWMV. The detection range is from 10^8 to 10^3 RNA copies for DMV and 10^8 to 10^2 RNA copies for PMV (Grant et al., 2009). The present assay, based on UPL RT-PCR, appears to be at least 10-fold more sensitive with no loss of specificity. In addition, the UPL RT-PCR is the first diagnostic method to allow simultaneous detection of all three CeMV strains.

While the UPL fluorogenic system has been used to detect and quantify other animal viruses, such as African swine fever virus (Fernández-Pinero et al., 2013), this is the first report of a CeMV diagnostic method targeting the fusion protein gene. The sensitivity and specificity obtained here indicate that this tool should be useful for screening DMV, PMV and PWMV in diseased dolphins. Indeed, tests of the method on 37 clinical samples obtained from a recent episode of massive dolphin stranding suggest DMV may have been the cause of this episode.

Although the cost per sample is higher for rt RT-PCR than for immunochemistry or conventional RT-PCR, the present UPL RT-PCR method is faster, more specific, more sensitive, more reproducible and cheaper than other probe-based PCR methods. In fact, the assay described here is at least 10^2 -fold more sensitive at detecting PMV and 10^3 -fold more sensitive at detecting DMV and PWMV than is conventional RT-PCR (Barrett et al., 1993). Thus, the

Table 2
Analysis of striped dolphin tissue homogenates by UPL RT-PCR and conventional RT-PCR.^a

Stranding date in 2011	Tissues tested with both RT-PCR methods	Tissues positive by UPL RT-PCR (DMV/PMV probe set)	Tissues positive by conventional RT-PCR
March 12	Brain, lung, pulmonary lymph node, kidney	Kidney	None
March 13	Brain, thymus, lung, pulmonary lymph node, kidney	Brain, kidney	None
March 15	Brain, lung, prescapular and pulmonary lymph nodes, kidney	Brain, kidney, lung, pulmonary lymph node	None
March 16	Brain, lung, pulmonary lymph node, kidney	Brain, lung, pulmonary lymph node, kidney	Brain
March 23	Brain, lung, pulmonary lymph node, kidney	Pulmonary lymph node	None
March 25	Brain, lung, pulmonary lymph node, kidney, tongue ulcer	Tongue ulcer	None
March 26	Brain, lung, pulmonary lymph node, kidney	Brain, lung, pulmonary lymph node, kidney	None
March 29	Brain, lung, pulmonary lymph node	None	None
April 5	Brain, lung, pulmonary lymph node	None	None

^a Samples were collected from dolphins suspected of containing CeMV in the Mediterranean Morbillivirus epizootic in March–April 2011 (Rubio-Guerri et al., 2012). Samples were tested by both the UPL RT-PCR assay (this work) and conventional RT-PCR (Barrett et al., 1993). All samples that were positive by either method were confirmed by sequencing.

total cost of the UPL RT-PCR assay may turn out to be less than with other methods, because fewer samples can be used without compromising accuracy. In addition, the UPL RT-PCR assay uses shorter cycling times than conventional RT-PCR, and it does not require gel electrophoresis and staining.

5. Conclusions

The UPL RT-PCR assay described here is rapid, sensitive, specific and convenient for screening the three CeMV strains simultaneously. It requires considerably less tissue and time than conventional gel-based methods. This method should provide a useful tool for analyzing the clinical and molecular epidemiology of DMV, PMV and PWMV infections in cetacean populations. In fact, this technique has associated DMV with the unusual mass stranding of striped dolphins on the Mediterranean coast of Valencia in 2011.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

The authors thank Rocío Sánchez for technical assistance and V. Rubio (IBV-CSIC, Valencia) for critical reading of the manuscript. This work was supported by a collaborative agreement involving the Conselleria de Infraestructuras, Territorio y Medio Ambiente of Valencia; the Oceanographic Aquarium of the Ciudad de las Artes y las Ciencias of Valencia; the VISAVET Center of Complutense University of Madrid; and the Pfizer Foundation. This work was cofinanced by Project CGL2009-08125 of the Spanish National Research Plan. CR-G is the recipient of an FPU grant from the Ministry of Education of Spain.

References

- Aguilar, A., Raga, J.A., 1993. The striped dolphin epizootic in the Mediterranean Sea. *Ambio* 524–528.
- Barrett, T., Visser, I.K., Mamaev, L., Goatley, L., van Bresse, M.F., Osterhaus, A.D., 1993. Dolphin and porpoise morbilliviruses are genetically distinct from phocine distemper virus. *Virology* 193, 1010–1012.
- Bellièrre, E.N., Esperón, F., Fernández, A., Arbelo, M., Muñoz, M.J., Sánchez-Vizcaino, J.M., 2011. Phylogenetic analysis of a new Cetacean morbillivirus from a short-finned pilot whale stranded in the Canary Islands. *Res. Vet. Sci.* 90, 324–328.
- Buh Gasparic, M., Cankar, K., Zel, J., Gruden, K., 2008. Comparison of different real-time PCR chemistries and their suitability for detection and quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnol.* 8, 26.
- Domingo, M., Ferrer, L., Pumarola, M., Marco, A., Plana, J., Kennedy, S., McAliskey, M., Rima, B.K., 1990. Morbillivirus in dolphins. *Nature* 348, 21.
- Fernández-Pinero, J., Gallardo, C., Elizalde, M., Robles, A., Gomez, C., Bishop, R., Heath, L., Couacy-Hymann, E., Fasina, F.O., Pelayo, V., Soler, A., Arias, M., 2013. Molecular diagnosis of African Swine Fever by a new real-time PCR using universal probe library. *Transbound. Emerg. Dis.* 60, 48–58.
- Fernandez, A., Esperon, F., Herraiz, P., de Los Monteros, A.E., Clavel, C., Bernabe, A., Sanchez-Vizcaino, J.M., Verborgh, P., DeStephanis, R., Toledano, F., Bayon, A., 2008. Morbillivirus and pilot whale deaths, Mediterranean Sea. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 792–794.
- Ginzinger, D.G., 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp. Hematol.* 30, 503–512.
- Gozalbes, P., Jiménez, J., Raga, J.A., Esteban, J.A., Tomás, J., Gómez, J.A., Eymar, J., 2010. Cetáceos y tortugas marinas en la Comunitat Valenciana. 20 años de seguimiento, Conselleria de Medio Ambiente, A., Urbanismo y Vivienda. Generalitat Valenciana, ed. (Valencia).
- Grant, R.J., Banyard, A.C., Barrett, T., Saliki, J.T., Romero, C.H., 2009. Real-time RT-PCR assays for the rapid and differential detection of dolphin and porpoise morbilliviruses. *J. Virol. Methods* 156, 117–123.
- Kennedy, S., 1998. Morbillivirus infections in aquatic mammals. *J. Comp. Pathol.* 119, 201–225.
- Krafft, A., Lichy, J.H., Lipscomb, T.P., Klaunberg, B.A., Kennedy, S., Taubenberger, J.K., 1995. Postmortem diagnosis of morbillivirus infection in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Atlantic and Gulf of Mexico epizootics by polymerase chain reaction-based assay. *J. Wildl. Dis.* 31, 410–415.
- Lipscomb, T.P., Kennedy, S., Moffett, D., Krafft, A., Klaunberg, B.A., Lichy, J.H., Regan, G.T., Worthy, G.A., Taubenberger, J.K., 1996. Morbilliviral epizootic in bottlenose dolphins of the Gulf of Mexico. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8, 283–290.
- Lipscomb, T.P., Schulman, F.Y., Moffett, D., Kennedy, S., 1994. Morbilliviral disease in Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the 1987–1988 epizootic. *J. Wildl. Dis.* 30, 567–571.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Raga, J.A., Banyard, A., Domingo, M., Corteyn, M., Van Bresse, M.F., Fernandez, M., Aznar, F.J., Barrett, T., 2008. Dolphin morbillivirus epizootic resurgence, Mediterranean Sea. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 471–473.
- Reidarson, T.H., McBain, J., House, C., King, D.P., Stott, J.L., Krafft, A., Taubenberger, J.K., Heyning, J., Lipscomb, T.P., 1998. Morbillivirus infection in stranded common dolphins from the Pacific Ocean. *J. Wildl. Dis.* 34, 771–776.
- Rubio-Guerri, C., Esperón, F., Melero, M., Bellière, E.N., Arbelo, M., Crespo, J.L., Sierra, E., García, D., Sánchez-Vizcaino, J.M., 2012. Unusual striped dolphin mass mortality episode related to cetacean morbillivirus in the Spanish Mediterranean Sea. In: 40th Annual Symposium of the European Association for Aquatic Mammals, Madrid, 9th–12th March, p. 17.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599.
- Taubenberger, J.K., Tsai, M.M., Atkin, T.J., Fanning, T.G., Krafft, A.E., Moeller, R.B., Kodsí, S.E., Mense, M.G., Lipscomb, T.P., 2000. Molecular genetic evidence of a novel morbillivirus in a long-finned pilot whale (*Globicephalus melas*). *Emerg. Infect. Dis.* 6, 42–45.

Subobjetivo 1.2.: Actuación y detección ante un brote de CeMV y profundizar en los posibles orígenes del brote.

Como se ha comentado anteriormente, CeMV ha sido responsable de decenas de muertes de mamíferos marinos en todo el mundo, tal y como ocurrió en los dos brotes de DMV en 1990-1992 y 2007-2008 en las costas mediterráneas españolas y que afectó a la población de *S.coreuleoalba*.

Este subobjetivo se centra en el estudio de los varamientos que hubo en las costas de la Comunidad Valenciana entre Marzo y Abril de 2011. En estos escasos dos meses 37 delfines en total vararon: 26 *S.coreuleoalba*, tres *T. truncatus* más ocho delfines que no se pudo determinar la especie por su avanzado estado de descomposición. Se realizó la necropsia y toma de muestras de todos aquellos animales (en total 13) que vararon y mantenían un buen estado de conservación. Debido a que esta zona es una zona de riesgo para CeMV, se utilizó la UPL RT-PCR para el diagnóstico rápido de CeMV en estos animales, y a su vez se realizó histopatología, inmunohistoquímica y la RT-PCR convencional que amplifica la fosfoproteína para la confirmación de los positivos. Se pudieron encontrar lesiones macroscópicas y microscópicas compatibles con CeMV en la mayoría de los animales que fueron analizados. Además la inmunopositividad en cerebro junto con la positividad de la UPL RT-PCR de 7 de los 9 animales analizados en al menos dos tejidos confirmó la infección sistémica por CeMV. Por último el análisis filogenético de las secuencias del gen de la fosfoproteína obtenidas mediante la RT-PCR convencional mostraron que se trataba de DMV, y que estaba filogenéticamente relacionado con el DMV responsable del brote del 2006-200. Este hallazgo sugirió que el origen del brote podría estar en el mismo Mediterráneo y no en el Atlántico.

Artículos científicos:

- ❖ Rubio-Guerri, C.; Melero, M*.; Esperón, F.; Bellière, EN.; Arbelo, M.; Crespo, JL.; Sierra, E.; García-Párraga, D.; Sánchez-Vizcaíno, JM. (2013) **Unusual striped dolphin mass mortality episode related to Cetacean Morbillivirus in the Spanish Mediterranean Sea.** BMC Veterinary Research, 23: 106

Ponencias en congresos:

- ❖ Rubio-Guerri, C.; Esperón, F.; Melero, M. ; Bellière, EN; Arbelo, M.; Crespo, JL.; Sierra, E.;García-Parraga, D.; Sánchez-Vizcaíno, JM (2012) **An unusual mortality episode in the Spanish Mediterranean Sea related to Cetacean morbillivirus (CeMV)**. .40th Symposium of the European Association for Aquatic Mammals. March 9th-12th, 2012; Madrid, Spain.

CASE REPORT

Open Access

Unusual striped dolphin mass mortality episode related to cetacean morbillivirus in the Spanish Mediterranean sea

Consuelo Rubio-Guerri^{1*†}, Mar Melero^{1†}, Fernando Esperón², Edwige Nina Bellière², Manuel Arbelo³, Jose Luis Crespo⁴, Eva Sierra³, Daniel García-Párraga⁴ and Jose Manuel Sánchez-Vizcaino¹

Abstract

Background: In the last 20 years, Cetacean Morbillivirus (CeMV) has been responsible for many die-offs in marine mammals worldwide, as clearly exemplified by the two dolphin morbillivirus (DMV) epizootics of 1990–1992 and 2006–2008, which affected Mediterranean striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). Between March and April 2011, the number of strandings on the Valencian Community coast (E Spain) increased.

Case presentation: Necropsy and sample collection were performed in all stranded animals, with good state of conservation. Subsequently, histopathology, immunohistochemistry, conventional reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Universal Probe Library (UPL) RT-PCR assays were performed to identify Morbillivirus. Gross and microscopic findings compatible with CeMV were found in the majority of analyzed animals. Immunopositivity in the brain and UPL RT-PCR positivity in seven of the nine analyzed animals in at least two tissues confirmed CeMV systemic infection. Phylogenetic analysis, based on sequencing part of the phosphoprotein gene, showed that this isolate is a closely related dolphin morbillivirus (DMV) to that responsible for the 2006–2008 epizootics.

Conclusion: The combination of gross and histopathologic findings compatible with DMV with immunopositivity and molecular detection of DMV suggests that this DMV strain could cause this die-off event.

Keywords: Cetacean morbillivirus, Dolphin morbillivirus, Mediterranean sea, Mass mortality, Striped dolphin

Background

Over the last 20 years, epizootics caused by *Cetacean morbillivirus* (CeMV) (genus *Morbillivirus*, family *Paramyxoviridae*) have occurred among cetacean populations worldwide and have caused mass mortality [1]. Three main CeMV groups have been described: dolphin morbillivirus (DMV) [2], porpoise morbillivirus (PMV) [3] and pilot whale morbillivirus (PWMV) [4,5].

The spread of DMV infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) in the Mediterranean Sea caused around 1000 deaths in 1990–1992 [6]. This outbreak started in 1990 in the Gulf of Valencia, in the Spanish

Mediterranean Sea [7], and propagated along European Mediterranean coasts over the following months [2,8]. Then in 2007, a new DMV outbreak occurred off the Spanish Mediterranean coast. It affected approximately 100 striped dolphins [9] and up to 60 long-finned pilot whales (*Globicephala melas*) [10], and subsequently spread to the French Mediterranean coast [11].

In the last two decades, the annual mean mortality rate of dolphins stranded off the Mediterranean coast of Valencia has been 28.4 animals per year. However this rate lowers to 18.3 animals per year if the 1990 and 2007 outbreak years are excluded [12].

In the present study, 37 dolphins are reported as stranded dolphins in 2 months, which represents more than the annual mean in that region. An evaluation of *Morbillivirus* infection revealed the overwhelming positivity of the stranded animals, suggesting that DMV could

* Correspondence: consuelo@sanidadanimal.info

† Equal contributors

¹VISAVET Center and Animal Health Department, Veterinary School, Complutense University of Madrid, Av Puerta del Hierro s/n, Madrid 28040, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

be responsible for this increase in strandings, which might be the third DMV epizootic in the Mediterranean Sea.

Case presentation

Thirty-seven dolphins stranded along the Valencian Mediterranean coast between March and April 2011: 26 striped dolphins (*S. coeruleoalba*), three bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and eight dolphins of undetermined species (poor level of conservation hampered species identification).

Necropsies were performed according to standard protocols of the European Cetacean Society [13]. Stranded dolphins were recovered from the Valencia Mediterranean coast of Spain (39°N, 0°W) by the Marine Mammal Stranding Network of the *Conselleria de Infraestructuras, Territorio y Medio Ambiente* of Valencia. A detailed post-mortem examination could be carried out on 11 animals (nine striped dolphins and two bottlenose dolphins) since other animals were poorly preserved.

Fresh tissue samples (brain, lung, kidney, liver, lymph node, tonsil, thymus, spleen and skin) were fixed in 10% neutral buffered formalin for histopathology, refrigerated for microbiology, and tissue samples were frozen for molecular diagnosis. Immunohistochemical staining with a Canine Distemper Virus monoclonal antibody specific for nucleoprotein, IgG2B isotype (CDV-NP. VMRD®, Inc.), was carried out on selected samples of brain, lung, kidney, urinary bladder, stomach and intestine. Frozen tissues were homogenized using a Bullet Blender™ (Next Advance, Inc., Averill Park, NY), and total nucleic acid was extracted using the NucleoSpin RNA II Kit (Macherey-Nagel) for RNA extraction and the High Pure PCR Template Preparation Kit for DNA extraction, following the manufacturers' instructions in both kits. For the molecular CeMV diagnosis, real-time RT-PCR assays, based on the Universal Probe Library (UPL) platform, that target a sequence within the fusion protein gene, was carried out [14].

CeMV infection was confirmed by sequencing the real-time RT-PCR products. For the phylogenetic analysis, in addition to the fusion protein gene, the DMV phosphoprotein (P) and nucleoprotein (N1 and N2) genes were amplified by conventional RT-PCRs assays according to published protocols [4,15] in some positive sample. A BLAST analysis was used to compare the obtained phosphoprotein and nucleoprotein sequences with all the CeMV sequences available in GenBank. A phylogenetic analysis was performed using the MEGA 4.0 software [16]. P-distance matrices were calculated, and tree topology was inferred by the neighbor-joining maximum composite likelihood method to test the reliability of the topology by bootstrapping 1000 replicates generated with a random seed.

Brucella spp. and *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) diagnoses were carried out in the animals whose non suppurative

encephalitis was observed in the histopathological analysis. The molecular identification of *Brucella* spp. was performed in the brains of suspected animals by TaqMan Real time PCR, targeting the insertion sequence IS711 of *Brucella* spp. [17]. Additionally, *T. gondii* DNA was detected by nested PCR, in which the target formed part of the sequence of repetitive gene B1 (194 bp, 97 bp) using the method described by Montoya et al. [18].

Thirty-seven dolphins were stranded on the Mediterranean coast of Valencia (Spain) in mid-2011. The epizootic started at the beginning of March 2011 with a low stranding rate, but gradually increased during this month (Figure 1).

A widespread poor body condition was observed in the necropsies. Mainly gross findings were localized in the central nervous, respiratory, lymphoid and digestive systems (Table 1).

The histopathological analysis showed severe non suppurative meningoencephalitis with numerous intranuclear inclusion bodies in three individuals (Figure 2B). Perivascular cuffing with many layers of mononuclear cells were found to especially affect inflammatory meningeal areas, vessels of cortical gray matter and, to a lesser extent, in the white matter areas. Positive immunostaining revealed the Morbillivirus antigen in glial cells and astrocytes of the brain in one of the three individuals (Figure 2B). Focal bronchointerstitial pneumonia with few giant cells was observed in some animals. However in lymphnodes, the necrotic areas in reticular and perivascular cells were found. No immunopositivity was revealed in either the lungs or lymph nodes from any animal.

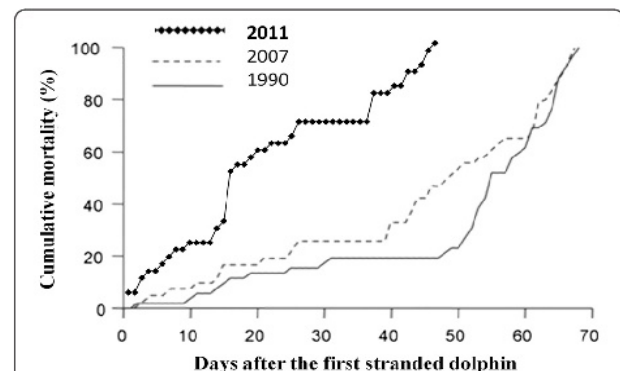


Figure 1 Comparison of cumulative percentages of dolphins stranded in 1990, 2007 and 2011 epizootics. The 2011 curve represents % between March and April 2011. 1990 and 2007 curves shows % between July and August 1990 and 2007. In 2011 curve, day 0 corresponds to 12th of March 2011. Data from 1990 and 2007 are extracted from Raga et al. 2008.

CAPÍTULO III. Resultados
Objetivo 1: Avance en el conocimiento del morbillivirus de los cetáceos (CeMV)

Table 1 Necropsy, histopathology and morbillivirus detection results in the *Stenella coeruleoalba* individuals stranded in the 2011 epizootic

Stranding date (2011)	Age (length, cm)	Sex	Main gross lesions	Main histological lesions	Tissues tested for CeMV (positive samples underlined by UPL RT-PCR)
March 12	New born (108.7)	Male	Poor body condition, severe pneumonia	Focal broncointerstitial pneumonia with few giant cells, necrotic areas in reticular and perivascular cells of lymph nodes	Brain, Lung, Pulmonary lymph node, <u>Kidney</u>
March 13	New born (112.3)	Male	Numerous injuries, severe enteritis in large intestine	Multifocal lymphocytic broncointerstitial pneumonia, bronchoalveolar hemorrhages, eosinophilic lymphadenitis, nephritis	<u>Brain</u> , Thymus, Lung, Pulmonary lymph node, <u>Kidney</u>
March 15	Sub adult (170)	Female	Suboptimal body condition, gas bubbles in meninges vessels, severe pneumonia, mild gastritis	Severe non-suppurative meningoencephalitis, intranuclear inclusion bodies mainly in astrocytes	Brain, Lung, <u>Prescapular and Pulmonary lymph nodes</u> , <u>Kidney</u>
March 16	Adult (206)	Female	Poor body condition, severe pneumonia, enteritis in large intestine with numerous parasitic granulomas	Verminous bronchopneumonia, chronic nephritis	Brain*, Lung, <u>Pulmonary lymph node</u> , <u>Kidney</u> , Liver
March 23	Subadult (209)	Female	Cachexia, injuries, severe brain congestion, internal hemorrhage, atelectasis, large pulmonary bullae	Verminous bronchopneumonia, pleuritis with bacterial colonies, systemic intravascular bacterial embolism	Brain, Lung, <u>Pulmonary lymph node</u> , <u>Kidney</u>
March 25	Subadult (170)	Female	Pneumonia in cranial left lung, enlarged and congestive prescapular and pulmonary lymph nodes	Severe non-suppurative meningoencephalitis	Brain, Lung, Pulmonary lymph node, <u>Kidney</u> , <u>Tongue ulcer</u>
March 26	Subadult (176)	Female	Poor body condition, maxilla and mandible fracture, brain congestion, numerous injuries, pneumonia, atelectasis, enlarged and hemorrhagic pulmonary and abdominal lymph nodes, hepatic congestion	Mild non-suppurative meningoencephalitis	Brain, Lung, <u>Pulmonary lymph node</u> , <u>Kidney</u>
March 29	New born (123)	Male	Suboptimal body condition, temporal fracture, tonsillitis, tongue ulcers, pulmonary fibrosis, severe pneumonia in right lung, enlarged and congestive pulmonary lymph nodes, severe enteritis in large intestine	Severe brain hemorrhages	Brain, Lung, Pulmonary lymph node
April 5	New born (109)	Female	Poor body condition, pneumonia, atelectasis, enlarged and congestive pulmonary lymph nodes, tonsillitis, enteritis in both small and large intestines	Not evaluated	Brain, Lung, Pulmonary lymph node

*positive to phosphoprotein gene conventional RT-PCR.

According to the molecular diagnosis performed by UPL RT-PCR assays, seven of the eleven analyzed dolphins were positive in DMV/PMV UPL PCR, which represents 63.6% of positivity to CeMV. They were all striped dolphins. After considering that the most affected specie in the last Mediterranean DMV epizootics was striped dolphin, the percentage was calculated in

relation to all the analyzed striped dolphins, which changed to 78% of positivity (seven positive striped dolphins as compared to nine analyzed striped dolphins) (Table 1). Furthermore, the systemic form of the disease was found in five of these seven animals, which contained at least two positive tissues. However, only one of the seven positive animals analyzed by UPL RT-PCR

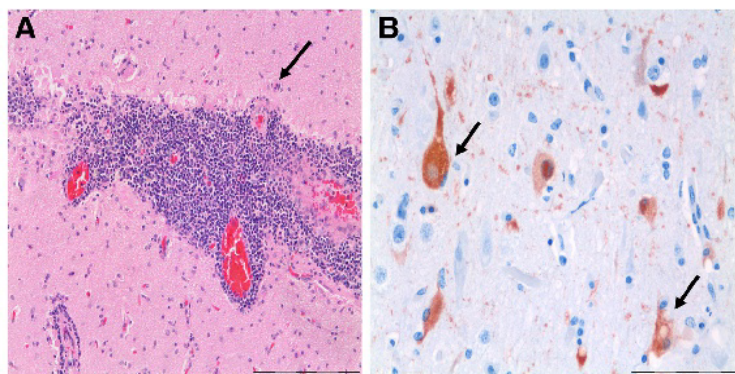


Figure 2 Brain dolphin with morbillivirus infection. (A) Severe non-suppurative encephalitis with acidophilic intranuclear viral inclusions (arrows) (H&E) Original amplification $\times 20$. **(B)** Positive immunoperoxidase staining of morbilliviral antigen in glial cells and astrocytes of the brain (arrows). Avidin-biotin-peroxidase with Harris hematoxylin counterstain. Original magnification $\times 40$.

was positive for phosphoprotein by conventional PCR, and this positivity was restricted to brain.

Sequencing the amplicons from the fusion protein gene (F) [14], the phosphoprotein gene (P) [15] and the two fragments of the nucleoprotein gene, named N1 [5] and N2 [19], confirmed infection by DMV. The phosphoprotein gene sequence obtained from the brain of one striped dolphin (GenBank accession number JN210891) showed a p-distance of 0.003 with the 2007 Spanish strain (GenBank EU039963) [10] and of 0.015 with the 1990 Spanish strain (GenBank AJ608288). Thus, the phosphoprotein gene sequences for the 2007 and 2011 Spanish strains were 98.5% identical (Figure 3). In addition, the fusion protein sequences showed 100% identity with the 1990 Spanish strain (GenBank AJ608288) and the 2007 Spanish strain (GenBank accession number HQ829972) [20] (Figure 3). Complementarily, the N2 fragment of 495 bp [19] and the N1 fragment of 181 bp of the nucleoprotein gene [5] were compared with other DMV nucleoprotein gene sequences, which confirmed that the 2011 DMV strain evolved from the 1990 DMV strain and the 2007 DMV strain (Figure 3). The N1 sequence was 100% identical to the others observed in the Mediterranean Sea from 2007 to 2012 [20,21], whereas the N2 fragment showed a similarity of 99.8% with the DMV sequence obtained from the *Globicephala melas* mass stranding of 2007 [20].

The microbiological investigations found no pathologically significant microorganisms. As regards *Brucella* spp. and *T. gondii* PCRs, negative results were identified in the three animals with non suppurative encephalitis.

The 37 strandings in just 2 months might represent an unusual mortality event if we consider the annual number of stranded dolphins has not been exceeded since 1990,

except in 1990 and 2007, on Valencian Mediterranean coasts [12]. DMV was considered the causative agent of this increase in strandings in 1990 and 2007 [7,9]. In addition, this is not the first description of DMV in the Mediterranean Sea in 2011. In Italy, DMV has been reported in striped dolphins, bottlenose dolphins and fin whales on almost the same dates as this report [21-24]. Accordingly, Morbillivirus infection finding might be related with the rise in strandings in 2011.

DMV detection by the UPL RT-PCR assay in 78% of the analyzed striped dolphins highlights the important role that DMV plays in this unusual episode of mass strandings. At the same time, the recognition of DMV in at least two tissues in five animals may indicate the general spread of this virus, most likely by the circulatory system. Failure to detect CeMV in the central nervous system (CNS) in all the positive animals can be explained by the fact that distribution of CeMV brain infection is not homogeneous [25] and that the CNS samples in this study were not collected uniformly; thus it was impossible to determine from which brain region each sample had been taken. In addition, *Toxoplasma gondii* and *Brucella* spp. have been related with encephalitis in stranded dolphins [26,27], and even together with CeMV [22]. However in our study, any of the three cases with non suppurative encephalitis can be related with these pathogens.

A comparison made of the striped dolphin outbreaks in 1990, 2007, and 2011 suggests a change in DMV epidemiology in the Western Mediterranean Sea. In 2011, mortality was even lower, lesions were less severe, and mostly younger animals were affected. Since enzootic infections in wildlife are characterized by milder lesions and lighter pathogen loads than epizootics [28], it is

CAPÍTULO III. Resultados
Objetivo 1: Avance en el conocimiento del morbillivirus de los cetáceos (CeMV)

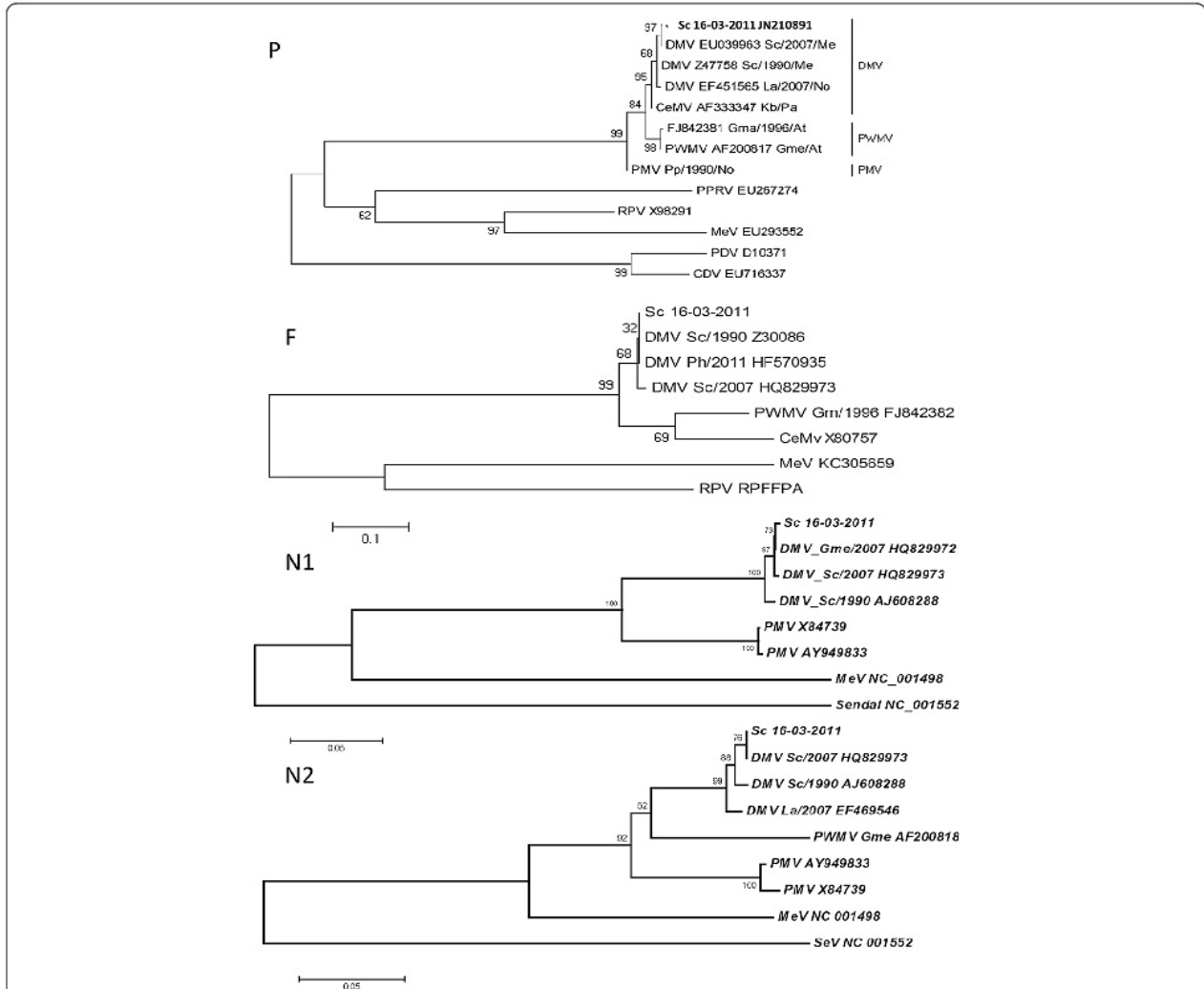


Figure 3 Neighbor-joining phylogram of morbillivirus phosphoprotein (P), fusion (F) and nucleoprotein (N1 and N2) genes sequences. The name of each sequence is composed of the virus name (DMV, dolphin morbillivirus; CeMV, Cetacean morbillivirus; PMV, porpoise morbillivirus; PWMV, pilot whale morbillivirus; PPRV, Peste-des-Petits-Ruminants virus; RPV; Rinderpest virus; CDV, Canine Distemper virus; PDV, Phocine Distemper virus; MeV, Measles virus), GenBank accession number, cetacean species infected (Sc, *Stenella coeruleoalba*; Gme, *Globicephala melas*; La, *Lagenorhynchus albirostris*; Kb, *Kogia breviceps*; Tt, *Tursiops truncatus*; Pp, *Phocoena phocoena*; Gma, *Globicephala macrorhynchus*), the year and the geographical area of the stranding (At, Atlantic Ocean; Me, Mediterranean Sea; No, North Sea; Pa, Pacific Ocean).

possible that DMV epidemiology in striped dolphins in the Western Mediterranean is changing from epizootic to enzootic infection, as suggested by others [20,25]. Systematic serological surveys are urgently required to address this question.

Conclusions

In conclusion, the presence of DMV-compatible lesions, the antigen detection in one of the animals and the molecular detection of DMV genomic sequences all suggest

that DMV is associated with this unusual mass mortality episode in striped dolphins in the Western Mediterranean Sea. Further research to define how the virus circulates and causes epidemics in the Mediterranean Sea, and why only striped dolphins were affected in 2011, is warranted.

Abbreviations

CeMV: Cetacean morbillivirus; DMV: Dolphin morbillivirus; RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction; UPL: Universal probe library; PMV: Porpoise morbillivirus; PWMV: Pilot whale morbillivirus; S. coeruleoalba: *Stenella coeruleoalba*; CNS: Central nervous system.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

Necropsies were performed by JLC, CRG and MM; microscopic examination and immunohistochemistry were carried out by ES and MA; the viral study and the phylogenetic study were analyzed by CRG, MM, NEB, and FE; the manuscript was prepared and critically discussed by CRG, MM, FE, NEB and JMSV, with contributions by all the remaining authors. All the authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We thank Prof. Miró Corrales and Dr. Montoya from Complutense University of Madrid and Dr. Fuentes from Parasitology Service of the National Center of Microbiology in the Carlos III Institute of Health for the *Toxoplasma gondii* diagnosis. This work has been supported by a collaborative agreement between the Conselleria de Infraestructuras, Territorio y Medio Ambiente of Valencia of Valencia; the Oceanographic Aquarium of the Ciudad de las Artes y las Ciencias de Valencia; the VISAVET Center of Complutense University of Madrid; and the Pfizer Foundation. This work was cofinanced by Project CGL2009-08125 of the Spanish National Research Plan. The authors thank the Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva, University of Valencia, for collaboration on necropsies, and Elena Neves, Belén Rivera, Verónica Nogal and Rocío Sánchez for technical assistance. Mar Melero is the recipient of a PhD student grant from the University Complutense of Madrid and Consuelo Rubio is the recipient of a FPU grant from the Spanish Ministry of Education.

Author details

¹VISAVET Center and Animal Health Department, Veterinary School, Complutense University of Madrid, Av Puerta del Hierro s/n, Madrid 28040, Spain. ²Animal Health Research Centre, Ctra. de Algete a El Casar s/n, Madrid 28130, Spain. ³Unit of Histology and Veterinary Pathology, Institute for Animal Health, Veterinary School, University of Las Palmas de Gran Canaria, Carretera de Trasmontaña s/n, Arucas (Las Palmas), Canary Islands 35413, Spain. ⁴Veterinary Services, Oceanographic Aquarium of the Ciudad de las Artes y las Ciencias, C/ Junta de murs i valls s/n, Valencia 46023, Spain.

Received: 20 February 2013 Accepted: 17 May 2013

Published: 23 May 2013

References

- Van Bressemer MF, Raga JA, Di Guardo G, Jepson PD, Duignan PJ, Siebert U, Barrett T, Santos MC, Moreno IB, Siciliano S, et al: **Emerging infectious diseases in cetaceans worldwide and the possible role of environmental stressors.** *Dis Aquat Organ* 2009, **86**(2):143–157.
- Domingo M, Ferrer L, Pumarola M, Marco A, Plana J, Kennedy S, McAliskey M, Rima BK: **Morbillivirus in dolphins.** *Nature* 1990, **348**(6296):21.
- Kennedy S: **Morbillivirus infections in aquatic mammals.** *J Comp Pathol* 1998, **119**(3):201–225.
- Bellièrè EN, Esperón F, Fernández A, Arbelo M, Muñoz MJ, Sánchez-Vizcaino JM: **Phylogenetic analysis of a new Cetacean morbillivirus from a short-finned pilot whale stranded in the Canary Islands.** *Res Vet Sci* 2011, **90**(2):324–328.
- Taubenberger JK, Tsai MM, Atkin TJ, Fanning TG, Krafft AE, Moeller RB, Kodsi SE, Mense MG, Lipscomb TP: **Molecular genetic evidence of a novel morbillivirus in a long-finned pilot whale (*Globicephalus melas*).** *Emerg Infect Dis* 2000, **6**(1):42–45.
- Lipscomb TP, Kennedy S, Moffett D, Krafft A, Klauenberg BA, Lichy JH, Regan GT, Worthy GA, Taubenberger JK: **Morbilliviral epizootic in bottlenose dolphins of the Gulf of Mexico.** *J Vet Diagn Invest* 1996, **8**(3):283–290.
- Aguilar A, Raga JA: **The striped dolphin epizootic in the Mediterranean Sea.** *Ambio* 1993, **22**:524–528.
- Duignan PJ, Geraci JR, Raga JA, Calzada N: **Pathology of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from Valencia and Murcia, Spain.** *Can J Vet Res* 1992, **56**(3):242–248.
- Raga JA, Banyard A, Domingo M, Corteyn M, Van Bressemer MF, Fernández M, Aznar FJ, Barrett T: **Dolphin morbillivirus epizootic resurgence, Mediterranean Sea.** *Emerg Infect Dis* 2008, **14**(3):471–473.
- Fernández A, Esperón F, Herraes P, de Los Monteros AE, Clavel C, Bernabe A, Sánchez-Vizcaino JM, Verborgh P, DeStephanis R, Toledano F, et al: **Morbillivirus and pilot whale deaths, Mediterranean Sea.** *Emerg Infect Dis* 2008, **14**(5):792–794.
- Keck N, Kwiatek O, Dhermain F, Dupraz F, Boulet H, Danes C, Laprie C, Perrin A, Godenir J, Micout L, et al: **Resurgence of Morbillivirus infection in Mediterranean dolphins off the French coast.** *Vet Rec* 2010, **166**(21):654–655.
- Gonzalbes P, Jiménez J, Raga JA, Tomás J, Gómez JA, Eymar J: **Cetáceos y tortugas marinas en la Comunitat Valenciana 20 años de seguimiento.** In Edited by Conselleria de Medio Ambiente A. Valencia, Spain: Urbanismo y Vivienda; 2010:92.
- Kuiken T, García-Hartmann M: **Dissection techniques and tissue sampling.** In *First ECS workshop on Cetacean Pathology: 1991*. Leiden, Netherlands: European Society Newsletter No. 17-Special issue; 1991:39.
- Rubio-Guerri C, Melero M, Rivera-Arroyo B, Bellière EN, Crespo JL, García-Párraga D, Esperón F, Sánchez-Vizcaino JM: **Simultaneous diagnosis of Cetacean morbillivirus infection in dolphins stranded in the Spanish Mediterranean sea in 2011 using a novel Universal Probe Library (UPL) RT-PCR assay.** *Vet Microbiol* 2012. doi:10.1016/j.vetmic.2012.10.031.
- Barrett T, Visser IK, Mamaev L, Goatley L, van Bressemer MF, Osterhaus AD: **Dolphin and porpoise morbilliviruses are genetically distinct from phocine distemper virus.** *Virology* 1993, **193**(2):1010–1012.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S: **MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.** *Mol Bio Evol* 2007, **24**(8):1596–1599.
- Hinic V, Brodard I, Thomann A, Cvetnic Z, Makaya PV, Frey J, Abril C: **Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems.** *J Microbiol Methods* 2008, **75**(2):375–378.
- Montoya A, Miro G, Blanco MA, Fuentes I: **Comparison of nested PCR and real-time PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in biological samples from naturally infected cats.** *Res Vet Sci* 2010, **89**(2):212–213.
- van de Bildt MW, Kuiken T, Osterhaus AD: **Cetacean morbilliviruses are phylogenetically divergent.** *Arch Virol* 2005, **150**(3):577–583.
- Bellièrè EN, Esperón F, Sánchez-Vizcaino JM: **Genetic comparison among dolphin morbillivirus in the 1990–1992 and 2006–2008 Mediterranean outbreaks.** *Infect Genet Evol* 2011, **11**(8):1913–1920.
- Mazzariol S, Peletto S, Mondin A, Centelleghè C, Di Guardo G, Di Francesco CE, Casalone C, Acutis PL: **Dolphin morbillivirus infection in a captive harbor seal (*Phoca vitulina*).** *J Clin Microbiol* 2013, **51**(2):708–711.
- Mazzariol S, Marcer F, Mignone W, Serracca L, Gorla M, Marsili L, Di Guardo G, Casalone C: **Dolphin Morbillivirus and *Toxoplasma gondii* coinfection in a Mediterranean fin whale (*Balaenoptera physalus*).** *BMC Vet Res* 2012, **8**:20.
- Di Guardo G: **Morbillivirus-host interaction: lessons from aquatic mammals.** *Front Microbiol* 2012, **3**:431.
- Di Guardo G, Di Francesco CE, Eleni C, Cocumelli C, Scholl F, Casalone C, Peletto S, Mignone W, Tittarelli C, Di Nocera F, et al: **Morbillivirus infection in cetaceans stranded along the Italian coastline: pathological, immunohistochemical and biomolecular findings.** *Res Vet Sci* 2013, **94**(1):132–137.
- Domingo M, Vilafranca M, Visa J, Prats N, Trudgett A, Visser I: **Evidence for chronic morbillivirus infection in the Mediterranean striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*).** *Vet Microbiol* 1995, **44**(2–4):229–239.
- Roe WD, Howe L, Baker EJ, Burrows L, Hunter SA: **An atypical genotype of *Toxoplasma gondii* as a cause of mortality in Hector's dolphins (*Cephalorhynchus hectori*).** *Vet Parasitol* 2013, **192**(1–3):67–74.
- Alba P, Terracciano G, Franco A, Lorenzetti S, Cocumelli C, Fichi G, Eleni C, Zygmunt MS, Cloeckert A, Battisti A: **The presence of *Brucella ceti* ST26 in a striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) with meningoencephalitis from the Mediterranean Sea.** *Vet Microbiol* 2013, **164**(1–2):158–163.
- Sinclair ARE, Fryxell JM, Caughley G: **Parasites and pathogens.** In *Wildlife ecology, conservation, and management*. Oxford: Wiley-Blackwell; 2006:179–195.

doi:10.1186/1746-6148-9-106

Cite this article as: Rubio-Guerri et al: Unusual striped dolphin mass mortality episode related to cetacean morbillivirus in the Spanish Mediterranean sea. *BMC Veterinary Research* 2013 **9**:106.

Subobjetivo 1.3.: Seguimiento epidemiológico de CeMV en los cetáceos varados en las costas mediterráneas en periodos interepizoóticos.

Tras el brote del 2011, se siguió realizando el diagnóstico de CeMV de todos los animales varados en las costas de la Comunidad Valenciana pudiendo comprobar que de los 222 cetáceos varados desde junio del 2011 hasta diciembre del 2014 sólo tres animales han dado positivo a DMV. Hasta el momento sólo se habían descrito formas crónicas de la enfermedad en periodos interepizoóticos en el Mediterráneo. Sin embargo, en este estudio, dos animales muestran signos de infección sistémica aguda y otro de infección sistémica crónica. Sólo uno de ellos, varado en Julio de 2011, muy próximo a la fecha que se dio por terminado el brote, mostraba una secuencia muy similar a la secuencia responsable del brote del 2011. En cambio los otros dos casos, varados en 2012 y 2014, la secuencia obtenida era diferente a las anteriormente descritas en el Mediterráneo y además era filogenéticamente más próxima a la del 1990 que a la de 2007 y 2011.

En los dos casos de infección sistémica aguda, a diferencia de los casos del brote del 2011, mostraban lesiones muy pronunciadas y típicas de CeMV, tales como meningoencefalitis no supurativa, bronconeumonía y depleción linfoide, además de encontrar el virus en varios tejidos mediante IHQ y rt RT-PCR con altísima carga viral en los tres casos. En el caso de infección sistémica crónica presentaba las mismas lesiones descritas en los otros casos pero el virus sólo se pudo encontrar restringido al SNC debido, probablemente, a una infección tardía.

Esto hace pensar que sí pueden darse casos de infección sistémica durante periodos interepizoóticos, y la nueva secuencia obtenida podría indicar que existe una nueva cepa de DMV circulando en la población de delfines listados en el Mediterráneo. Sin embargo, en este trabajo se pone de manifiesto la necesidad de seguir trabajando sobre la epidemiología de esta enfermedad ya que quedan muchos aspectos sin resolver como el origen del virus o la causa de los brotes y como se mantiene en la población.

Artículos científicos:

- ❖ Rubio-Guerri, C.; Jimenez, M.A.; Melero, M.; Díaz-Delgado, J.; Bellière, N.E.; Crespo, J.L.; García-Párraga, D.; Kukielka, D.; Esperón, F.; Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2015) **Detection of different dolphin morbillivirus sequences in striped dolphins on the Spanish**

Mediterranean Sea outside an epizootic period. *Veterinary Medicine and Science* (under review)

Ponencias en congresos:

- ❖ Rubio-Guerri, C.; Jimenez, M.A; Bellière, E.N.; Esperón, F.; Crespo, J.L., Melero, M.; García-Párraga, D.; Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2013) **Description of a new strain of Dolphin morbillivirus from a stranded striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) on Spanish Mediterranean Coast.** 41th Symposium of the European Association for Aquatic Mammals. March 15th – 18th, 2013; Nuremberg, Germany.

Original article

Detection of different dolphin morbillivirus sequences in striped dolphins on the Spanish Mediterranean Sea outside an epizootic period

Consuelo Rubio-Guerri^{1*}, M^a Ángeles Jimenez², Mar Melero¹, Josué Díaz-Delgado³, Edwige Nina Bellière⁴, José Luis Crespo⁵, Daniel García-Párraga⁵, Deborah Kukielka, Fernando Esperón⁴, José Manuel Sánchez-Vizcaíno¹

¹VISAVET Center and Animal Health Department, Veterinary School, Complutense University of Madrid, Avda. Puerta del Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain ²Medicine and Surgery Department (Anatomic Pathology), Veterinary School, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain ³Unit of Histology and Veterinary Pathology, Institute for Animal Health, Veterinary School, University of Las Palmas de Gran Canaria, Carretera de Trasmontaña, s/n 35413 Arucas (Las Palmas), Canary Islands, Spain ⁴National Institute for Agricultural and Food Research and Technology, Ctra. de Algete a El Casar s/n, 28130 Madrid, Spain ⁵Veterinary Services, Oceanographic Aquarium of the Ciudad de las Artes y las Ciencias, C/ Junta de Murs i Valls s/n, 46023 Valencia, Spain

Abstract

Dolphin morbillivirus (DMV) causes epizootic outbreaks with massive strandings of dolphins that present systemic viral infection. Between outbreaks no cases with systemic infection have been reported in the Mediterranean region, although animals with brain-localized infection have been found. We report three infected striped dolphins (*Stenella coreuleoalba*) stranded on the Spanish Mediterranean coast of Valencia after the termination of the last DMV infection outbreak early in 2011. Animals 1 and 2 were stranded late in 2011 and in 2013, respectively. They exhibited acute systemic morbillivirus infection (MI), confirmed by DMV detection in peripheral organs, whereas Animal 3 was stranded in 2014 and presented chronic systemic infection and typical MI lesions, but the antigen was restricted to the central nervous system. The nucleotide and amino acid sequences of viral phosphoprotein (P), nucleoprotein (N) and hemagglutinin (H) fragments, all characteristic of DMV, differed vastly between Animal 1 and Animals 2 and 3, whereas those for Animals 2 and 3 were identical. The P sequence of Animal 1 exhibited 100% identity with that of the virus that caused the 2011 DMV epizootics, whereas that of Animals 2 and 3 better resembled the P sequence of the strain that caused the 1990 epizootic than those of the 2007 and 2011 outbreaks. In summary, the findings of Animals 1, 2 and 3 suggest an endemic infection cycle given the systemic presentation within the striped dolphin population in the Mediterranean, whereas all three animals prove the coexistence of different viral strains that cause the pathology.

Keywords: Dolphin morbillivirus, interepizootic, striped dolphin, *Stenella coreuleoalba*

Corresponding author. Tel.: +34 913943702, Fax. +34 913943908. Email address: consuelo@sanidadanimal.info

Introduction

Cetacean morbillivirus (CeMV) is an enveloped negative-strand RNA virus classified in the genus *Morbillivirus* and in the family *Paramyxoviridae* (Kennedy 1998). Three main CeMV groups have been described: dolphin morbillivirus (DMV) (Domingo et al. 1990) and porpoise morbillivirus (PMV) (Kennedy 1998), which caused massive mortalities in dolphins and porpoises, respectively, while pilot whale morbillivirus (PWMV) (Taubenberger et al. 2000, Bellière et al. 2011a) was reported in only two pilot whales. CeMV can cause serious respiratory and central nervous system (CNS) disease in susceptible cetacean species, ultimately leading to strandings.

The first recognized morbilliviral epizootic in marine mammals occurred in 1987-88 on the Atlantic coast of the USA, when an estimated 50% of the bottlenose dolphin population (*Tursiops truncatus*) died (Lipscomb et al. 1994). In 1990, an epizootic in the Mediterranean Sea claimed around 1,000 Mediterranean striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) (Aguilar and Raga 1993). A third CeMV epizootic in the Gulf of Mexico led to the death of around 100 Atlantic bottlenose dolphins (Krafft et al. 1995, Lipscomb et al. 1996). Two more epizootics have occurred in the Mediterranean in 2007 and 2011, when more than 200 and 50 striped dolphins died, respectively (Raga et al. 2008, Keck et al. 2010, Rubio-Guerri et al. 2013). CNS-restricted morbilliviral infection has also been reported on the Italian Mediterranean coast in 2012 in several animals (Mazzariol et al. 2012, Di Guardo et al. 2013, Mazzariol et al. 2013).

Previous comparisons of both the P sequences of the 1990 DMV Spanish strain

and the DMVs responsible for the 2007 and 2011 outbreaks indicate that the DMV strain that caused the 2011 outbreak was closely related to the strain that caused the 2007 outbreak, and that the latter evolved from the 1990 DMV strain. These findings suggest a Mediterranean lineage and the origin of the 2007 and 2011 strains (Bellière et al. 2011b).

We now report DMV acute systemic infection in two striped dolphins stranded in the Mediterranean Sea in 2011 and 2013, and chronic systemic DMV infection in another dolphin stranded in 2014. The analyses of viral sequences revealed two different viral strains, the one in the dolphin stranded in 2011 corresponded to the 2011 outbreak, whereas the other two corresponded to a reservoir which was closer to the 1990 outbreak. This raises the possibility of a future epizootic with another separately-evolving viral strain.

Material and methods

Animal description

Animal 1 was stranded at the end of July 2011, 3 months after the end of the 2011 DMV epizootic. It was a moribund adult female striped dolphin stranded on the Spanish Mediterranean coast at Alicante (coordinates, 38°11'32.26"N, 0°33'18.75"W). The animal died 30 minutes after rescue services arrived. Animal 2, stranded in October 2012, was a young male striped dolphin found at Alcossebre (40°14'44.75"N, 0°16'34.14"E). The third dolphin, an adult male striped dolphin, was stranded alive in the middle of July 2014 at Nules (39°50'41.69"N, 0° 5'56.50"O). The animal presented soft neurological symptoms (tremors) at the time of stranding.

All the above locations are on the Spanish Mediterranean coast.

Necropsy and tissue sampling

Necropsies were performed following the European Cetacean Society protocols (Kuiken and García-Hartmann 1991) within or less than 24 h from stranding in all three animal cases. Fresh tissue samples (brain, lung, kidney, liver, lymph node, tonsils, thymus, urinary bladder, spleen and skin) were refrigerated for microbiology. Tissue samples were frozen for molecular diagnosis purposes.

Histopathology and immunohistochemistry

Fresh tissue samples were fixed in 10% neutral buffered formalin, processed for histopathology, and stained with hematoxylin and eosin following standard procedures. Immunohistochemistry (IHC) was performed on selected samples (lung and brain) using an IgG2B-isotype monoclonal antibody against the Canine Distemper Virus (CDV) nucleoprotein (CDV-NP; VMRD®, Inc., U.S.A.).

Virus isolation and electron microscopy

The virus was grown in Vero cells using the alpha modification of Eagle's minimum essential medium supplemented with Earle's salts, L-glutamine and 10% fetal bovine serum (FBS). Samples from sick and healthy animals were run in parallel. Cells were seeded in a 6-well plate, and were infected with 200 µl of centrifuged and 0.22 µm of sterile-filtered lung homogenates. When virus-specific cytopathic effects (CPE) were observed (after 4 passages), cells were scraped gently from Petri dishes and decanted into a conical centrifuge tube for centrifugal harvesting (10 min at 1000 g). A cell pellet was used

for transmission electron microscopy (EM) and the CeMV molecular diagnosis (as above).

For EM visualization, cells were first fixed in 2% glutaraldehyde, followed by 2% osmium tetroxide, and with both cases in Sorensen's phosphate buffer, pH 7.3. They were then dehydrated using graded solutions of ethanol to be processed in propylene oxide and embedded in Epon. A JeolJEM 1010 transmission electron microscope was used at the EM service of the Complutense University of Madrid.

Molecular diagnosis and phylogenetic analysis

For the DMV molecular diagnoses, frozen tissues were homogenized at room temperature in a Bullet Blender™ (Next Advance, Inc., Averill Park, NY, USA). RNA was eluted in 60 µL of RNase-/DNase-free water with the NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. The published Universal Probe Library (UPL) RT-PCR assay, which targets the fusion protein, was run to identify dolphin morbillivirus (DMV)-positive tissue (Rubio-Guerri et al. 2012). This real-time PCR (RT-PCR) assay was first performed on the tissue samples normally used to detect CeMV (brain, skin, kidney, lung, tonsils, prescapular and pulmonary lymph nodes), and subsequently on other collected tissues (liver, mesenteric lymph node, pancreas, heart, adrenal gland, cerebellum and thymus). Afterward, part of the phosphoprotein gene (P) (Barrett et al. 1993, Yang et al. 2006), a region of the nucleoprotein gene (N) (van de Bildt et al. 2005) and hemagglutinin protein (H) (Bellière et al. 2011a) were amplified by conventional RT-PCRs assays according to published protocols from the positive lung samples (Animals 1 and 2) and the brain

sample (Animal 3) to characterize the CeMV strain. The RNA extracted from the brain of a DMV-positive striped dolphin stranded in 2007 on the Spanish Mediterranean coast was used as a positive control. Nuclease-free water served as a negative control in these RT-PCRs.

The DNAs of the PCR-amplified amplified P (Barrett et al. 1993, Yang et al. 2006), N (van de Bildt et al. 2005) and H gene sequences (Bellière et al. 2011a) were purified with the QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Hilden, Germany) and sequenced in an ABI Prism 3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) sequencer. The obtained sequences were compared to all the sequences for CeMV morbillivirus and for the other reported morbillivirus species deposited in the GenBank using BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

A phylogenetic analysis was carried out with the MEGA 4.0 software (Tamura et al. 2011). P-distance matrices were calculated and tree topology was inferred by the neighbor-joining method based on p-distances. Topology reliability was tested by bootstrapping 2000 replicates generated with a random seed. The P sequences obtained from Animal 1 and Animals 2-3 were aligned by ClustalX to check the differences between both nucleotide sequences.

Results

Macroscopic results

The main gross findings detected while performing the necropsy of Animal 1 were multifocal pulmonary atelectasis in lungs, and tonsil enlargement and severe hypertrophy of pulmonary and prescapular lymph nodes. In Animal 2 the gross necropsy findings were confined mainly to the lungs, meninges and lymphoid tissue. The pulmonary parenchyma was diffusely

mottled pale gray to dark red with surface rib impressions, which are suggestive of interstitial pneumonia. Meninges were diffusely congested and prescapular lymph nodes were enlarged. In Animal 3, focal collapse in left lung and a small crackled area were observed. Pulmonary lymph nodes were enlarged and one contained a necrotic area.

Microscopic results

The main microscopic lesions observed in Animal 1 were found in the lungs, which showed interstitial pneumonia with multinucleated giant cells and syncytial cells. Lymphoid depletion was observed in the spleen and pulmonary lymph nodes, with a considerably decreased lymphoid population not only along the periarteriolar sheaths, but also in the cortical, paracortical and medullar cords in the examined lymph nodes (i.e., pulmonary, prescapular, mesenteric).

Animal 2 presented the most severe microscopic lesions in lungs and brain. Lungs showed severe multifocal interstitial bronchopneumonia with intralesional inclusion bodies. In multifocal terms, the alveolar spaces contained numerous lymphocytes, plasma cells, macrophages, and many large polygonal cells with up to seven nuclei (syncytia), and fibrin and protein fluid in over 40% of the pulmonary parenchyma. Within syncytia, macrophages and some type II pneumocytes contained intracytoplasmic and intranuclear acidophilic 4-7 micron ovoid inclusions. The adjacent alveolar septae were moderately thickened with inflammatory cells and plump fibroblasts. In multifocal terms, many septae were segmentally lined by enlarged type II pneumocytes and rare syncytial cells. The lesions in the cerebrum were predominantly located in the cerebral cortex and were characterized by multifocal

neuronal necrosis, lymphoplasmacytic perivascular cuffing, random aggregates of lymphocytes, plasma cells, gitter cells and reactive astrocytes. No inclusion bodies were apparent in the nervous tissue. In addition to lung and brain lesions, lymphoid depletion was evident in the spleen and pulmonary lymph nodes. Lymph node cortices were markedly thin and devoid of lymphocytes. Medullary sinuses contained numerous foamy macrophages and syncytial cells with up to five nuclei.

Finally, Animal 3 had lymphoplasmocytic and histiocytic interstitial bronchopneumonia with fibrosis, moderate multifocal edema and a focal granuloma. In the lymph nodes, marked diffused lymphoid depletion was observed with edema and moderate diffuse histiocytosis. The most important finding was in the brain, where a multifocal lymphoplasmocytic and histiocytic meningoencephalitis was observed with perivascular cuffing.

Given the presence of lesions suggestive of morbillivirus, IHC for morbilliviral antigens was performed on brain, lung, kidney, urinary bladder, stomach and intestine in Animal 1, on lung and cerebrum in Animals 2 and 3.

In Animal 1, positivity was detected in the syncytial cells and giant cells of the affected lung areas, and also in brain glial cells and astrocytes. These tissues showed moderate positive intracytoplasmic and intranuclear immunoreactions (Fig.1A). Positive immunostaining was seen in alveolar pneumocytes, intra-alveolar and interstitial macrophages, and syncytial cells (Fig. 1B and 1C). Mild immunopositivity was found in urinary bladder and kidney.

In Animal 2, immunopositivity was observed in the cytoplasm of syncytial cells, type II pneumocytes and macrophages within pulmonary tissue (Fig. 1D, E), and

also within neurons (Fig. 1F) and gitter cells in the cerebrum.

In Animal 3, immunopositivity was detected in the brain, but not in pulmonary lesions. Neuronal bodies and dendrites were strongly reactive against the morbillivirus antigen (Fig 1G, H, I)

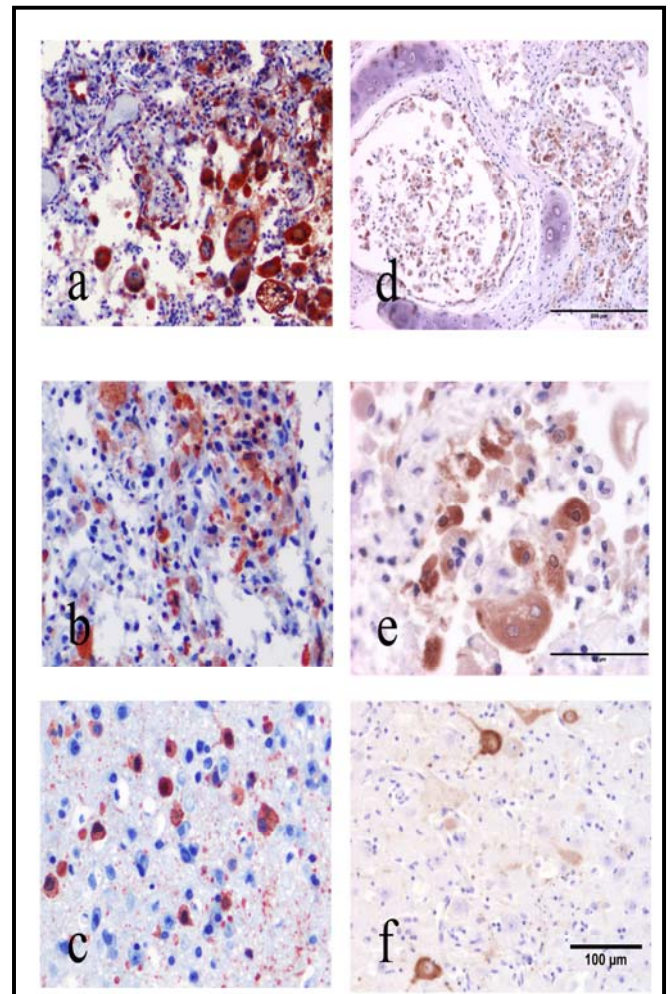


Figure 1: Immunohistochemistry of the striped dolphins: Animal 1 a. Lung (CMV IHC) (x20), b. Prescapular lymph node (CMV IHC)(x40), c. Cerebrum (CMV IHC) (x40) ; Animal 2 d. Lung (CDV IHC), e. Cerebrum (CMV IHC); Animal 3, f. Cerebrum (CMV IHC), immunopositive neurons.

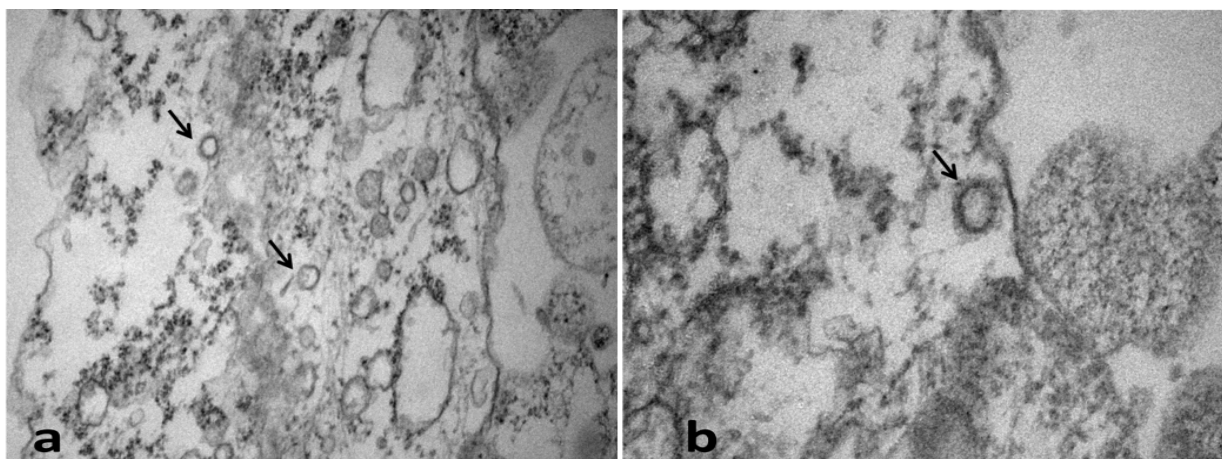


Figure 2: Transmission electron microscopy. Morbillivirus particles (arrows) in a Vero cells suspension a. (x80); b. (x150)

Electron microscopy of DMV-infected Vero cells

The electron micrographs show the patterns by which CeMV particles emerged from infected cells. For comparison purposes, (Fig. 2A) shows a portion of an uninfected Vero cell with small microvilli and a few irregular bulbous protuberances. The particles that emerged from the smooth surface are shown at a high magnification in (Fig. 2B) with a corresponding thin section from the transmission electron microscopy. This is the first observation by EM of cetacean morbillivirus.

Molecular and phylogenetical results

In Animals 1 and 2, all the samples were strongly positive for the viral sequences by the UPL RT-PCR and conventional PCR (Barrett et al. 1993). However in Animal 3, only the samples from the nervous system were strongly positive by the UPL RT-PCR and conventional methods. Subsequent Sanger sequencing of the amplicon confirmed the viral sequences.

The sequence of the P gene product of Animal 1 (Fig. 3) was identical to the

corresponding sequence of the virus of the 2011 Spanish outbreak, but exhibited some differences with the sequence of the 1990 Spanish outbreak (respective p-distances of both 0.000 and 0.025). The reverse was the case for the P-sequences of Animals 2 and 3 (GenBank KC572861.1), which were identical to each other since they were closer to the viral sequence of the 1990 outbreak than to that of the 2007 and 2011 outbreaks (Fig. 3); and p-distances for the P-sequence of 0.01 for the 2007 DMV Spanish strain (GenBank EU039963); a p-distance of 0.01 for the 1990 DMV Spanish strain (GenBank AJ608288); a p-distance of 0.02 for the 2011 DMV Spanish strain (GenBank JN210891). The p-distance between the Animal 1 and the Animal 2-3 sequences was 0.02. We were able to compare only this protein with the 2011 DMV outbreak. The phylogenetic trees prepared to compare the sequences obtained in the P, N and H genes seemed to indicate that the Animal 2 and 3 sequences fell between the 1990 and 2007 DMV strains (Fig. 3). However, the strain identified in Animal 1 fell within the DMV group of sequences, and the sequence was 97% and 100% similar, respectively, to the DMV responsible for the 2007 and 2011 outbreaks (Fig. 3). Hence the Animal 2 and 3 strains, named herein strain 2012 DMV,

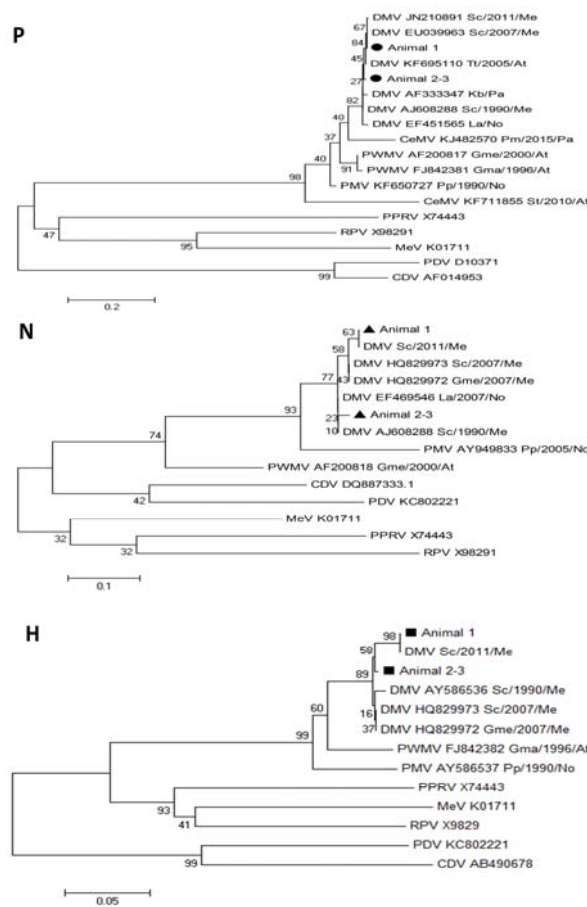


Figure 3: Phylogenetic analysis. Neighbor-joining phylogram of morbillivirus phosphoprotein (P), nucleoprotein (N) and hemagglutinin (H) gene sequences. The name of each sequence is composed of the virus name (CeMV, cetacean morbillivirus; DMV, dolphin morbillivirus; PMV, porpoise morbillivirus; PWMV, pilot whale morbillivirus; PPRV, peste-des-petits-ruminants virus; RPV; rinderpest virus; CDV, canine distemper virus; PDV, phocine distemper virus; MeV, measles virus), the GenBank accession number, the infected cetacean species (Gma, *Globicephala macrorhynchus*; Gme, *Globicephala melas*; Kb, *Kogia breviceps*; La, *Lagenorhynchus australis*; Pp, *Phocoena phocoena*; Sc, *Stenella coeruleoalba*; St, *Sotalia guianensis*; Tt, *Tursiops truncatus*), and the year and geographic area of stranding (At, Atlantic Ocean; Me, Mediterranean Sea; No, North Sea; Pa, Pacific). Animals 1, 2 and 3 are the sequences obtained from the lungs (Animals 1 and 2) and brain (Animal 3) samples from the dolphins in the present case report.

found in this study seemed to relate more to the 1990 strain than to the 2007 and 2011 DMV strains (Fig. 3). The alignment of the P sequences from Animal 1 and Animals 2-3 showed six different nucleotides among them (Figure 4).

Discussion

The results of this study indicate that these three striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*), which were stranded in 2011, 2012 and 2014, died of a severe infectious disease, which caused serious bronchointerstitial pneumonia, multifocal encephalitis and lymphoid depletion. The morphology and severity of lesions were consistent with acute systemic morbillivirus infection and disease in Animals 1 and 2, and the antigen was demonstrated by molecular techniques and immunohistochemistry. However in Animal 3, the chronicity of pneumonia and encephalitis, together with the presence of the antigen only in cerebral tissue, are suggestive of chronic systemic morbillivirus infection (Van Bressemer et al. 2014). Therefore, these animals appear to be the first three cases of acute and chronic systemic DMV infections between epizootics in the Mediterranean Sea. The phylogenetic analyses showed the cause to be a different DMV strain. The DMV strain found in Animals 2 and 3 also seemed to be a DMV strain that differed from the previous DMV strains detected in the former Mediterranean outbreaks of 1990, 2007 and 2011. Finally, the first electron microscopy images of DMV are presented in this report.

The systemic form of DMV has been observed in around 1000 striped dolphins in 1990 in the Spanish Mediterranean Sea (Aguilar and Raga 1993). Between 1991-1994, only the localized form of DMV has been found in striped dolphins, exclusively in the CNS (Domingo et al. 1995). Systemic

CAPÍTULO III. Resultados

Objetivo 1: Avance en el conocimiento del morbillivirus de los cetáceos (CeMV)

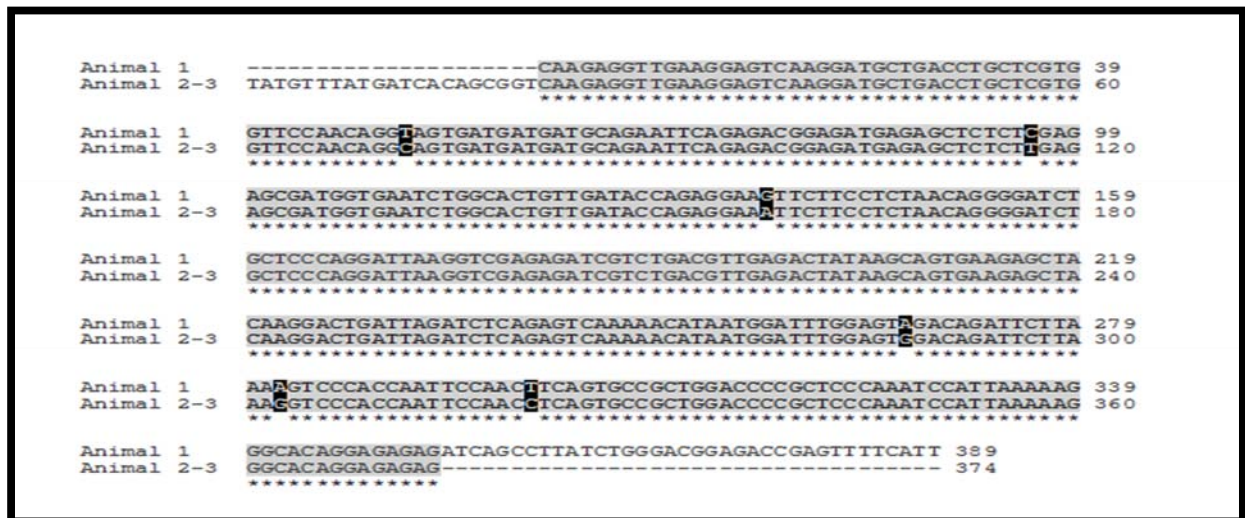


Figure 4: Multiple alignment between Animal 1 and the 2-3 P sequences. The similar regions are hatched in gray. The different nucleotides are hatched in black.

DMV has been reported again in striped dolphins during another epizootic in the western Mediterranean Sea from July to December 2007, after which it gradually disappeared from the Spanish Mediterranean coast (Soto et al. 2011b). Subsequently, localized forms of DMV infection restricted to the CNS have been reported on the Mediterranean coasts of Spain (Soto et al. 2011a) and Italy (Mazzariol et al. 2012). These studies have provided evidence that DMV does not circulate in striped dolphins between the 2007 and 2011 epizootics in the Mediterranean Sea (Soto et al. 2011a), but suggest that DMV has not been established in an endemic infection cycle among western Mediterranean striped dolphins (Soto et al. 2011b). However, the present report describes an acute systemic form of DMV in two striped dolphins after the 2011 epizootic (Rubio-Guerri et al. 2013) and a chronic systemic form in one striped dolphin in 2014. This chronic systemic infection could occur when the animal has recently overcome the disease, and when lesions are still present, but the antigen is restricted to the CNS. Therefore, we believe that these cases genuinely represent viral circulation in the Mediterranean Sea outside an outbreak.

These cases of isolated dolphins with DMV systemic infection outside an epidemic outbreak reported herein recommend surveilling stranded dolphins for such systemic presentations rather than localized presentations, which were believed to occur outside epidemic outbreaks. This should include not only an assay of the virus in an extended repertoire of tissues by sensitive and specific detection techniques, but also viral sequencing to identify new viral variants that can herald incoming outbreaks and to relate the identified virus with previous isolates.

These cases offer the possibility of an as yet unrecognized endemic infection cycle in the Mediterranean striped dolphin population. The fact that stranding took place on the coast of the Valencian Community, the same coast where the previous three DMV epizootics started, clearly suggests that this region is perhaps a local reservoir of DMV. The sequencing of Animal 1 revealed that infecting DMV was the same in the present case as in the three previous epidemic outbreaks. This strongly suggests that the virus remains in the Mediterranean Sea between outbreaks rather than starting anew in the Mediterranean in each outbreak.

The comparison made by molecular studies based on larger fragments of the DMV genome of the sequences obtained from the striped dolphins from the three previous outbreaks in the Mediterranean Sea indicated that these outbreaks were caused by a similar viral strain, probably of Mediterranean origin (Bellière et al. 2011b, Rubio-Guerri et al. 2013). Previous studies, based on the P gene (Rubio-Guerri et al. 2013), have evidenced that the 2011 DMV Spanish strain came from the 2007 DMV Spanish strain and that, at the same time, it may be of Mediterranean origin from the 1990 DMV Spanish strain based on 9050 bp (Bellière et al. 2011b). Based on these previous results, the strain detected in this case in Animals 2 and 3 in 2012 and 2014 is expected to come closer to the 2011 strain than to the 2007 and 1990 strains, which occurred with Animal 1. However our phylogenetic results of proteins P, N and H prove that it seems to belong to a different cluster than to the 1990, 2007 or 2011 one, and that all these strains form the same set of Mediterranean DMV strains.

In summary, it is conceivable that DMV might circulate in striped dolphins and cause systemic infections in the western Mediterranean during interepizootic periods. Based on the sequences obtained from Animals 2 and 3, it is also plausible that a different DMV strain currently circulates in Mediterranean striped dolphins. Further research is warranted to test this possibility, and to define how the virus circulates and causes epidemics in the Mediterranean Sea.

Aknowledges

The authors thank Belen Rivera and Rocío Sánchez for technical assistance. This work has been supported by a collaborative agreement that involved the Conselleria de Infraestructuras, Territorio y Medio Ambiente of Valencia, the Oceanographic Aquarium of the Ciudad de las Artes y las

Ciencias of Valencia and the VISAVET Center of the Complutense University of Madrid. This work has been cofinanced by Project CGL2009-08125 of the Spanish National Research Plan. Mar Melero is the recipient of a PhD student grant from the Complutense University of Madrid. Consuelo Rubio is the recipient of a FPU grant from the Spanish Ministry of Education.

References

- AGUILAR, A., ANDJ. A. RAGA. 1993. The striped dolphin epizootic in the Mediterranean Sea. *Ambio*: 524-528.
- BARRETT, T., I. K. VISSER, L. MAMAEV, L. GOATLEY, M. F. VAN BRESSEM, ANDA. D. OSTERHAUST. 1993. Dolphin and porpoise morbilliviruses are genetically distinct from phocine distemper virus. *Virology* 193: 1010-1012.
- BELLIÈRE, E. N., F. ESPERÓN, A. FERNANDEZ, M. ARBELO, M. J. MUNOZ, ANDJ. M. SANCHEZ-VIZCAINO. 2011a. Phylogenetic analysis of a new Cetacean morbillivirus from a short-finned pilot whale stranded in the Canary Islands. *Res Vet Sci* 90: 324-328.
- BELLIÈRE, E. N., F. ESPERON, ANDJ. M. SANCHEZ-VIZCAINO. 2011b. Genetic comparison among dolphin morbillivirus in the 1990-1992 and 2006-2008 Mediterranean outbreaks. *Infect. Genet. Evol.* 11: 1913-1920.
- DI GUARDO, G., C. E. DI FRANCESCO, C. ELEN, C. COCUMELLI, F. SCHOLL, C. CASALONE, S. PELETTI, W. MIGNONE, C. TITTARELLI, F. DI NOCERA, L. LEONARDI, A. FERNANDEZ, F. MARCER, ANDS. MAZZARIOL. 2013. Morbillivirus infection in cetaceans stranded along the Italian coastline: pathological, immunohistochemical and

- biomolecular findings. Res Vet Sci 94: 132-137.
- DOMINGO, M., L. FERRER, M. PUMAROLA, A. MARCO, J. PLANA, S. KENNEDY, M. MCALISKEY, AND B. K. RIMA. 1990. Morbillivirus in dolphins. Nature 348: 21.
- DOMINGO, M., M. VILAFRANCA, J. VISA, N. PRATS, A. TRUDGETT, AND I. VISSER. 1995. Evidence for chronic morbillivirus infection in the Mediterranean striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*). Vet. Microbiol. 44: 229-239.
- GRANT, R. J., A. C. BANYARD, T. BARRETT, J. T. SALIKI, AND C. H. ROMERO. 2009. Real-time RT-PCR assays for the rapid and differential detection of dolphin and porpoise morbilliviruses. J Virol Methods 156: 117-123.
- KECK, N., O. KWIATEK, F. DHERMAIN, F. DUPRAZ, H. BOULET, C. DANES, C. LAPRIE, A. PERRIN, J. GODENIR, L. MICOUT, AND G. LIBEAU. 2010. Resurgence of Morbillivirus infection in Mediterranean dolphins off the French coast. Vet Rec 166: 654-655.
- KENNEDY, S. 1998. Morbillivirus infections in aquatic mammals. J. Comp. Pathol. 119: 201-225.
- KRAFFT, A. E., J. H. LICHY, T. P. LIPSCOMB, B. A. KLAUNBERG, S. KENNEDY, AND B. K. TAUBENBERGER. 1995. Postmortem diagnosis of morbillivirus infection in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Atlantic and Gulf of Mexico epizootics by a polymerase chain reaction-based assay. J Wildl. Dis.: 410-415.
- KUIKEN, T., AND M. GARCÍA-HARTMANN. 1991. Dissection techniques and tissue sampling. In Proceedings: Proceedings of the first ECS workshop on Cetacean pathology European Cetacean Society. pp.
- LIPSCOMB, T. P., S. KENNEDY, D. MOFFETT, A. KRAFFT, B. A. KLAUNBERG, J. H. LICHY, G. T. REGAN, G. A. WORTHY, AND B. K. TAUBENBERGER. 1996. Morbilliviral epizootic in bottlenose dolphins of the Gulf of Mexico. J. Vet. Diagn. Invest. 8: 283-290.
- LIPSCOMB, T. P., F. Y. SCHULMAN, D. MOFFETT, AND S. KENNEDY. 1994. Morbilliviral disease in Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the 1987-1988 epizootic. J. Wildl. Dis. 30: 567-571.
- MAZZARIOL, S., F. MARCER, W. MIGNONE, L. SERRACCA, M. GORIA, L. MARSILI, G. DI GUARDO, AND C. CASALONE. 2012. Dolphin Morbillivirus and *Toxoplasma gondii* coinfection in a Mediterranean fin whale (*Balaenoptera physalus*). BMC Vet. Res. 8: 20.
- MAZZARIOL, S., S. PELETTI, A. MONDIN, C. CENTELLEGGHE, G. DI GUARDO, C. E. DI FRANCESCO, C. CASALONE, AND P. L. ACUTIS. 2013. Dolphin morbillivirus infection in a captive harbor seal (*Phoca vitulina*). J Clin Microbiol 51: 708-711.
- RAGA, J. A., A. BANYARD, M. DOMINGO, M. CORTEYN, M. F. VAN BRESSEM, M. FERNANDEZ, F. J. AZNAR, AND T. BARRETT. 2008. Dolphin morbillivirus epizootic resurgence, Mediterranean Sea. Emerg. Infect. Dis. 14: 471-473.
- RUBIO-GUERRI, C., M. MELERO, F. ESPERON, E. N. BELLIERE, M. ARBELO, J. L. CRESPO, E. SIERRA, D. GARCIA-PARRAGA, AND J. M. SANCHEZ-VIZCAINO. 2013. Unusual striped dolphin mass mortality episode related to cetacean morbillivirus in the Spanish

- Mediterranean Sea. BMC Vet Res 9: 106.
- RUBIO-GUERRI, C., M. MELERO, B. RIVERA-ARROYO, E. N. BELLIÈRE, J. L. CRESPO, D. GARCÍA-PÁRRAGA, F. ESPERÓN, ANDJ. M. SÁNCHEZ-VIZCAÍNO. 2012. Simultaneous diagnosis of Cetacean morbillivirus infection in dolphins stranded in the Spanish Mediterranean sea in 2011 using a novel Universal Probe Library (UPL) RT-PCR assay. Vet. Microbiol.: 10.1016/j.vetmic.2012.1012.1031.
- SOTO, S., A. ALBA, L. GANGES, E. VIDAL, J. A. RAGA, F. ALEGRE, B. GONZALEZ, P. MEDINA, I. ZORRILLA, J. MARTINEZ, A. MARCO, M. PEREZ, B. PEREZ, A. PEREZ DE VARGAS MESAS, R. MARTINEZ VALVERDE, ANDM. DOMINGO. 2011a. Post-epizootic chronic dolphin morbillivirus infection in Mediterranean striped dolphins *Stenella coeruleoalba*. Dis Aquat Organ 96: 187-194.
- SOTO, S., R. GONZALEZ, F. ALEGRE, B. GONZALEZ, P. MEDINA, J. A. RAGA, A. MARCO, ANDM. DOMINGO. 2011b. Epizootic of dolphin morbillivirus on the Catalanian Mediterranean coast in 2007. Vet Rec 169: 101.
- TAMURA, K., D. PETERSON, N. PETERSON, G. STECHER, M. NEI, ANDS. KUMAR. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol 28: 2731-2739.
- TAUBENBERGER, J. K., M. M. TSAI, T. J. ATKIN, T. G. FANNING, A. E. KRAFFT, R. B. MOELLER, S. E. KODSI, M. G. MENSE, ANDT. P. LIPSCOMB. 2000. Molecular genetic evidence of a novel morbillivirus in a long-finned pilot whale (*Globicephalus melas*). Emerg Infect Dis 6: 42-45.
- VAN BRESSEM, M. F., P. J. DUIGNAN, A. BANYARD, M. BARBIERI, K. M. COLEGROVE, S. DE GUISE, G. DI GUARDO, A. DOBSON, M. DOMINGO, D. FAUQUIER, A. FERNANDEZ, T. GOLDSTEIN, B. GRENFELL, K. R. GROCH, F. GULLAND, B. A. JENSEN, P. D. JEPSON, A. HALL, T. KUIKEN, S. MAZZARIOL, S. E. MORRIS, O. NIELSEN, J. A. RAGA, T. K. ROWLES, J. SALIKI, E. SIERRA, N. STEPHENS, B. STONE, I. TOMO, J. WANG, T. WALTZEK, ANDJ. F. WELLEHAN. 2014. Cetacean morbillivirus: current knowledge and future directions. Viruses 6: 5145-5181.
- VAN DE BILDT, M. W., T. KUIKEN, ANDA. D. OSTERHAUS. 2005. Cetacean morbilliviruses are phylogenetically divergent. Arch Virol 150: 577-583.
- YANG, W. C., V. F. PANG, C. R. JENG, L. S. CHOU, ANDL. L. CHUEH. 2006. Morbilliviral infection in a pygmy sperm whale (*Kogia breviceps*) from Taiwanese waters. Vet. Microbiol. 116: 69-76.

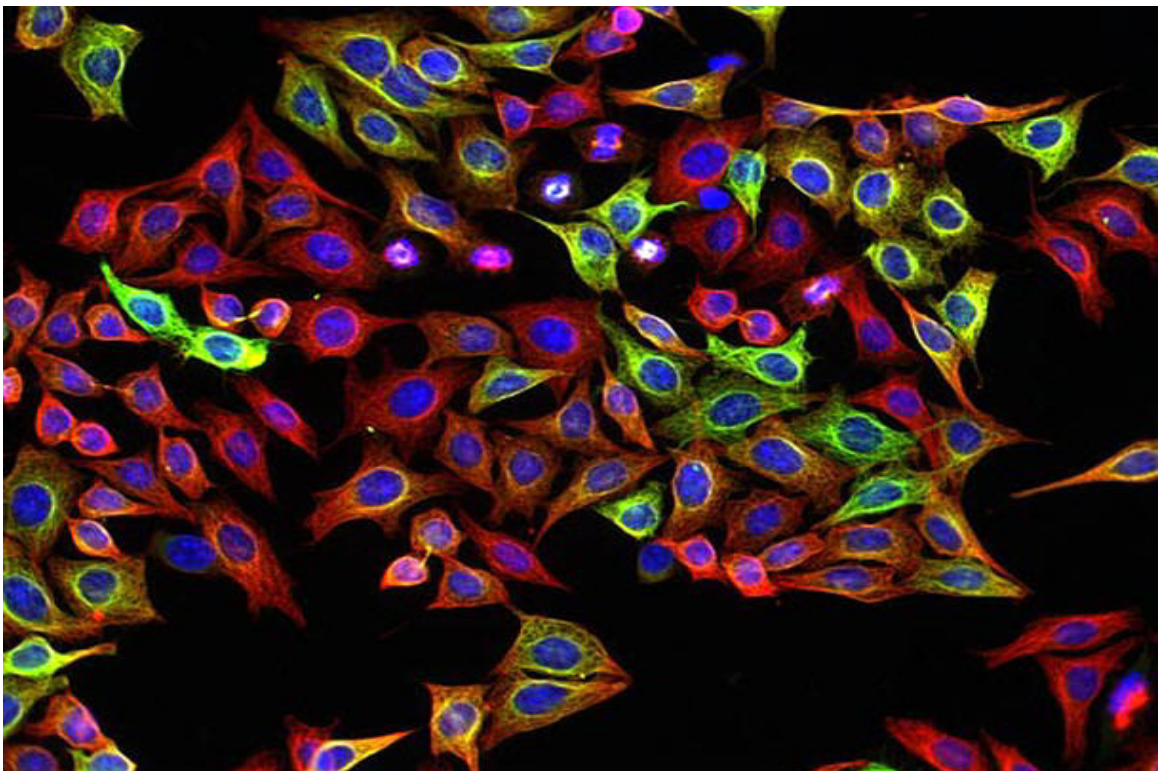
CAPÍTULO III. Resultados

Objetivo 1: Avance en el conocimiento del morbilivirus de los cetáceos (CeMV)

Objetivo 2:

Identificación de nuevos virus en cetáceos.

**Adenovirus: clínica, diagnóstico, filogenia y
aislamiento viral.**



Objetivo 2: Identificación de nuevos virus en cetáceos.

Adenovirus: clínica, diagnóstico, filogenia y aislamiento viral

Los adenovirus como se ha comentado anteriormente son patógenos comunes en todos los vertebrados incluidos los humanos. Sin embargo en mamíferos marinos, los adenovirus se han asociado a hepatitis letal en leones marinos. En cambio en cetáceos solo se ha descrito en unos pocos casos y además no hay asociación entre la detección y patología, además de sólo existir una secuencia de adenovirus en un *P. phocoena* pero sin ninguna publicación asociada.

En este objetivo se detectó un nuevo adenovirus en cuatro *T. truncatus* en cautividad con gastroenteritis autolimitante. Estos animales presentaban anorexia, vómitos y diarrea. Ya que estos signos clínicos suelen estar asociados a una enfermedad viral, se descartaron varias enfermedades virales que suelen producir gastroenteritis en otras especies como son coronavirus, parvovirus, rotavirus y *Cryptosporidium*. Además, se realizaron pruebas serológicas para la detección de anticuerpos frente a parvovirus, parainfluenza, coronavirus, influenza A, adenovirus y *Leptospira interrogans*. En los animales con síntomas se encontraron anticuerpos frente a adenovirus canino (CAV-1 y CAV-2). Es por ello que se realizaron pruebas moleculares para la detección de adenovirus a partir de las heces. Se detectó el virus mediante: amplificación de PCR en heces; secuenciación parcial de los genes de la polimerasa y del hexón; replicación del virus en células HeLa (confirmándolo mediante inmunofluorescencia, PCR de la polimerasa y del hexón y secuenciación de los fragmentos amplificados). Al no encontrar adenovirus en ninguno de los 10 delfines que compartían piscina con los animales enfermos, siendo asintomáticos y seronegativos a CAV-1 y CAV-2, y al no encontrar ningún otro agente etiológico en los animales enfermos, se concluyó que adenovirus podría ser el causante de esta gastroenteritis. Además, la eliminación del virus por las heces cesó en los 4 delfines a los pocos días de haber desaparecido los signos clínicos. Respecto a las secuencias obtenidas en estos animales se observó que los fragmentos amplificados de los genes de la polimerasa y del hexón estaban relacionados con la secuencia de adenovirus identificada en leones marinos y a la secuencia de *P. phocoena*.

Por todo esto, en este objetivo, hemos podido describir por primera vez adenovirus en cetáceos y además asociarlo con gastroenteritis autolimitante en delfines. Además, la ausencia de signos de hepatitis en los animales enfermos podría reflejar un tropismo del virus restringido al tejido gastrointestinal e incluso una virulencia distinta si lo comparamos con el adenovirus descrito

CAPÍTULO III. Resultados
Objetivo 2: Identificación de nuevos virus en cetáceos. Adenovirus: clínica, diagnóstico, filogenia y aislamiento viral.

en leones marinos, que da unos signos clínicos más agudos y que finaliza en una hepatitis fatal. Por último, el análisis filogenético de las secuencias reveló un posible origen común entre todos los adenovirus que afectan a mamíferos marinos. Con este hallazgo el conocimiento de la virología en los cetáceos es un poco más profundo y abre un frente nuevo para futuras investigaciones.

Artículos científicos:

- ❖ Rubio-Guerri, C.; García-Párraga, D.; Nieto-Pelegrin, E.; Melero, M.; Álvaro, T.; Valls, M.; Crespo, J.L.; Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2015) **Novel adenovirus detected in captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) suffering from self-limited gastroenteritis**, BMC Veterinary Research, 11:367.

Ponencias en congresos:

- ❖ Rubio-Guerri, C.; García-Párraga, D.; Nieto-Pelegrin, E.; Melero, M.; Valls, M.; Álvaro, T.; Crespo, J.L.; Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2014) **Novel adenovirus in captive bottlenose dolphins: diagnosis and phylogenetic analysis**.42th Symposium of the European Association for Aquatic Mammals. March 14th-17th , 2014, Tenerife, Spain
- ❖ Rubio-Guerri, C.; García-Párraga, D.; Nieto-Pelegrin, E.; Barros, C.; Melero, M.; Valls, M.; Álvaro, T.; Crespo, J.L.; Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2015) **Adenovirus: should be in the differential diagnosis of gastrointestinal disease in dolphins?**.46th Annual International Association for Aquatic Mammals conference. April 6th-10th 2015, Chicago, USA.

CASE REPORT

Open Access

Novel adenovirus detected in captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) suffering from self-limiting gastroenteritis

Consuelo Rubio-Guerri^{1*}, Daniel García-Párraga², Elvira Nieto-Pelegri¹, Mar Melero¹, Teresa Álvaro², Mónica Valls², Jose Luis Crespo² and Jose Manuel Sánchez-Vizcaino¹

Abstract

Background: Adenoviruses are common pathogens in vertebrates, including humans. In marine mammals, adenovirus has been associated with fatal hepatitis in sea lions. However, only in rare cases have adenoviruses been detected in cetaceans, where no clear correlation was found between presence of the virus and disease status.

Case presentation: A novel adenovirus was identified in four captive bottlenose dolphins with self-limiting gastroenteritis. Viral detection and identification were achieved by: PCR-amplification from fecal samples; sequencing of partial adenovirus *polymerase (pol)* and *hexon* genes; producing the virus in HeLa cells, with PCR and immunofluorescence detection, and with sequencing of the amplified *pol* and *hexon* gene fragments. A causative role of this adenovirus for gastroenteritis was suggested by: 1) we failed to identify other potential etiological agents; 2) the exclusive detection of this novel adenovirus and of seropositivity for canine adenoviruses 1 and 2 in the four sick dolphins, but not in 10 healthy individuals of the same captive population; and 3) the virus disappeared from feces after clinical signs receded. The partial sequences of the amplified fragments of the *pol* and *hexon* genes were closest to those of adenoviruses identified in sea lions with fatal adenoviral hepatitis, and to a Genbank-deposited sequence obtained from a harbour porpoise.

Conclusion: These data suggest that adenovirus can cause self-limiting gastroenteritis in dolphins. This adenoviral infection can be detected by serology and by PCR detection in fecal material. Lack of signs of hepatitis in sick dolphins may reflect restricted tissue tropism or virulence of this adenovirus compared to those of the adenovirus identified in sea lions. Gene sequence-based phylogenetic analysis supports a common origin of adenoviruses that affect sea mammals. Our findings suggest the need for vigilance against adenoviruses in captive and wild dolphin populations.

Keywords: Adenovirus, Cetacean, Bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*

Background

Adenoviruses are common pathogens of vertebrates [1] that were first discovered in human adenoids [2], and were soon identified as a cause of canine hepatitis [3]. These icosahedral non-enveloped, double-stranded DNA viruses have genomes that range from 26 to 45 kbp [4], and have been demonstrated in all vertebrate classes [1,5]. Most adenoviral species show quite restricted host specificity and tend to be associated with a typical pathology [5]; for example, human adenovirus (HAdV) C causes respiratory

disease and HAdV-D provokes conjunctivitis, whereas these two pathologies can also be the result of HAdV-B infection. In contrast, HAdV-F and HAdV-G produce gastroenteritis in most cases [1]. Similarly to human adenoviruses, other adenoviruses that affect mammals (forming the *Mastadenovirus* genus) have been reported to cause respiratory, ocular and gastrointestinal pathologies, although some present as hepatitis [3] or encephalitis as the chief manifestations [5].

In addition to their role in pathology, adenoviruses are very important vectors in the gene therapy of genetic disorders and cancer [6], as they can accommodate a large DNA cargo, exhibit tropisms for multiple organs and can be engineered to decrease virulence. Nonetheless, they still

* Correspondence: consuelo@sanidadanimal.info

¹VISAVET Center and Animal Health Department, Veterinary School, Complutense University of Madrid, Av Puerta del Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



present toxicity problems [7], which has led to investigation of the potential of using animal adenoviruses as vectors for gene delivery to humans [8-10]. In line with this, the identification of new animal adenoviruses, in addition to being interesting from an animal health perspective may be promising for gene therapy.

Sea lions are the only marine mammals in which adenoviruses have been recognized as pathogens. Adenovirus-like viral particles have been long since associated with hepatitis in stranded California sea lions (*Zalophus californianus*) [11,12]. More recently, a novel adenovirus (otarine adenovirus 1) was isolated from two stranded California sea lions with fatal hepatitis [13]. This adenovirus caused an outbreak of fatal hepatitis and enteritis in three captive sea lions of different species: California sea lion (*Zalophus californianus*), South African fur seal (*Arctocephalus pusillus*) and South American sea lion (*Otaria flavescens*) [14]. In rare cases, adenoviruses have been isolated from gastrointestinal samples of other marine mammals, including a sei whale (*Balaenoptera borealis*) [15], two bowhead whales (*Balaena mysticetus*) [16] and a beluga whale (*Delphinapterus leucas*) [17]. Serological studies in Canadian fauna have also revealed antibodies against canine adenovirus 2 in 17% of the walrus (*Odobenus rosmarus*) examined [18]. However, only in the case of sea lion hepatitis, has a clear association been established between the presence of virus and disease status. The partial sequence of the adenoviral DNA polymerase (*pol*) gene deposited in the Genbank (JN377908) was annotated as having been obtained from a harbour porpoise (*Phocoena phocoena*). However, there is no further information or referred publication available.

Here we identify a novel adenovirus in fecal samples of four captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) which presented with self-limiting gastroenteritis. Gastric lesions, ulceration and parasitism are common in captive and free-ranging dolphins [19-21]. However, reports of dolphin gastroenteritis are rare and the disease has never been associated with adenovirus. Pathological evidence for gastroenteritis has been reported [22] in two necropsies of common dolphins from the Black Sea (*Delphinus delphis ponticus*) that showed evidence of systemic infection with *Cetacean morbillivirus* infection. Nevertheless, infections with this virus do not typically manifest as gastroenteritis and instead affect primarily the lungs and brain [23]. Fatal gastroenteritis and toxic shock-like syndrome in dolphins has been attributed to enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* [24]. This animal concomitantly suffered brucellar osteomyelitis and was treated with antibiotics for nearly 1 year.

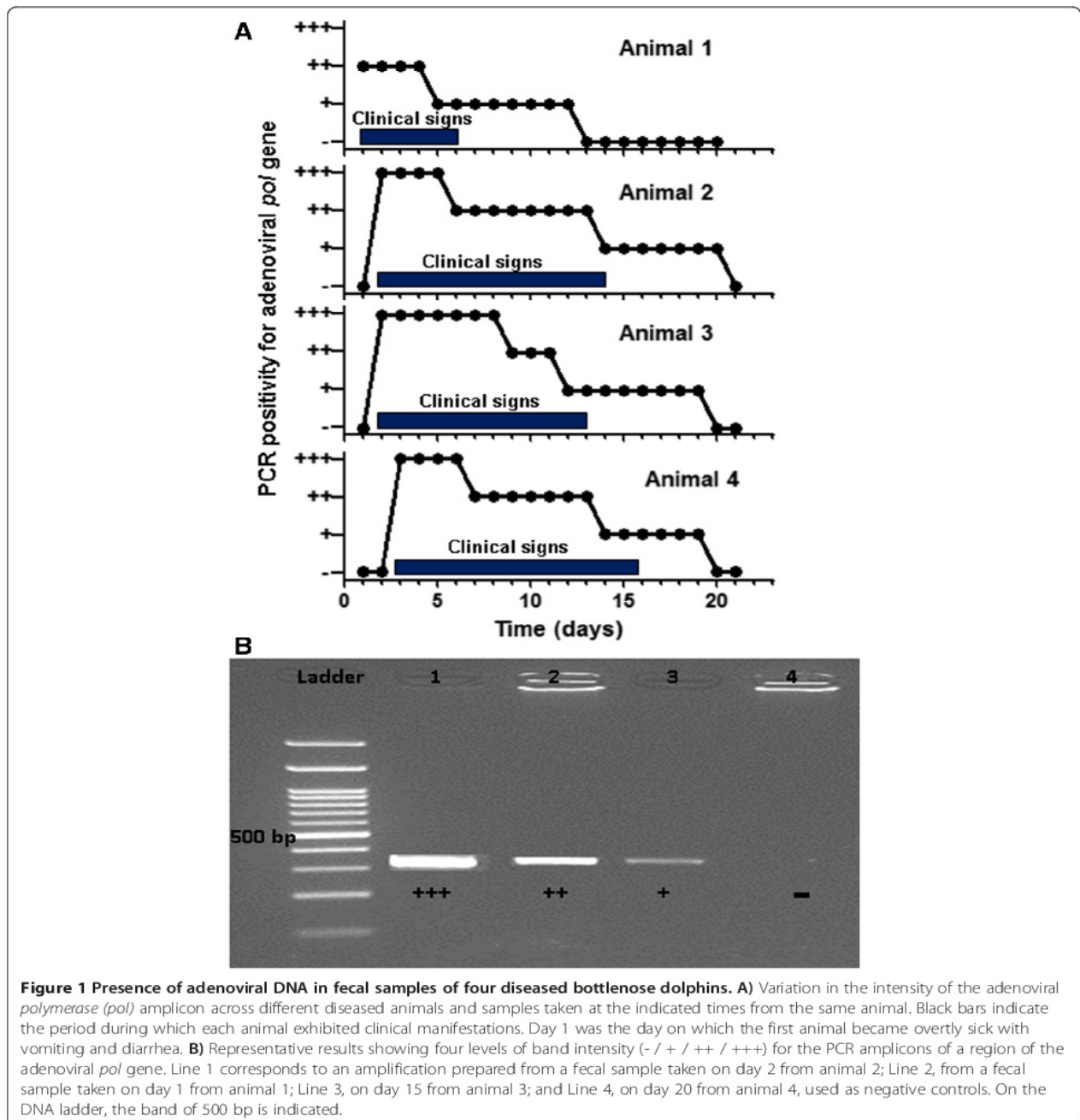
The present report describes several lines of evidence suggesting that adenovirus can be responsible for gastroenteritis in dolphins. Sequencing of PCR-amplified regions of adenoviral DNA (*pol*) and *hexon* genes revealed genetic

closeness, but was not identical with the previously deposited sequences of sea lions and harbour porpoise adenoviruses. This suggests a close common ancestral origin of these viruses in marine mammals.

Case presentation

At the end of September 2013, four captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in a total population of 14 individuals, all born at the Oceanográfico water park (www.cac.es/oceanografic) in the City of the Arts and the Sciences, Valencia (Spain), presented with anorexia, diarrhoea and vomiting. The four animals, aged 4-10 years, displayed no cough, respiratory disturbances or conjunctival infection. The other 10 dolphins in the same cohort remained healthy throughout this study. As soon as clinical signs became evident in the sick animals, they were isolated in a separate pool. The clinical signs of one dolphin (animal 1) appeared to be the mildest and it recovered in 1 week without treatment; in Figure 1A, the dark horizontal bar marks the period during which clinical manifestations were present. The other three dolphins (animals 2-4) were more severely affected and were administered oral rehydration therapy to compensate for fluid lost through vomiting and diarrhoea. They underwent longer disease-manifesting periods (Figure 1A). Day 1 was the day on which the first animal became overtly sick with vomiting and diarrhea.

Blood and fecal samples, obtained by rectal cannulation, were subjected to diagnostic tests. Animal sampling were conducted according to Spanish and European regulations (RD 53/2013, Directive 2010/63/UE) on animal welfare. No abnormalities were observed in the complete blood count, serum biochemistry or activity of serum enzymes such as aspartate and alanine aminotransferases. Blood samples gave negative serological results for several viruses (parvovirus, parainfluenza, coronavirus, influenza A) and for *Leptospira interrogans* (tests carried out by Penta Laboratories, Alicante, Spain). The microbiological analysis of feces performed at the Central Laboratory for Animal Health (Algete, Madrid, Spain) failed to reveal any bacterial pathogens using standard microbial growth assays in either sick or healthy animals. Fecal material also yielded negative results in a test for rotavirus antigen (Penta Laboratories) and in the fast immunoassays to detect canine parvovirus (VetScan Canine Parvovirus Rapid Test kit, Abaxis, Union City, CA, USA), bovine rotavirus, coronavirus and cryptosporidium (FASTest® D4T bovine; MEGACOR Diagnostik, Hörbranz, Austria), and in a real-time PCR (qPCR) assay for calicivirus [25]. The only differential finding between diseased and healthy animals was seropositivity for antibodies against canine adenoviruses 1 and 2 (ELISA kit D1003-AB01, European Veterinary Laboratory, The Netherlands) [26]. These antibodies were found exclusively in all four sick animals during the disease manifestation period (tested on days 2-4 of this period in animals 1-3, and on day 10 in animal 4). The other 10



healthy animals did not give a positive test (assayed on days 3-20 from the beginning of the outbreak; one animal was tested on both days 3 and 20). Before the outbreak, all 14 animals were seronegative for canine adenoviruses 1 and 2 (tested retrospectively on serum collected and kept frozen <4 months, usually around 2 months). Based on

retrospective sampling, one sick animal was negative 15 days before disease, and a healthy animal was negative 5 days before the beginning of the outbreak). These findings led us to search for adenoviruses in the fecal samples collected from all 14 animals in the cohort from the beginning of the outbreak. The feces of healthy animals were

collected daily the first 5 days of the outbreak and then every 5-10 days during the outbreak. Fecal sampling in the diseased animals was carried out daily for 21 days from the beginning of the outbreak and then every 5 days for another 10 days. Afterward fecal samples were collected from all animals every 15 days for 3 months.

To detect adenoviral DNA in feces, parts of the adenoviral DNA polymerase (*pol*) and *hexon* genes were PCR-amplified using degenerate consensus primers. For *pol* amplification, a previously described [27] nested PCR assay was performed exactly as reported, on 25 µl of the of amplification reaction. For the first PCR reaction 1 µg of DNA extracted from fecal samples with High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) was used as a template. The same volumes of PCR reaction and amount of DNA were used for the amplification of the *hexon* sequence, and previously reported PCR assay was followed exactly [28].

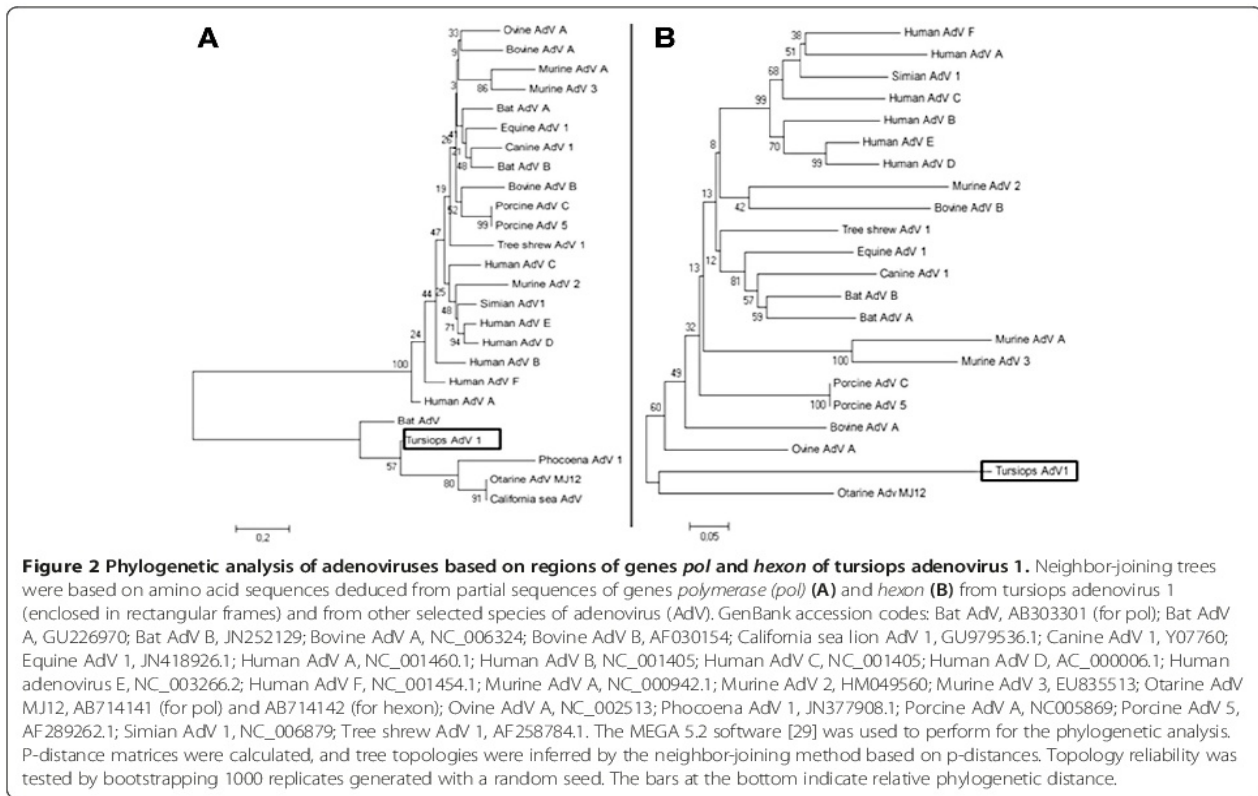
The results of these PCR assays were analyzed by agarose gel electrophoresis and staining with SYBR Safe stain (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). All sick animals were positive for the expected *pol* amplicon (320 bp) (Figure 1B) and the *hexon* amplicon (435 bp, not shown), while all healthy animals were negative for both. The identity of the amplified products was confirmed by purification (QIAquick PCR Purification kit, Qiagen, Hilden, Germany) and identified by Sanger sequencing (ABI Prism 3730, from Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using one of the consensus primers utilized in the amplification step as the sequencing primer.

Comparison of the amplification reactions on the same amounts of DNA from the fecal samples collected from different animals and from the same animal on distinct days revealed variable band intensities. These intensities could be visually graded semi-quantitatively as negative (-), low (+), intermediate (++) or high (+++) (shown for *pol* in Figure 1B). Figure 1A plots these intensities for the *pol* band in relation to the presence of disease manifestations in each animal. Band intensity was strongest as soon as clinical signs were patent, and they remained at this initial high level for 4-7 days, finally decreasing before clinical signs subsided. The signal decreased to the lowest level around the same time as the clinical signs disappeared. Nevertheless, the virus remained detectable at low levels in feces for approximately 1 week after animals no longer manifested clinical signs. This suggests that, in order to prevent contagion, isolation of diseased animals should continue at least for 1 week after clinical cure. It is noteworthy that the animal with the mildest disease manifestations (animal 1) exhibited lower band intensity at peak infection than the more severely affected animals.

The sequences of the PCR-amplified *pol* and *hexon* gene fragments (Genbank entries KJ126836 and KJ126837,

respectively) were identical for all four animals, which indicates that they were all infected with the same adenovirus. Similarity searches of all adenoviral sequences in Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide) using BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) showed that the *pol* amplicon in the present work exhibited the highest nucleotide identity (78%) with entry JN377908, this being a deposited, but unpublished, sequence from an adenovirus detected in a harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) on the coast of Florida (USA). The *hexon* amplicon showed the highest identity (72%) with otarine adenovirus strain MJ12 (entry AB714142) [14]. We conclude that the adenovirus in the four bottlenose dolphins closely resembles, but differed from previously detected adenoviruses in marine mammals. We designate this apparently novel adenovirus as tursiops adenovirus 1. The phylogenetic analysis [29] of the amino acid sequences deduced from the *pol* and *hexon* amplicons further supports the closeness of tursiops adenovirus 1 to the adenoviruses isolated from other marine mammals, including harbour porpoises, seals and sea lions (Figure 2).

In an effort to confirm this tursiops adenovirus 1 and characterize it in greater detail, we attempted to grow it in HeLa cells. This human-derived cell line was used as specific-host cell lines were not available, and also because canine adenovirus 2 has been proven to infect HeLa cells [30]. Centrifuged (10 min, 2,000 × g, 4°C) fecal homogenates prepared by vortexing in 3 volumes of phosphate-buffered saline (PBS), were filtered through sterile 0.2 µm-pore filters (Sartorius, Goettingen, Germany) and were left to stand for 1 h at 4°C in the presence of 0.5 mg/ml gentamycin. 0.2 ml of this solution were added to subconfluent HeLa cell monolayers, which had been grown (37°C, 5% CO₂) in 6-well plastic plates in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100 U/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Immediately before this inoculation, the medium was replaced with 0.3 ml of FBS-free medium. After 1 h, 1.5 ml of the 10% FBS-containing medium was added and the culture continued. Each day, a 0.2-ml sample of culture medium was taken for the PCR *pol* gene analysis. With the cultures inoculated with samples of diseased animals, the PCR assay on the culture medium was initially negative or very weakly positive, but became strongly positive on days 4-5. The cultures inoculated with samples of healthy dolphins, which had been processed in parallel, did not give a positive PCR reaction. The sequence of the *pol* fragment amplified by PCR from the positive cultures on day five after inoculation with the fecal material was identical to that obtained directly from fecal samples, which confirmed that the virus corresponded to the original adenovirus detected in feces. These results suggest that the virus can replicate to



some extent in HeLa cells. However, transmission electron microscopy (tFEI Tecnai G2 Spirit microscope, EM Service, Principe Felipe Research Centre, Valencia, Spain) of ultra-thin sections of the glutaraldehyde-fixed, osmium tetroxide-stained, durcupan-embedded and lead citrate counterstained cell monolayers on day 5 of culture did not provide conclusive evidence of adenovirus (although a few suggestive images of rounded particles of around 125–160 nm were observed [31] in the infected cells nuclei, data not shown). Therefore, the inference from these results that the virus can replicate in HeLa cells was confirmed by immunofluorescence using a monoclonal antibody against canine adenovirus 1 (clone 2E10-H2, VMRD, Pullman, WA, USA) and, as secondary antibody, Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG (Invitrogen). Cells were fixed with ice-cold methanol (methanol 100%, Sigma) at -20°C and permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 5 min. After three washes with PBS, cells were blocked with 5% goat serum in PBS for 1 hour and stained at room temperature with anti-CAV1 MoAb for 1 h at a final concentration of 0.1 mg/ml. Then, cells were washed three times with PBS and incubated for 1 h with a secondary Alexa 488-conjugated goat anti-mouse Ab (diluted 1:800) for detection in the green channel. After three washes with PBS, cover glasses were dried at room temperature for

20 minutes followed by assembly of the cover glasses in the slides. Confocal Microscopy was performed at the Madrid Science Park microscopy facility using a Olympus FV1200 equipped and images were processed with Photoshop CS5.

The cells of a culture inoculated with material derived from a sick animal (animal 3, on third day of clinical manifestations), when examined on day four after inoculation, gave clear nuclear fluorescence and moderate diffuse cytoplasmic fluorescence (Figure 3, downright panel), as previously described for adenovirus [32]. In contrast, a parallel culture inoculated with an equivalent amount of FBS-medium free material (Mock) did not exhibit substantial fluorescence (Figure 3 topright panel).

Conclusions

In summary, we report herein self-limiting gastrointestinal disease in bottlenose dolphins, which appears to be due to a hitherto unknown adenovirus that is genetically close to the adenoviruses found previously in marine mammals, such as sea lions. Adenoviral causality is supported by the exclusive detection in the four diseased animals, concomitantly with the disease, of adenovirus in feces and of antibodies for canine adenoviruses 1 and 2 in the serum. While adenoviral infection of sea lions causes hepatitis

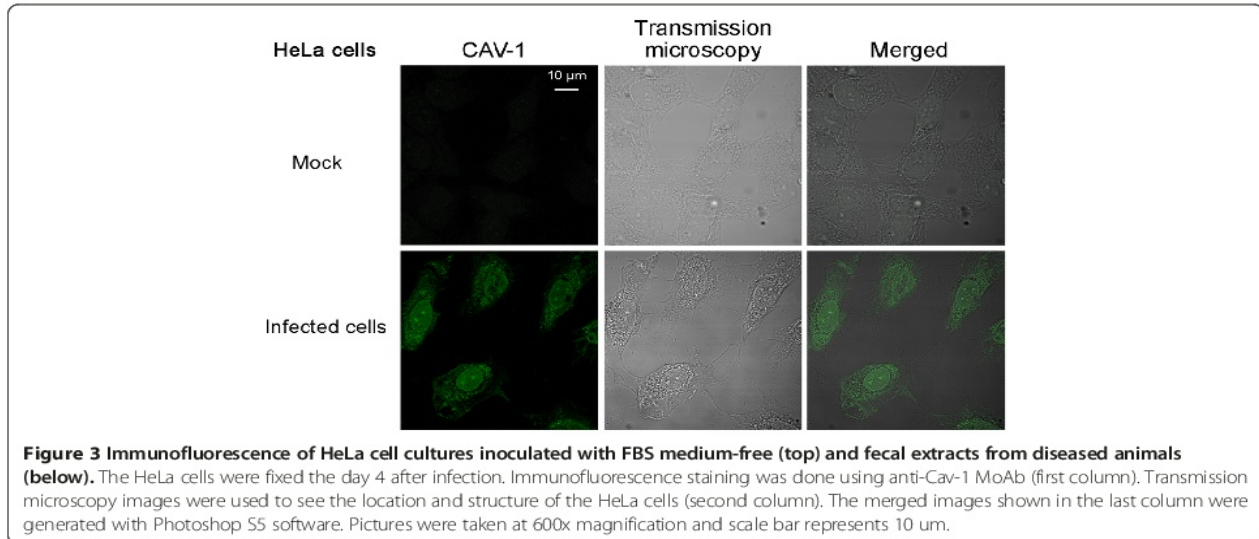


Figure 3 Immunofluorescence of HeLa cell cultures inoculated with FBS medium-free (top) and fecal extracts from diseased animals (below). The HeLa cells were fixed the day 4 after infection. Immunofluorescence staining was done using anti-Cav-1 MoAb (first column). Transmission microscopy images were used to see the location and structure of the HeLa cells (second column). The merged images shown in the last column were generated with Photoshop S5 software. Pictures were taken at 600x magnification and scale bar represents 10 µm.

and death [13,14], the dolphins infected with putative tur- siops adenovirus 1 suffered self-limiting disease, with no signs of hepatitis. In addition, the dolphins showed no apparent respiratory or ocular pathologies, which are fre- quent in adenoviral infections of many other species [1,5]. Thus this adenovirus may not show liver, lung or eye trop- ism. Full adenoviral genome sequencing might help pre- dict tropism, since certain genetic elements have been associated with certain tropisms [33]. The full viral se- quence might also be necessary to more broadly confirm our present inference, based on the limited phylogenetic analysis of partial *pol* and *hexon* gene sequences (Figure 2), and that this adenovirus is more closely related with ade- noviruses of other marine mammals than with those of other taxonomic groups. This close relation suggests that a branch of the adenoviral tree evolved when marine mammals became adenoviral hosts. It remains to be elu- cidated whether adenoviruses represent a serious threat to dolphins. In any case, the present findings highlight the need to consider this adenovirus a causal agent of dolphin gastroenteritis, which should be taken into account in the differential diagnosis of this condition, at least for captive dolphins.

Abbreviations

Pol: Polymerase; HAdV: Human adenovirus; EM: Electron microscopy; CBC: Complete blood counts; qPCR: Real-time polymerase chain reaction; USA: United States of America; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium; PBS: Phosphate-buffered saline; FBS: Fetal bovine serum; OsO4: Osmium tetroxide.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

Clinical monitoring and sample collection were performed by DGP, MV and TA; viral study, phylogenetic study and cell culture were analyzed by CRG, EN

and MM; the manuscript was prepared and critically discussed by CRG, DGP, EN, JLC and JMSV and all the other authors made contributions of. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This work has been carried out under the auspices of a collaborative agreement on virology studies in sea mammals between The Oceanogràfic of the Ciudad de las Artes y las Ciencias of Valencia and the VISAVET Center of Complutense University of Madrid. We thank Vicente Rubio (IBV-CSIC, Valencia) for critically reading the manuscript; Carmen Martín Espada for the assays to detect rotavirus, coronavirus, cryptosporidium and parvovirus; Belén Rivera and Rocío Sánchez for technical assistance; Francisco Javier García Peña (Laboratorio Central de Sanidad Animal de Algete) for bacteriological assays; Narcisca Martínez Quiles for providing HeLa cells; and Mario Soriano (Electron Microscopy service of the Centro de Investigación Principe Felipe de Valencia) for assistance with EM sample preparation and analysis. CRG is the recipient of a predoctoral fellowship from the FPU programme of the Spanish Ministry of Education. MM is the recipient of a predoctoral fellowship from the PhD student grant programme of Complutense University of Madrid.

Author details

¹VISAVET Center and Animal Health Department, Veterinary School, Complutense University of Madrid, Av Puerta del Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain. ²Veterinary Services, Oceanographic Aquarium of the Ciudad de las Artes y las Ciencias, C/ Junta de Murs i Valls s/n, 46023 Valencia, Spain.

Received: 18 November 2014 Accepted: 24 February 2015

Published online: 07 March 2015

References

1. Wold WSM, Horwitz MS. Adenoviruses. In: Martin MA, Knipe DM, Fields BN, Howley PM, Griffin D, Lamb R, editors. Fields' virology, vol. 2. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2395–436.
2. Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. Proc Soc Exp Biol Med. 1953;84:570–3.
3. Cabasso VJ, Stebbins MR, Norton TW, Cox HR. Propagation of infectious canine hepatitis virus in tissue culture. Proc Soc Exp Biol Med. 1954;85:239–45.
4. Berk AJ. Adenoviridae: the viruses and their replication. In: Martin MA, Knipe DM, Fields BN, Howley PM, Griffin D, Lamb R, editors. Fields' virology, vol. 2. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2355–94.

CAPÍTULO III. Resultados
Objetivo 2: Identificación de virus no descritos en cetáceos. Adenovirus: clínica, diagnóstico, filogenia y aislamiento viral.

5. Knowles DP. Adenoviridae. In: MacLachlan NJ, Dubovi EJ, editors. *Fenner's Veterinary Virology*, Fourth Edition. Oxford, UK: Elsevier/Academic Press; 2011. p. 203–12.
6. Wold WS, Toth K. Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy. *Curr Gene Ther*. 2013;13:421–33.
7. Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP, et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab*. 2003;80:148–58.
8. Fernandes P, Peixoto C, Santiago VM, Kremer EJ, Coroadinha AS, Alves PM. Bioprocess development for canine adenovirus type 2 vectors. *Gene Ther*. 2013;20:353–60.
9. Szelechowski M, Bergeron C, Gonzalez-Dunia D, Klonjowski B. Production and purification of non replicative canine adenovirus type 2 derived vectors. *J Vis Exp*. 2013;3:50833.
10. Puig M, Piedra J, Miravet S, Segura MM. Canine adenovirus downstream processing protocol. *Methods Mol Biol*. 2014;1089:197–210.
11. Britt Jr JO, Nagy AZ, Howard EB. Acute viral hepatitis in California sea lions. *J Am Vet Med Assoc*. 1979;175:921–3.
12. Dierauf LA, Lowenstine LJ, Jerome C. Viral hepatitis (adenovirus) in a California sea lion. *J Am Vet Med Assoc*. 1981;179:1194–7.
13. Goldstein T, Colegrove KM, Hanson M, Gulland FM. Isolation of a novel adenovirus from California sea lions *Zalophus californianus*. *Dis Aquat Organ*. 2011;94:243–8.
14. Inoshima Y, Murakami T, Ishiguro N, Hasegawa K, Kasamatsu M. An outbreak of lethal adenovirus infection among different otariid species. *Vet Microbiol*. 2013;165:455–9.
15. Smith AW, Skilling DE. Viruses and virus diseases of marine mammals. *J Am Vet Med Assoc*. 1979;175:918–20.
16. Smith AW, Skilling DE, Benirschke K, Albert TF, Barlough JE. Serology and virology of the bowhead whale (*Balaena mysticetus* L.). *J Wildl Dis*. 1987;23:92–8.
17. De Guise S, Lagace A, Beland P, Girard C, Higgins R. Non-neoplastic lesions in beluga whales (*Delphinapterus leucas*) and other marine mammals from the St Lawrence Estuary. *J Comp Pathol*. 1995;112:257–71.
18. Philippa JD, Leighton FA, Daoust PY, Nielsen O, Pagliarulo M, Schwantje H, et al. Antibodies to selected pathogens in free-ranging terrestrial carnivores and marine mammals in Canada. *Vet Rec*. 2004;155:135–40.
19. Greenwood AG, Taylor DC, Wild D. Fiberoptic gastroscopy in dolphins. *Vet Rec*. 1978;102:495–7.
20. Goldstein JD, Reese E, Reif JS, Varela RA, McCulloch SD, Defran RH, et al. Hematologic, biochemical, and cytologic findings from apparently healthy atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) inhabiting the Indian River Lagoon, Florida, USA. *J Wildl Dis*. 2006;42:447–54.
21. Lane EP, de Wet M, Thompson P, Siebert U, Wohlsein P, Plon S. A systematic health assessment of indian ocean bottlenose (*Tursiops aduncus*) and indo-pacific humpback (*Sousa plumbea*) dolphins incidentally caught in shark nets off the KwaZulu-Natal Coast, South Africa. *PLoS One*. 2014;9:e107038.
22. Birkun Jr A, Kuiken T, Krivokhizhin S, Haines DM, Osterhaus AD, van de Bildt MW, et al. Epizootic of morbilliviral disease in common dolphins (*Delphinus delphis ponticus*) from the Black sea. *Vet Rec*. 1999;144:85–92.
23. Rubio-Guerri C, Melero M, Esperon F, Belliere EN, Arbelo M, Crespo JL, et al. Unusual striped dolphin mass mortality episode related to cetacean morbillivirus in the Spanish Mediterranean sea. *BMC Vet Res*. 2013;9:106.
24. Goertz CE, Frasca Jr S, Bohach GA, Cowan DF, Buck JD, French RA, et al. *Brucella* sp. vertebral osteomyelitis with intercurrent fatal *Staphylococcus aureus* toxigenic enteritis in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Vet Diagn Invest*. 2011;23:845–51.
25. Reid SM, King DP, Shaw AE, Knowles NJ, Hutchings GH, Cooper EJ, et al. Development of a real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of marine caliciviruses (genus Vesivirus). *J Virol Methods*. 2007;140:166–73.
26. Bulut O, Yapici O, Avci O, Simsek A, Atli K, Dik I, et al. The serological and virological investigation of canine adenovirus infection on the dogs. *ScientificWorldJournal*. 2013;2013:587024.
27. Wellehan JF, Johnson AJ, Harrach B, Benko M, Pessier AP, Johnson CM, et al. Detection and analysis of six lizard adenoviruses by consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the atadenoviruses. *J Virol*. 2004;78:13366–9.
28. Thomson D, Meers J, Harrach B. Molecular confirmation of an adenovirus in brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*). *Virus Res*. 2002;83:189–95.
29. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*. 2007;24:1596–9.
30. Klonjowski B, Gilardi-Hebenstreit P, Hadchouel J, Randrianarison V, Boutin S, Yeh P, et al. A recombinant E1-deleted canine adenoviral vector capable of transduction and expression of a transgene in human-derived cells and in vivo. *Hum Gene Ther*. 1997;8:2103–15.
31. Weber J, Stich HF. Electron microscopy of cells infected with adenovirus type 2. *J Virol*. 1969;3:198–204.
32. Whetstone CA. Monoclonal antibodies to canine adenoviruses 1 and 2 that are type-specific by virus neutralization and immunofluorescence. *Vet Microbiol*. 1988;16:1–8.
33. Vigne E, Dedieu JF, Brie A, Gillardeaux A, Briot D, Benihoud K, et al. Genetic manipulations of adenovirus type 5 fiber resulting in liver tropism attenuation. *Gene Ther*. 2003;10:153–62.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



CAPÍTULO III. Resultados

Objetivo 2: Identificación de virus no descritos en cetáceos. Adenovirus: clínica, diagnóstico, filogenia y aislamiento viral.

CAPÍTULO IV



DISCUSIÓN

En esta tesis doctoral se han descrito avances en las enfermedades emergentes y reemergentes de los cetáceos que como se ha comentado anteriormente son muy complejas de determinar y diferenciar. Sin embargo, las dos enfermedades en las que se centra esta tesis doctoral están muy bien definidas. Por un lado, **morbillivirus de los cetáceos (CeMV)**, una enfermedad reemergente en el mar Mediterráneo, ya que desde 1990 que apareció como una enfermedad emergente se han ido sucediendo varios brotes en la misma localización. Por otro lado **adenovirus**, se podría considerar una enfermedad emergente ya que es la primera vez que se asocia adenovirus a una patología (gastroenteritis), sin embargo es posible que fuera una causa común de gastroenteritis en todos los cetáceos tanto en cautividad como salvajes, sin embargo, al ser autolimitante, no se había caracterizado anteriormente y por ello la consideramos enfermedad emergente. A continuación se discuten los diferentes objetivos descritos en esta tesis doctoral.

OBJETIVO 1: Avance en el conocimiento de morbillivirus de los cetáceos (CeMV)

Subobjetivo 1.1: Desarrollo y evaluación de nuevas técnicas de diagnóstico para la detección rápida, sensible y específica de las tres cepas de CeMV

Hasta el momento, existen diversas técnicas para el diagnóstico de CeMV. Aunque la primera descripción del virus se realizó mediante técnicas inmunohistoquímicas e histopatológicas (Domingo et al., 1990), las técnicas moleculares se han ido incorporando también al diagnóstico rutinario de CeMV (Raga et al., 2008; Sierra et al., 2014b). A pesar de que en la última década las técnicas moleculares han ido avanzando y desarrollándose a ritmo estrepitoso, en el caso de CeMV algunos autores siguen utilizando las técnicas convencionales publicadas en los años 90 (Barrett et al., 1993; Reidarson et al., 1998b) a pesar de que han ido apareciendo mejoras en el diagnóstico molecular de CeMV (Grant et al., 2010)

El problema de estas técnicas convencionales es que han mostrado sensibilidades bajas para la detección de CeMV (Grant et al., 2010) en muestras de animales salvajes. Es por ello que en 2009 se publicó una PCR a tiempo real, que mostró sensibilidades y especificidades altas (Grant et al., 2010). Esta técnica amplifica la región C-terminal de la nucleoproteína de DMV y PMV, pero no para PWMV. El rango de detección iba de 10^5 a 10^3 copias de ARN para DMV, y de 10^5 a 10^2 para PMV (Grant et al., 2010). Sin embargo desde su publicación no se ha utilizado como técnica de

diagnóstico en ninguno de los casos publicados desde 2009 hasta la actualidad. Esto podría ser porque además de no detectar las tres cepas de CeMV, es una técnica cara y complicada de poner a punto en el laboratorio debido a las dos sondas con alteraciones que componen la PCR, y que encarecen muchísimo la técnica.

Por ello el primer objetivo de esta tesis doctoral se centró en el diseño de una PCR a tiempo real, que además de tener muy buena sensibilidad y especificidad, detectara las tres cepas de CeMV y fuera más asequible. Con esta UPL RT-PCR diseñada en este subobjetivo, se consiguieron sensibilidades al menos 100 veces mayores que las técnicas hasta el momento publicadas sin perder especificidad. Además detecta las tres cepas simultáneamente. Este sistema de sondas UPL ya se había utilizado anteriormente para la detección y cuantificación de otras enfermedades animales como es la peste porcina africana (Fernandez-Pinero et al., 2013). Estas sondas son más asequibles que las sondas TaqMan debido a que son comerciales y por lo tanto no son diseñadas específicamente para la detección de CeMV, facilitando su utilización en la mayoría de laboratorios de diagnóstico. Por otro lado, esta PCR amplifica el gen de la proteína de fusión, una de las proteínas más conservadas en las cepas de CeMV.

Por todo esto, la UPL RT-PCR sería una herramienta perfecta para el diagnóstico de CeMV, debido a su rapidez (1 hora), su alta sensibilidad y especificidad. Además, como se ha comentado anteriormente, esta PCR es capaz de detectar y discernir las tres cepas de CeMV. Esto permitirá diferenciar entre las cepas que se han descrito hasta el momento como patogénicas (DMV y PMV) y la no patogénica (PWMV) y así tomar las medidas correspondientes en cada caso. Por último, esta técnica se ha validado en muestras de animales salvajes varados durante el brote del 2011 del Mediterráneo, en las que la carga viral era lo suficientemente baja como para que las técnicas convencionales no fueran capaces de detectarla. Sin embargo la UPL RT-PCR fue capaz de detectar DMV en todas las muestras positivas y confirmando mediante secuenciación. En el caso de no haber utilizado esta técnica ultrasensible, el brote de DMV en el 2011 hubiera pasado desapercibido al menos molecularmente hablando. Es por todo esto que en las muestras de animales del Mediterráneo es totalmente imprescindible utilizar técnicas muy sensibles debido a cargas virales bajas que pueden conllevar a dar falsos negativos.

Respecto al coste de la técnica, en una rt PCR es mayor que utilizando IHQ o PCR convencional. Sin embargo, esta UPL RT-PCR es más rápida, más específica, más reproducible y

mucho más asequible que otras PCR que utilizan sonda. De hecho, se ha podido demostrar que esta técnica es al menos 100 veces más sensible que la PCR convencional para la detección de PMV y 1000 veces en la detección de DMV y PWMV (Barrett et al., 1993) por lo que el coste total del diagnóstico es menor si contamos que se utiliza menos cantidad de muestra y que además gracias a su precisión no son necesarias las repeticiones. Por último, este método necesita menos tiempo de ciclos y no hay gastos asociados en el gel de agarosa ni tampoco en la tinción

Subobjetivo 1.2: Actuación y detección ante un brote de CeMV y profundizar en los posibles orígenes del brote

El mar Mediterráneo, principalmente el español, ha sido considerado de **alto riesgo** para DMV debido a los 2 brotes que han afectado a la población de delfines listados desde 1990. El estudio de CeMV en esta zona es muy interesante, por un lado para la detección de nuevos brotes, y por otro lado para ampliar el conocimiento de esta enfermedad (origen y epidemiología). Por todo esto, la detección de un tercer brote de DMV en el 2011 en la misma localización donde se habían dado los otros dos brotes ha podido dar información que vislumbra ciertas hipótesis sobre DMV en el Mediterráneo.

Por un lado, alrededor de 45 animales fueron los que vararon en estos 2-3 meses que duró el brote. Si se compara este número de animales con los 1000 varados en 1990 y los 100 en 2007 se podría concluir que en cada uno de los brotes que se han ido sucediendo el número de animales ha ido disminuyendo. Al comparar otros datos como la edad de los animales varados en cada uno de los brotes, también se puede observar que ha habido un cambio progresivo ya que en el brote del 2011 la mayoría de los animales fueron juveniles, e incluso crías, sin embargo en 1990 los animales varados fueron de todas las edades, incluyendo adultos, y en 2007 fueron subadultos. Esto junto que las lesiones de los animales varados en el 2011 fueron muy leves comparadas con las de 1990, que fueron muy severas, y las del 2007 que fueron algo menos severas, podría sugerir que los animales podrían estar creando inmunidad frente a DMV. Por último, la carga viral encontrada en los animales del 2011 fue mucho más baja que los brotes anteriores, siendo necesaria la utilización de una técnica ultrasensible (UPL RT-PCR) para el diagnóstico de DMV en la mayoría de los animales.

Por otro lado el análisis filogenético de la secuencia obtenida en los delfines varados en el 2011 pone de manifiesto que la cepa responsable del brote del 2011 en el Mar Mediterráneo fue DMV. Además, al comparar esta secuencia con las secuencias obtenidas en los dos brotes previos se

pudo observar que era casi idéntica a la secuencia del brote de 2007. Esto sugiere que la secuencia obtenida en el 2011 podría haber evolucionado a partir de la secuencia del 2007, y por lo tanto, tal y como se había descrito en el brote del 2007 (Bellière et al., 2011b), que el origen del brote podría proceder del mismo Mediterráneo. En el brote de 2007 se sugirió otra hipótesis en la que sugería que el origen del brote podrían haber sido los calderones del Atlántico, actuando de portadores, transmitiendo DMV a los delfines listados (Raga et al., 2008). Sin embargo, poco tiempo después se rebatió esta hipótesis a través del análisis de las secuencias de los dos brotes demostrando que la secuencia obtenida en 2007 era la misma secuencia que produjo el brote de 1990 con algunos cambios, y por lo tanto el origen debía estar en el Mediterráneo (Bellière et al., 2011b).

Sin embargo, existe una vertiente que mantiene la hipótesis de que DMV no sobrevivía en la población de *S. coreuleoalba* entre epizootias, debido a que algunos estudios serológicos con un tamaño de muestra muy pequeño, demostraba que los anticuerpos durante la epizootia estaban presentes en el 100% de los animales, y años después se reducía al 50% de los animales estudiados (Van Bresse et al., 2014; Van Bresse et al., 2001b). Además esta hipótesis mantiene que la abundancia de *S. coreuleoalba* en el Mediterráneo occidental es demasiado baja como para mantener una infección endémica por lo que es poco probable que DMV sobreviva en la población de *S. coreuleoalba* tras un brote (Raga et al., 2008). Los resultados encontrados en el subobjetivo 1.2. sugieren lo contrario, ya que los datos obtenidos en este brote (número de animales, edad de los mismos, lesiones encontradas y carga viral) sugieren que los animales podrían haber creado inmunidad frente a DMV. Además el análisis filogenético de la secuencia obtenida en los animales del brote del 2011 sugiere que el origen de cada uno de los brotes sea el propio Mediterráneo debido a la similitud de las secuencias, y que DMV sea endémico en el Mediterráneo.

Por último, para poder confirmar esta hipótesis quedaría aclarar qué ocurre con DMV durante los periodos interepizooticos. Hasta el momento sólo se han encontrado casos de infección crónica de DMV localizada en SNC en estos periodos sin positivos (Soto et al., 2011).

Subobjetivo 1.3. Seguimiento epidemiológico de CeMV en los cetáceos varados en las costas mediterráneas en periodos interepizoóticos

Los resultados de este subobjetivo permiten confirmar la hipótesis anterior. Como se ha comentado previamente, hasta el momento, en el mar Mediterráneo, sólo se habían podido encontrar casos de DMV crónicos en los que DMV estaba restringido al cerebro (Soto et al., 2011). Estos casos reforzaban la hipótesis de que DMV no seguía circulando en la población de *S. coreuleoalba* entre los brotes (Van Bressem et al., 2014).

Sin embargo, en este subobjetivo se demuestran dos casos de infección sistémica aguda y otro caso de infección sistémica crónica en *S. coreuleoalba* en periodos interepizoóticos. Aun así en este subobjetivo, de los tres casos sólo uno demuestra que pueden existir casos de infección sistémica en periodos de no brote. Además este animal apareció con una carga viral muy alta y lesiones muy severas comparadas con los animales del brote del 2011. Esto podría ser porque como DMV sigue en el Mediterráneo, podría haberse puesto en contacto con este animal que por muchas razones podría estar inmunodeprimido y esto haber dado lugar a la infección sistémica de DMV. Además la secuencia obtenida de este animal era idéntica a la del brote del 2011. Es por ello la importancia de esta detección positiva en el Mediterráneo.

La detección de casos de infección sistémica en el Mediterráneo permite confirmar que CeMV se mantiene en el Mediterráneo entre los brotes. Hasta el momento, se pensaba que el origen de cada uno de los brotes provenía del Atlántico y sobretodo que los *G. melas* podían actuar como portadores. Sin embargo, la presencia de un animal positivo en un periodo interepizoótico con infección sistémica aguda y en el que la secuencia que se encontró fue casi idéntica a la del 2011 sugiere la hipótesis de que DMV podría circular por las aguas mediterráneas.

Por otro lado, los otros dos casos encontrados en este periodo interepizoótico se han dado con una diferencia de más de uno y 3 años desde la finalización del brote. La importancia de estos casos es no solo que tengamos dos animales positivos a DMV en un periodo de no brote, sino que la secuencia de estos animales era idéntica entre sí y a su vez diferente a las anteriormente descritas en el Mediterráneo. Lo lógico sería, viendo la historia de DMV en el mar Mediterráneo, que encontrásemos una secuencia similar a la del 2011. Sin embargo la secuencia encontrada es más cercana filogenéticamente a la secuencia de 1990 que a la de 2007 y 2011. Es por ello, que en estos dos animales la carga viral encontrada fue muy alta y las lesiones muy severas. Esto podría significar

que al ponerse en contacto con una secuencia diferente y no tener inmunidad frente a ésta se produzca una infección tan severa como la que se ha visto en este animal. En definitiva, los resultados obtenidos hacen pensar que una nueva secuencia de DMV podría estar circulando por el Mediterráneo pudiendo aparecer en un futuro un nuevo brote de DMV.

Por último y como discusión de todo el objetivo 1, se puede concluir que CeMV es el virus mejor estudiado en los cetáceos, sin embargo siguen habiendo muchas cuestiones que resolver sobre el origen de cada uno de los brotes, su comportamiento en los cetáceos, en cómo se mantiene en el agua y sobretodo de por qué el Mediterráneo es una zona de alto riesgo para este virus, y por qué todos los brotes comienzan en las aguas valencianas.

OBJETIVO 2: Identificación de nuevos virus en cetáceos. Adenovirus: clínica, diagnóstico, filogenia y aislamiento viral.

En humanos se conocen cientos de virus, entre los que se encuentra adenovirus. En animales también se conocen decenas de virus que afectan a las distintas especies como pueden ser a caballos y a perros. Sin embargo en cetáceos sólo unos pocos han sido caracterizados y esto hace pensar que lo más probable es que existan más y que sería un gran avance para la sanidad marina poder conocerlos.

Es por ello que en este objetivo que se ha podido caracterizar por primera vez adenovirus en cetáceos y a su vez asociarlo a una gastroenteritis autolimitante es un paso importante para la sanidad marina. Aunque es la primera vez que se describe este virus, lo más probable es que los cetáceos lleven muchos años teniendo gastroenteritis debidas a adenovirus, pero al ser autolimitantes nadie haya profundizado en la causa de la patología. De ahí la importancia de haber podido encontrar este virus asociado a esta patología. Además, sólo utilizando técnicas convencionales se ha podido encontrar la causa de esta gastroenteritis.

En leones marinos, adenovirus tiene tropismo digestivo y hepático produciéndoles una hepatitis aguda letal (Goldstein et al., 2006; Inoshima et al., 2013). Sin embargo en cetáceos parece que sólo tiene tropismo por el sistema digestivo. Esta hipótesis debe confirmarse con el estudio de futuros brotes ya que la sintomatología digestiva es similar a la que produce en leones marinos en la

fase inicial, pero en cetáceos mejoran por sí solos, en cambio, en leones marinos empeoran hasta que mueren. Es por ello, que hasta el momento no se ha podido realizar la necropsia de ningún animal que haya sufrido adenovirus, y por lo tanto no se ha analizado su hígado, tal y como se ha hecho en leones marinos. Sin embargo el estudio de las enzimas hepáticas durante el periodo sintomático hacía ver que no había alteraciones significativas tal y como ocurrió en los casos de los leones marinos.

En este objetivo se ha podido profundizar un poco más en el conocimiento de esta enfermedad viral en cetáceos en el que se ha realizado la cuantificación relativa del virus a lo largo de la enfermedad. Se pudo observar como los títulos virales en las muestras de heces de los animales enfermos fueron decayendo según iba avanzando la enfermedad y se van recuperando. Además se pudo demostrar que los animales siguieron eliminando el virus durante unos 5 días después de que la sintomatología cesara. Esto es importante conocerlo a efectos prácticos ya que así los animales están separados durante el periodo que están eliminando el virus para evitar posibles contagios a otros animales.

Respecto al análisis filogenético del mismo, tanto la secuencia parcial del gen de la polimerasa como la del hexón sugieren que una nueva especie de adenovirus. Es un adenovirus de un cetáceo, ya que es muy similar a la única secuencia de marsopa que hay en GeneBank pero es suficientemente distinto como para decir que podría ser una nueva especie de adenovirus. De hecho, en los árboles filogenéticos de ambas proteínas se puede observar como tursiops adenovirus 1 parece ser una nueva especie, y a su vez parece que todas las secuencias de mamíferos marinos forman un clado distinto en el árbol. Esto es un importante descubrimiento pero necesita ser confirmado con el genoma completo de este adenovirus.

Por otro lado, la infección de células HeLa con este nuevo adenovirus es un gran avance debido a la problemática básica que hay con el aislamiento viral de virus procedentes de cetáceos. Al no existir ninguna línea celular de delfín, aquellos virus que son especie específicos, como es adenovirus, es muy complicado poder aislar el virus. Sin embargo, gracias a que otros adenovirus animales habían sido probados para infectar células HeLa (Klonjkowski et al., 1997) se pudo probar con tursiops adenovirus 1 y comprobar que el virus infectaba a las células. Su confirmación se realizó mediante microscopía electrónica e inmunofluorescencia haciendo al trabajo muy completo.

Por último, se descartó cualquier otra posible causa que pudiera dar lugar a una gastroenteritis, confirmando la asociación del virus con esta patología. Además, el cese de la

eliminación del virus tras la desaparición de los signos clínicos y la ausencia de virus en los animales sanos, que compartían piscina con estos animales, hace pensar en esta asociación.

Este trabajo es un avance en sanidad marina por la incorporación de adenovirus en los diagnósticos diferenciales de gastroenteritis en cetáceos. Además se debería obtener el genoma completo de tursiops adenovirus 1 para poder confirmar las hipótesis obtenidas con la filogenia de los genomas parciales de dos de las proteínas de adenovirus. Aunque con los genomas parciales del gen del hexón y de la polimerasa se podría confirmar que es una especie nueva, para poder confirmar que todas las secuencias de mamíferos marinos forman un género nuevo de adenovirus sí que se necesitaría obtener el genoma completo.

Durante esta tesis se intentó obtener el genoma completo mediante el aislamiento del virus en cultivo celular y posterior purificación y amplificación masiva. Sin embargo, no fue posible debido a que el virus se consiguió aislar en el cultivo celular pero la replicación, al no ser células procedentes de delfín, no fue efectiva. El título viral se consiguió que aumentara en los dos primeros pases pero no se consiguió el suficiente título como para poder purificarlo. Es por ello, que la siguiente opción que se ha barajado es realizar metagenómica. Con esta técnica se podría obtener hasta el 80% del genoma de una vez y se podría completar a través de la técnica de “primer walking”. Este es un experimento que debería realizarse en el futuro.

Por otro lado, el origen del brote sería importante detectarlo ya que en este caso no se ha podido discernir. Sin embargo, lo más probable sea que provenga del agua del mar. En este parque acuático, las piscinas de delfinario tienen agua que viene directamente de un pozo del mar, tras una serie de filtrados y tratamientos. Podría ser muy interesante determinar cómo inactivar este virus en el agua, ya que existen estudios en el cloro podría inactivar adenovirus. Este experimento sería muy importante para poder aconsejar a este tipo de parques el tener un nivel mínimo de cloro para que inactives el virus pero que no dañe a los animales.

En este objetivo también habría que destacar la necesidad de estar atentos a posibles lesiones o sintomatología clínica viral para detectar otros virus desconocidos en cetáceos.

En definitiva esta tesis doctoral ha permitido mejorar aspectos de la sanidad marina no solo en el mediterráneo sino también en la puesta a punto de nuevas técnicas y con la descripción de nuevos virus, etc...

Respecto a CeMV, está claro que es un problema importante en el mar Mediterráneo, y más aun en el occidental español donde se han descrito los tres brotes de DMV que han afectado a la población de *S.coreuleoalba*. Esta tesis doctoral ha estado centrada en esta problemática y por un lado ha podido mejorar el diagnóstico, además de vislumbrar algunas incógnitas que existían acerca de este virus en esta zona. Por otro lado, es importante haber mejorado la sensibilidad de las técnicas de diagnóstico molecular y diseñado una nueva PCR gracias a la cual se pudo diagnosticar el tercer brote de DMV en el Mediterráneo, y mejorar la epidemiología del mismo y poder confirmar la hipótesis de que probablemente DMV sea endémico en el Mediterráneo. Y por último, el seguimiento epidemiológico de la enfermedad en esta zona ha podido, por un lado, poder encontrar el primer caso de infección sistémica en el Mediterráneo en un periodo interepizootico, y por otro lado, haber podido encontrar una nueva secuencia de DMV que circula por el Mediterráneo y que podría ser responsable de un cuarto brote ya que parece ser que la población de *S.coreuleoalba* no tiene inmunidad frente a la misma viendo la severidad de la infección. El seguimiento de este virus en esta zona de riesgo utilizando las nuevas técnicas diagnósticas permitiría un diagnóstico rápido de la enfermedad. Con esta tesis también se pretende concienciar a los científicos y laboratorios de diagnóstico a utilizar técnicas más sensibles y específicas, tal y como describe Grant o como se describe en el subobjetivo 1 de esta tesis doctoral. Si se siguen utilizando técnicas convencionales podrían pasar desapercibidos brotes o casos positivos a CeMV debido a que la severidad de los brotes de DMV que han afectado a la población de *S.coreuleoalba* mediterránea ha ido disminuyendo con cada uno de los brotes. Esto podría pasar también en otras zonas del mundo donde también se han visto afectados por varios brotes de esta enfermedad.

Es por todo esto, que es muy importante que se siga estudiando CeMV en esta zona ya que al ser una zona de riesgo, por los tres brotes ocurridos en esta localización y por el desconocimiento a su vez, del origen y epidemiología de la enfermedad.

Por otro lado, la identificación de nuevos virus en cetáceos debería ser una prioridad para los investigadores del campo, ya que tal y como ha pasado con adenovirus, lo más seguro es que estén presentes en estos animales pero que pasen desapercibidos. De ahí la importancia del

descubrimiento de adenovirus. A partir de ahora todos los profesionales del campo podrán incluir adenovirus en el diagnóstico diferencial de gastroenteritis y así poder seguir estudiándose y conociendo mejor a este nuevo virus.

Esta tesis doctoral ha permitido abrir una serie de frentes tanto en CeMV como en adenovirus que permitirán que otros doctorandos o científicos puedan seguir estudiando para poder confirmar o suprimir las hipótesis que se plantean durante todo el manuscrito.

En resumen, el conocimiento de enfermedades emergentes y reemergentes en cetáceos debería ser un tema sobre el que seguir estudiando debido a su desconocimiento. El interés en estas enfermedades y en general, en la sanidad marina se debe no solamente a la salud de estos animales sino también a la salud de los mares y océanos. Por ello el conocimiento de nuevas enfermedades en estos animales sobretodo enfermedades zoonóticas sería un gran avance para la sanidad marina y la salud pública.

CAPÍTULO V



CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

PRIMERA/FIRST

Se diseñó una nueva técnica de PCR que detecta las tres cepas de CeMV simultáneamente. Esta nueva RT-PCR a tiempo real utiliza dos sondas UPL que permiten elevar los índices de sensibilidad, especificidad y rapidez.

A new technique of PCR was designed to detect the three strains of CeMV simultaneously. This new real time RT-PCR uses two UPL probes that allow raising sensibility, specificity and rapidity index.

SEGUNDA/SECOND

Con la nueva PCR diseñada se diagnosticó el tercer brote de DMV en el Mar Mediterráneo español durante el año 2011 de una manera rápida y eficazmente. En total 45 animales vararon entre Marzo y Mayo del 2011. La positividad a DMV en este brote del 2011 fue de un 62%, sin embargo si solo lo comparamos con el total de *S. coreuleoalba* que fueron analizados sería de un 72%.

Using the novel PCR, the third DMV outbreak was diagnosed on Spanish Mediterranean Sea during 2011, efficiently and very fast. A total of 45 animals were stranded between March and May 2011. The positivity of this 2011 DMV outbreak was 62%, but if we compare with the total of *S. coreuleoalba* that were analyzed it would be 72%.

TERCERA/THIRD

La secuencia obtenida en este brote de 2011, era prácticamente idéntica a la secuencia obtenida en el brote del 2007. La edad de los animales era mayoritariamente jóvenes, todos fueron *S. coreuleoalba*, las lesiones encontradas fueron muy leves y la carga viral muy baja. Estos resultados sugieren que DMV es endémico en el Mediterráneo.

The obtained sequence in this 2001 outbreak was very close to 2007 outbreak sequence. The age of the positive animals was really low being the majority juveniles, all of them were *S. coreuleoalba*, the lesions were soft and the viral title was low. These results suggest DMV is endemic on Spanish Mediterranean Sea.

CUARTO/FOURTH

Desde el brote del 2011 hasta diciembre de 2014 sólo tres animales han sido positivos a DMV en el Mediterráneo español, presentando 2 de ellos infección sistémica aguda y uno infección sistémica crónica. Estos casos son la primera descripción de infección sistémica de DMV en el Mediterráneo en un periodo interepizoótico que confirma la hipótesis de que DMV es endémico en el Mediterráneo.

Since 2011 outbreak until December 2014 only three animals have been DMV positive on Spanish Mediterranean Sea. Two of them presented acute systemic infection and the other one presented chronic systemic infection. This is the first description of two systemic infections on Mediterranean Sea in an interepizootic period. These cases confirm DMV is endemic on Mediterranean Sea.

QUINTO/FIFTH

Una nueva secuencia viral se ha identificado en dos de los tres animales varados en el periodo epizoótico. Esta secuencia era idéntica entre sí y a su vez diferente a las secuencias anteriormente publicadas y más cercana filogenéticamente hablando a la de 1990 que a la del 2007. Es por ello que se sugiere que una nueva secuencia está circulando en la población de *S. coreulealba* del mar Mediterráneo pudiendo aparecer un nuevo brote en los siguientes años.

QUINTO/FIFTH

A new viral sequence has been identified in two of three animals that stranded during an interepizootic period. The sequence was identical between them and different to any other previously published DMV sequence. In addition it was closer to 1990 sequence than 2007 or 2011 sequences. Therefore, this suggests a novel DMV sequence is circulating on *S. coreulealaba* population on Mediterranean Sea and a new outbreak could occur in the future.

SEXTA/SIXTH

Se ha identificado un nuevo adenovirus, en cetáceos asociado a una gastroenteritis vírica. Se ha sugerido el posible tropismo del virus por el tejido digestivo. El análisis filogenético de la secuencia obtenida concluye que es un adenovirus de cetáceo, que podría ser una nueva especie, y que todas las secuencias de adenovirus procedentes de mamíferos marinos podrían formar un clado en el árbol.

A novel adenovirus has been identified in cetaceans associated to a viral gastroenteritis. A digestive tropism has been suggested. Phylogenetic analysis of the obtained sequence concludes that this sequence is a cetacean adenovirus and it could belong new specie and all marine mammal adenovirus sequence form a different clade in the tree.

BIBLIOGRAFÍA



REFERENCES

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, A., Raga, J.A., 1993, The striped dolphin epizootic in the Mediterranean Sea. *Ambio*, 524-528.
- Barrett, T., Visser, I.K., Mamaev, L., Goatley, L., van Bresse, M.F., Osterhaus, A.D., 1993, Dolphin and porpoise morbilliviruses are genetically distinct from phocine distemper virus. *Virology* 193, 1010-1012.
- Bartha, A., 1969, Proposal for subgrouping of bovine adenoviruses. *Acta Vet Acad Sci Hung* 19, 319-321.
- Bellière, E.N., 2012. *Avances en virología de cetáceos: caracterización molecular de nuevas secuencias de morbillivirus y herpesvirus*. Complutense University of Madrid, Spain, Madrid.
- Bellière, E.N., Esperón, F., Fernandez, A., Arbelo, M., Muñoz, M.J., Sanchez-Vizcaino, J.M., 2011a, Phylogenetic analysis of a new Cetacean morbillivirus from a short-finned pilot whale stranded in the Canary Islands. *Res Vet Sci* 90, 324-328.
- Bellière, E.N., Esperon, F., Sanchez-Vizcaino, J.M., 2011b, Genetic comparison among dolphin morbillivirus in the 1990-1992 and 2006-2008 Mediterranean outbreaks. *Infection, Genetics and Evolution* 11, 1913-1920.
- Benko, M., Elo, P., Ursu, K., Ahne, W., LaPatra, S.E., Thomson, D., Harrach, B., 2002, First molecular evidence for the existence of distinct fish and snake adenoviruses. *J Virol* 76, 10056-10059.
- Benkö, M., Harrach, B., 1998, A proposal for a new (third) genus within the family Adenoviridae. *Arch Virol* 143, 829-837.
- Benkö, M., Harrach, B., Russell, W.C., 2000, Family Adenoviridae, In: van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Cartens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner, R.B. (Eds.) *Virus taxonomy. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 227-238.
- Birkun, A., Jr., Kuiken, T., Krivokhizhin, S., Haines, D.M., Osterhaus, A.D., van de Bildt, M.W., Joiris, C.R., Siebert, U., 1999, Epizootic of morbilliviral disease in common dolphins (*Delphinus delphis ponticus*) from the Black sea. *Vet Rec* 144, 85-92.
- Black, F.L., 1991, Epidemiology of paramyxoviruses, In: Kingsbury, D. (Ed.) *The paramyxoviruses*. Plenum Press, New York, NY, USA, pp. 509-536.
- Blixenkrone-Møller, M., Bolt, G., Gottschalck, E., Kenter, M., 1994, Comparative analysis of the gene encoding the nucleocapsid protein of dolphin morbillivirus reveals its distant evolutionary relationship to measles virus and ruminant morbilliviruses. *J Gen Virol* 75 (Pt 10), 2829-2834.
- Blixenkrone-Møller, M., Bolt, G., Jensen, T.D., Harder, T., Svansson, V., 1996, Comparative analysis of the attachment protein gene (H) of dolphin morbillivirus. *Virus Res* 40, 47-55.
- Bodewes, R., van de Bildt, M.W., Schapendonk, C.M., van Leeuwen, M., van Boheemen, S., de Jong, A.A., Osterhaus, A.D., Smits, S.L., Kuiken, T., 2013, Identification and characterization of a novel adenovirus in the cloacal bursa of gulls. *Virology* 440, 84-88.
- Bolt, G., Blixenkrone-Møller, M., Gottschalck, E., Wishaupt, R.G., Welsh, M.J., Earle, J.A., Rima, B.K., 1994, Nucleotide and deduced amino acid sequences of the matrix (M) and fusion (F) protein genes of cetacean morbilliviruses isolated from a porpoise and a dolphin. *Virus Res* 34, 291-304.
- Bompar, J.M., Dhermain, F., Poitevin, F., Cheylan, M., 1991, Les dauphins méditerranéens victimes d'un virus mortel. *La recherche* 22, 506-508.
- Boros, G., Graf, Z., Benko, M., Bartha, A., 1985, Isolation of a bovine adenovirus from fallow deer (*Dama dama*). *Acta Vet Hung* 33, 119-123.

BIBLIOGRAFÍA

- Bortolotto, A., Casini, L., Stanzani, L.A., 1992, Dolphin mortality along the Southern Italian Coast (June-September 1991). *Aquatic Mammals* 18, 56-60.
- Boseret, G., Jauniaux, T., Mainil, J., 2002. Erysipelothrix rhusiopathiae infection in stranded harbour porpoise and harbour seal. In: Proc 2002 Eur Assoc Zoo Wildl Vet Annu Meet, Houten, pp. 15-17.
- Bossart, G.D., Brawner, T.A., Cabal, C., Kuhns, M., Eimstad, E.A., Caron, J., Trimm, M., Bradley, P., 1990, Hepatitis B-like infection in a Pacific white-sided dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*). *J Am Vet Med Assoc* 196, 127-130.
- Bossart, G.D., Decker, S.J., Ewing, R.Y., 2001, Cytopathology of cutaneous viral papillomatosis in the killer whale (*Orcinus orca*). In: Pfeiffer, C. (Ed.) *Molecular and Cell Biology of Marine Mammals*. Krieger Publishing Co, Melbourne, FL, pp. 213-223.
- Bossart, G.D., Ewing, R., Herron, A.J., Cray, C., Mase, B., Decker, S.J., Alexander, J.W., Altman, N.H., 1997, Immunoblastic malignant lymphoma in dolphins: histologic, ultrastructural, and immunohistochemical features. *J Vet Diagn Invest* 9, 454-458.
- Bossart, G.D., Reif, J.S., Schaefer, A.M., Goldstein, J., Fair, P.A., Saliki, J.T., 2010, Morbillivirus infection in free-ranging Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the Southeastern United States: seroepidemiologic and pathologic evidence of subclinical infection. *Vet Microbiol* 143, 160-166.
- Both, G.W., 2002, Adenovirus. Adenoviridae, In: Tidona, C.A., Darai, G. (Eds.) *The Springer index of viruses*. Springer, New York, NY, pp. 2-8.
- Britt Jr., J., Nagy, A., Howard, E., 1979, Acute viral hepatitis in California sea lions. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* , 921-923.
- Buck, J.D., Spotte, S., 1986, Microbiology of captive whitebeaked dolphins, *Lagenorhynchus albirostris*, with comments on epizootics. *Zoo Biol* 5, 321-329.
- Burek, K.A., Gulland, F.M., Sheffield, G., Beckmen, K.B., Keyes, E., Spraker, T.R., Smith, A.W., Skilling, D.E., Evermann, J.F., Stott, J.L., Saliki, J.T., Trites, A.W., 2005, Infectious disease and the decline of Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*) in Alaska, USA: insights from serologic data. *J Wildl Dis* 41, 512-524.
- Casalone, C., Mazzariol, S., Pautasso, A., Di Guardo, G., Di Nocera, F., Lucifora, G., Ligios, C., Franco, A., Fichi, G., Cocumelli, C., Cersini, A., Guercio, A., Puleio, R., Gorla, M., Podesta, M., Marsili, L., Pavan, G., Pintore, A., De Carlo, E., Eleni, C., Caracappa, S., 2014, Cetacean strandings in Italy: an unusual mortality event along the Tyrrhenian Sea coast in 2013. *Dis Aquat Organ* 109, 81-86.
- Cassonnet, P., Van Bresseem, M.F., Desaintes, C., Van Waerebeek, K., Orth, G., 1999. Papillomavirus causes genital warts in small cetaceans from Peru. In: 12th European Research on Cetaceans-, Monaco, p. 349.
- Cavanagh, H.M., Mahony, T.J., Vanniasinkam, T., 2012, Genetic characterization of equine adenovirus type 1. *Vet Microbiol* 155, 33-37.
- Clavareau, C., Wellemans, V., Walravens, K., Tryland, M., Verger, J.M., Grayon, M., Cloeckert, A., Letesson, J.J., Godfroid, J., 1998, Phenotypic and molecular characterization of a Brucella strain isolated from a minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*). *Microbiology* 144 (Pt 12), 3267-3273.
- Cortes-Hinojosa, G., Gulland, F.M., Goldstein, T., Venn-Watson, S., Rivera, R., Waltzek, T.B., Salemi, M., Wellehan, J.F., Jr., 2015, Phylogenomic characterization of California sea lion adenovirus-1. *Infect Genet Evol* 31, 270-276.
- Cowan, D.F., Turnbull, B.S., 1999. Renal neoplasms in the Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) from the western coast of the gulf of Mexico. In: 13th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals, Wailea, Maui, HI, p. 39.

- Chastel, C., Masure, O., Balouet, G., Laban, P., Lucas, A., 1975, [The student, the cetacean and swine-fever. A minor epidemic after dissection of a globicephale]. *Nouv Presse Med* 4, 1803-1805.
- Chen, E.C., Yagi, S., Kelly, K.R., Mendoza, S.P., Tarara, R.P., Canfield, D.R., Maninger, N., Rosenthal, A., Spinner, A., Bales, K.L., Schnurr, D.P., Lerche, N.W., Chiu, C.Y., 2011, Cross-species transmission of a novel adenovirus associated with a fulminant pneumonia outbreak in a new world monkey colony. *PLoS Pathog* 7, e1002155.
- Chen, L.H., Wu, Z.Q., Hu, Y.F., Yang, F., Yang, J., Jin, Q., 2012, [Genetic diversity of adenoviruses in bats of China]. *Bing Du Xue Bao* 28, 403-408.
- Chiba, M.E., Saito, M., Suzuki, N., Honda, Y., Yaegashi, N., 2003, Measles infection in pregnancy. *J Infect* 47, 40-44.
- Dan, A., Ruzsics, Z., Russell, W.C., Benko, M., Harrach, B., 1998, Analysis of the hexon gene sequence of bovine adenovirus type 4 provides further support for a new adenovirus genus (*Atadenovirus*). *J Gen Virol* 79 (Pt 6), 1453-1460.
- Daszak, P., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D., 2000, Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. *Science* 287, 443-449.
- Davison, A.J., Wright, K.M., Harrach, B., 2000, DNA sequence of frog adenovirus. *J Gen Virol* 81, 2431-2439.
- De Guise, S., Lagacé, A., Béland, P., 1994, Gastric papillomas in eight St. Lawrence beluga whales (*Delphinapterus leucas*). *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 385-388.
- De Guise, S., Lagace, A., Beland, P., Girard, C., Higgins, R., 1995, Non-neoplastic lesions in beluga whales (*Delphinapterus leucas*) and other marine mammals from the St Lawrence Estuary. *J Comp Pathol* 112, 257-271.
- Di Guardo, G., Cocumelli, C., Scholl, F., Di Francesco, C.E., Speranza, R., Pennelli, M., Eleni, C., 2011, Morbilliviral encephalitis in a striped dolphin *Stenella coeruleoalba* calf from Italy. *Dis Aquat Organ* 95, 247-251.
- Di Guardo, G., Di Francesco, C.E., Eleni, C., Cocumelli, C., Scholl, F., Casalone, C., Peletto, S., Mignone, W., Tittarelli, C., Di Nocera, F., Leonardi, L., Fernandez, A., Marcer, F., Mazzariol, S., 2013, Morbillivirus infection in cetaceans stranded along the Italian coastline: pathological, immunohistochemical and biomolecular findings. *Res Vet Sci* 94, 132-137.
- Doignan, J., 1999, Morbilliviral infections of marine mammals. , In: Fowler, J.F., Miller, E. (Eds.) *Zoo and Wild Animal Medicine*. Editorial Saunders Company, St. Louis, Missouri, USA, pp. 497-501.
- Domingo, M., Ferrer, L., Pumarola, M., Marco, A., Plana, J., Kennedy, S., McAliskey, M., Rima, B.K., 1990, Morbillivirus in dolphins. *Nature* 348, 21.
- Domingo, M., Kennedy, S., Van Bresseem, M.F., 2002, Marine mammal mortalities, In: Evans and Raga, K.A. (Ed.) *Marine mammals: biology and conservation*. Plenum Publishers, New York, NY, USA, pp. 425-456.
- Domingo, M., Vilafranca, M., Visa, J., Prats, N., Trudgett, A., Visser, I., 1995, Evidence for chronic morbillivirus infection in the Mediterranean striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*). *Vet Microbiol* 44, 229-239.
- Domingo, M., Visa, J., Pumarola, M., Marco, A.J., Ferrer, L., Rabanal, R., Kennedy, S., 1992, Pathologic and immunocytochemical studies of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Vet Pathol* 29, 1-10.
- Doszpoly, A., Wellehan, J.F., Jr., Childress, A.L., Tarjan, Z.L., Kovacs, E.R., Harrach, B., Benko, M., 2013, Partial characterization of a new adenovirus lineage discovered in testudinoid turtles. *Infect Genet Evol* 17, 106-112.

- Duignan, P.J., House, C., Geraci, J.R., Duffy, N., Rima, B.K., Walsh, M.T., Early, G., St Aubin, D.J., Sadove, S., Koopman, H., et al., 1995a, Morbillivirus infection in cetaceans of the western Atlantic. *Vet Microbiol* 44, 241-249.
- Duignan, P.J., House, C., Geraci, J.R., Early, G., Copland, H.G., Walsh, M.T., Bossart, G.D., Cray, C., Sadove, S., Aubin, D.J.S., Moore, M., 1995b, Morbillivirus infection in two species of pilot whale (*Globicephala sp.*) from the western Atlantic. *Marine Mammal Science* 11, 150-162.
- Duignan, P.J., House, C., Ode, D.K., Wells, R.S., Hansen, W., Walsh, M.T., St. Aubin, D.J., Rima, B.K., Geraci, J.R., 1996, Morbillivirus in bottlenose dolphins: Evidence for recurrent epizootics in the western Atlantic and Gulf of Mexico. *Mar. Mamm. Sci.* 12, 499-515.
- Ecker, D.J., Sampath, R., Blyn, L.B., Eshoo, M.W., Ivy, C., Ecker, J.A., Libby, B., Samant, V., Sannes-Lowery, K.A., Melton, R.E., Russell, K., Freed, N., Barrozo, C., Wu, J., Rudnick, K., Desai, A., Moradi, E., Knize, D.J., Robbins, D.W., Hannis, J.C., Harrell, P.M., Massire, C., Hall, T.A., Jiang, Y., Ranken, R., Drader, J.J., White, N., McNeil, J.A., Crooke, S.T., Hofstadler, S.A., 2005, Rapid identification and strain-typing of respiratory pathogens for epidemic surveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8012-8017.
- Ewing, R.Y., Mignucci-Giannoni, A.A., 2003, A poorly differentiated pulmonary squamous cell carcinoma in a free-ranging Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Vet Diagn Invest* 15, 162-165.
- Farkas, S.L., Benko, M., Elo, P., Ursu, K., Dan, A., Ahne, W., Harrach, B., 2002, Genomic and phylogenetic analyses of an adenovirus isolated from a corn snake (*Elaphe guttata*) imply a common origin with members of the proposed new genus *Atadenovirus*. *J Gen Virol* 83, 2403-2410.
- Fauquier, D., Gulland, F., Haulena, M., Lowenstine, L., 1998. Northern fur seal (*Callorhinus ursinus*) strandings along the central California coast over twenty-two years, 1975–1997. In: 29th International Association for Aquatic Animal Medicine Annual Conference, San Diego, CA, p. 39.
- Fernandez-Pinero, J., Gallardo, C., Elizalde, M., Robles, A., Gomez, C., Bishop, R., Heath, L., Couacy-Hymann, E., Fasina, F.O., Pelayo, V., Soler, A., Arias, M., 2013, Molecular diagnosis of African Swine Fever by a new real-time PCR using universal probe library. *Transbound Emerg Dis* 60, 48-58.
- Fernandez, A., Esperon, F., Herraiez, P., de Los Monteros, A.E., Clavel, C., Bernabe, A., Sanchez-Vizcaino, J.M., Verborgh, P., DeStephanis, R., Toledano, F., Bayon, A., 2008, Morbillivirus and pilot whale deaths, Mediterranean Sea. *Emerg Infect Dis* 14, 792-794.
- Foster, G., Jahans, K.L., Reid, R.J., Ross, H.M., 1996, Isolation of *Brucella* species from cetaceans, seals and an otter. *Vet Rec* 138, 583-586.
- Fox, J.G., Harper, C.M.G., Dangler, C.A., Xu, S., Stamper, A., Dewhirst, F.E., 2000. Isolation and characterization of *Helicobacter* sp. from the gastric mucosa of dolphins. In: American Association of Zoo Veterinarians and International Association for Aquatic Animal Medicine Joint Conference, New Orleans, LA, 17-24 September.
- Geraci, J.R., Lounsbury, V.J., 1993, *Marine Mammals Ashore. A Field Guide for Strandings*. Texas A&M Sea Grant Publications, Galveston.
- Giles, C., Cavanagh, H.M., Noble, G., Vanniasinkam, T., 2010, Prevalence of equine adenovirus antibodies in horses in New South Wales, Australia. *Vet Microbiol* 143, 401-404.
- Giusti, D., Burette, J., Nguyen, Y., Leveque, N., Graesslin, O., Androletti, L., 2013, Virological diagnosis and management of two cases of congenital measles. *J Med Virol* 85, 2136-2138.
- Goldstein, J.D., Reese, E., Reif, J.S., Varela, R.A., McCulloch, S.D., Defran, R.H., Fair, P.A., Bossart, G.D., Hansen, L., 2006, Hematologic, biochemical, and cytologic findings from apparently

- healthy atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) inhabiting the Indian River Lagoon, Florida, USA. *J Wildl Dis* 42, 447-454.
- Goldstein, T., Colegrove, K.M., Hanson, M., Gulland, F.M., 2011, Isolation of a novel adenovirus from California sea lions *Zalophus californianus*. *Dis Aquat Organ* 94, 243-248.
- Grant, R.J., Kelley, K.L., Maruniak, J.E., Garcia-Maruniak, A., Barrett, T., Manire, C.A., Romero, C.H., 2010, Expression from baculovirus and serological reactivity of the nucleocapsid protein of dolphin morbillivirus. *Vet Microbiol* 143, 384-388.
- Gray, G.C., Goswami, P.R., Malasig, M.D., Hawksworth, A.W., Trump, D.H., Ryan, M.A., Schnurr, D.P., 2000, Adult adenovirus infections: loss of orphaned vaccines precipitates military respiratory disease epidemics. For the Adenovirus Surveillance Group. *Clin Infect Dis* 31, 663-670.
- Groch, K.R., Carvalho, V.L., Meirelles, A.C.O., Gonzales-Viera, O., Kolesnikovas, C.K.M., Zucca, D., Fernandez, A., Catao-Dias, J.L., 2013. Morbillivirus in live stranded cetaceans from Brazilian coast: Immunohistochemical evidence. In: 20th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals, Dunedin, New Zealand, 9-13 December 2013, pp. 85-86.
- Groch, K.R., Colosio, A.C., Marcondes, M.C., Zucca, D., Diaz-Delgado, J., Niemeyer, C., Marigo, J., Brandao, P.E., Fernandez, A., Luiz Catao-Dias, J., 2014, Novel cetacean morbillivirus in Guiana dolphin, Brazil. *Emerg Infect Dis* 20, 511-513.
- Haffar, A., Libeau, G., Moussa, A., Cecile, M., Diallo, A., 1999, The matrix protein gene sequence analysis reveals close relationship between peste des petits ruminants virus (PPRV) and dolphin morbillivirus. *Virus Res* 64, 69-75.
- Harrach, B., 2002, Aviadenovirus. Adenoviridae, In: Tidona, C.A., Darai, G. (Eds.) *The Springer index of viruses*. Springer-Verlag, New York, NY, pp. 9-18.
- Harrach, B., Benkő, M., Both, G.W., Brown, M., Davison, A.J., Echavarría, M., Hess, M., Jones, M.S., Kajon, A., Lehmkühl, H.D., Mautner, V., Mittal, S.K., Wadell, G. 2011. Family adenoviridae. In *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses*. , King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J., eds. (San Diego, CA, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.), pp. 125-141.
- Harrach, B., Meehan, B.M., Benko, M., Adair, B.M., Todd, D., 1997, Close phylogenetic relationship between egg drop syndrome virus, bovine adenovirus serotype 7, and ovine adenovirus strain 287. *Virology* 229, 302-308.
- Harvell, C.D., Kim, K., Burkholder, J.M., Colwell, R.R., Epstein, P.R., Grimes, D.J., Hofmann, E.E., Lipp, E.K., Osterhaus, A.D., Overstreet, R.M., Porter, J.W., Smith, G.W., Vasta, G.R., 1999, Emerging marine diseases--climate links and anthropogenic factors. *Science* 285, 1505-1510.
- Harwood, J., 1998, What killed the monk seals? *Nature* 393, 17-18.
- Harwood, J., Hall, A., 1990, Mass mortality in marine mammals: Its implications for population dynamics and genetics. *Trends Ecol Evol* 5, 254-257.
- Haubold, E.M., Aronson, J.F., Cowan, D.F., McGinnis, M.R., Cooper, C.R., Jr., 1998, Isolation of fungal rDNA from bottlenose dolphin skin infected with *Loboa lobo*. *Med Mycol* 36, 263-267.
- Hernández, M., Robinson, I., Aguilera, A., González, L.M., López-Jurado, L.F., Reyero, M.I., Cacho, E., Franco, J., López-Rodas, V., Costas, E., 1998, Did algal toxins cause monk seal mortality? *Nature* 393, 28-29.
- Hersh, S.L., Odell, D.K., Asper, E.D., 1990, Bottlenose dolphin mortality patterns in the Indian/Banana In: Leatherwood, S.P., Reeves, R.R. (Eds.) *The Bottlenose Dolphin*. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 155-164.

- Hess, M., Blocker, H., Brandt, P., 1997, The complete nucleotide sequence of the egg drop syndrome virus: an intermediate between mastadenoviruses and aviadenoviruses. *Virology* 238, 145-156.
- Hoegh-Guldberg, O., 1999, Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Mar. Freshwater Res.* 50, 539-866.
- Hogg, J.C., 2000, Latent adenoviral infection in the pathogenesis of emphysema: the Parker B. Francis Lectureship. *Chest* 117, 282S-285S.
- ICTV 2002. ICTVdb index of viruses (on line). In International Committee on Taxonomy of Viruses (UK).
- Inoshima, Y., Murakami, T., Ishiguro, N., Hasegawa, K., Kasamatsu, M., 2013, An outbreak of lethal adenovirus infection among different otariid species. *Vet Microbiol* 165, 455-459.
- Jauniaux, T., Charlier, G., Desmecht, M., Coignoul, F., 1998, Lesions of morbillivirus infection in a fin whale (*Balaenoptera physalus*) stranded along the Belgian coast. *Vet Rec* 143, 423-424.
- Jauniaux, T., Charlier, G., Desmecht, M., Haelters, J., Jacques, T., Losson, B., Van Gompel, J., Tavernier, J., Coignoul, F., 2000, Pathological findings in two fin whales (*Balaenoptera physalus*) with evidence of morbillivirus infection. *J Comp Pathol* 123, 198-201.
- Jauniaux, T., Petitjean, D., Brenez, C., Borrens, M., Brosens, L., Haelters, J., Tavernier, T., Coignoul, F., 2002, Post-mortem findings and causes of death of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded from 1990 to 2000 along the coastlines of Belgium and Northern France. *J Comp Pathol* 126, 243-253.
- Jawetz, E., 1959, The story of shipyard eye. *Br Med J* 1, 873-876.
- Jensen, E.D., Lipscomb, T., Van Bonn, B., Miller, G., Fradkin, J.M., Ridgway, S.H., 1998, Disseminated histoplasmosis in an Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Zoo Wildl Med* 29, 456-460.
- Jepson, P.D., Baker, J.R., Kuiken, T., Simpson, V.R., Kennedy, S., Bennett, P.M., 2000, Pulmonary pathology of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded in England and Wales between 1990 and 1996. *Vet Rec* 146, 721-728.
- Jepson, P.D., Brew, S., MacMillan, A.P., Baker, J.R., Barnett, J., Kirkwood, J.K., Kuiken, T., Robinson, I.R., Simpson, V.R., 1997, Antibodies to Brucella in marine mammals around the coast of England and Wales. *Vet Rec* 141, 513-515.
- Keck, N., Kwiatek, O., Dhermain, F., Dupraz, F., Boulet, H., Danes, C., Laprie, C., Perrin, A., Godenir, J., Micout, L., Libeau, G., 2010, Resurgence of Morbillivirus infection in Mediterranean dolphins off the French coast. *Vet Rec* 166, 654-655.
- Keicho, N., Elliott, W.M., Hogg, J.C., Hayashi, S., 1997, Adenovirus E1A gene dysregulates ICAM-1 expression in transformed pulmonary epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16, 23-30.
- Kemper, M.C., Woolford, L., Tomo, I., Dickason, C., Bastianello, S., Gibbs, S., Kelly, D., Wang, J., Bingham, J., 2013. Abnormally high dolphin mortalities linked to Morbillivirus in South Australia. In: 20 Biennial conference on the Biology of Marine Mammals, Dunedin, New Zealand, 9-13 December.
- Kennedy, S., 1998, Morbillivirus infections in aquatic mammals. *J. Comp. Pathol.* 119, 201-225.
- Kennedy, S., 2001, Viral diseases, In: Dierauf, F.L., Gulland, F. (Eds.) *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine*. CRC press, New York, USA, p. 297.
- Kennedy, S., Kuiken, T., Ross, H.M., McAliskey, M., Moffett, D., McNiven, C.M., Carole, M., 1992, Morbillivirus infection in two common porpoises (*Phocoena phocoena*) from the coasts of England and Scotland. *Vet Rec* 131, 286-290.
- Kennedy, S., Smyth, J.A., Cush, P.F., McAliskey, M., McCullough, S.J., Rima, B.K., 1991, Histopathologic and immunocytochemical studies of distemper in harbor porpoises. *Vet Pathol* 28, 1-7.

- Kennedy, S., Smyth, J.A., Cush, P.F., McCullough, S.J., Allan, G.M., McQuaid, S., 1988, Viral distemper now found in porpoises. *Nature* 336, 21.
- Kinsel, M.J., Boehm, J.R., Harris, B., Murnane, R.D., 1997, Fatal *Erysipelothrix rhusiopathiae* septicemia in a captive Pacific white-sided dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*). *J Zoo Wildl Med* 28, 494-497.
- Klonjkowski, B., Gilardi-Hebenstreit, P., Hadchouel, J., Randrianarison, V., Boutin, S., Yeh, P., Perricaudet, M., Kremer, E.J., 1997, A recombinant E1-deleted canine adenoviral vector capable of transduction and expression of a transgene in human-derived cells and in vivo. *Hum Gene Ther* 8, 2103-2115.
- Kohl, C., Vidovszky, M.Z., Muhldorfer, K., Dabrowski, P.W., Radonic, A., Nitsche, A., Wibbelt, G., Kurth, A., Harrach, B., 2012, Genome analysis of bat adenovirus 2: indications of interspecies transmission. *J Virol* 86, 1888-1892.
- Kovacs, G.M., LaPatra, S.E., D'Halluin, J.C., Benko, M., 2003, Phylogenetic analysis of the hexon and protease genes of a fish adenovirus isolated from white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) supports the proposal for a new adenovirus genus. *Virus Res* 98, 27-34.
- Krafft, A.E., Lichy, J.H., Lipscomb, T.P., Klaunberg, B.A., Kennedy, S., Taubenberger, J.K., 1995, Postmortem diagnosis of morbillivirus infection in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Atlantic and Gulf of Mexico epizootics by a polymerase chain reaction-based assay. *J Wildl. Dis.*, 410-415.
- Kumar, R., Kumar, V., Asthana, M., Shukla, S.K., Chandra, R., 2010, Isolation and identification of a fowl adenovirus from wild Black Kites (*Milvus migrans*). *J Wildl Dis* 46, 272-276.
- Lambertsen, R.H., Kohn, B.A., Sundberg, J.P., Buergelt, C.D., 1987, Genital papillomatosis in sperm whale bulls. *J Wildl Dis* 23, 361-367.
- Lehmkuhl, H.D., Cutlip, R.C., 1999, A new goat adenovirus isolate proposed as the prototype strain for goat adenovirus serotype 1. *Arch Virol* 144, 1611-1618.
- Lehmkuhl, H.D., Hobbs, L.A., Woods, L.W., 2001, Characterization of a new adenovirus isolated from black-tailed deer in California. *Arch Virol* 146, 1187-1196.
- Li, Y., Ge, X., Zhang, H., Zhou, P., Zhu, Y., Zhang, Y., Yuan, J., Wang, L.F., Shi, Z., 2010, Host range, prevalence, and genetic diversity of adenoviruses in bats. *J Virol* 84, 3889-3897.
- Lindmark, R., Thoren-Tolling, K., Sjoquist, J., 1983, Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera. *J Immunol Methods* 62, 1-13.
- Lipscomb, T.P., Kennedy, S., Moffett, D., Krafft, A., Klaunberg, B.A., Lichy, J.H., Regan, G.T., Worthy, G.A., Taubenberger, J.K., 1996, Morbilliviral epizootic in bottlenose dolphins of the Gulf of Mexico. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8, 283-290.
- Lipscomb, T.P., Schulman, F.Y., Moffett, D., Kennedy, S., 1994, Morbilliviral disease in Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the 1987-1988 epizootic. *J. Wildl. Dis.* 30, 567-571.
- Lyons, C., Welsh, M.J., Thorsen, J., Ronald, K., Rima, B.K., 1993, Canine distemper virus isolated from a captive seal. *Vet Rec* 132, 487-488.
- Mandell, G., Bennett, J., Dolin, R., 2000, Principles and practice of infectious disease. Churchill Livingstone, Philadelphia.
- Marschang, R.E., Michling, R., Benkö, M., Papp, T., Harrach, B., Böhm, R. 2003. Evidence for widespread adenovirus infection among snakes. In *Virus persistence and evolution. Proceedings of the 6th International Congress of Veterinary Virology. ZOOPOLE de´veloppement—ISPAIA*, Jestin, A., Clement, G., eds. (Ploufragan, France.), p. 152.
- Martins, C.A., Morete, M.E., Engel, H., Freitas, A.C., Secchi, E.R., Kinan, P.G., 2001, Aspects of habitat use patterns of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) off Abrolhos Bank breeding ground, southwest Atlantic. *Mem. Qld. Mus* 47, 563-570.

BIBLIOGRAFÍA

- Matsushima, Y., Shimizu, H., Kano, A., Nakajima, E., Ishimaru, Y., Dey, S.K., Watanabe, Y., Adachi, F., Mitani, K., Fujimoto, T., Phan, T.G., Ushijima, H., 2013, Genome sequence of a novel virus of the species human adenovirus d associated with acute gastroenteritis. *Genome Announc* 1.
- Mazzariol, S., Marcer, F., Mignone, W., Serracca, L., Gorla, M., Marsili, L., Di Guardo, G., Casalone, C., 2012, Dolphin Morbillivirus and *Toxoplasma gondii* coinfection in a Mediterranean fin whale (*Balaenoptera physalus*). *BMC Vet. Res.* 8, 20.
- McCullough, S.J., McNeilly, F., Allan, G.M., Kennedy, S., Smyth, J.A., Cosby, S.L., McQuaid, S., Rima, B.K., 1991, Isolation and characterisation of a porpoise morbillivirus. *Arch Virol* 118, 247-252.
- Melero, M., Rubio-Guerri, C., Crespo, J.L., Arbelo, M., Vela, A.I., Garcia-Parraga, D., Sierra, E., Dominguez, L., Sanchez-Vizcaino, J.M., 2011, First case of erysipelas in a free-ranging bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) stranded in the Mediterranean Sea. *Dis Aquat Organ* 97, 167-170.
- Miller, D.L., Ewing, R.Y., Bossart, G.D., 2000, Emerging and Resurging Diseases, In: Dierauf, L.A., Gulland, F.M.D. (Eds.) *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine*. CRC Press, Boca Raton, pp. 15-16.
- Miller, W.G., Adams, L.G., Ficht, T.A., Cheville, N.F., Payeur, J.P., Harley, D.R., House, C., Ridgway, S.H., 1999, Brucella-induced abortions and infection in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *J Zoo Wildl Med* 30, 100-110.
- Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C., Studdert, M.J., 1999., *Veterinary Virology*. Academic press.
- Nielsen, O., Smith, G., Weingartl, H., Lair, S., Measures, L., 2008, Use of a SLAM transfected Vero cell line to isolate and characterize marine mammal morbilliviruses using an experimental ferret model. *J Wildl Dis* 44, 600-611.
- NOAA 2014. 2013-2014 Bottlenose dolphin Dolphin Unusual Mortality Event in the Mid-Atlantic (Available online: <http://www.nmfs.gov/pr/health/mmune/midatldolphins2013.html>).
- Orvell, C., Blixenkron-Møller, M., Svansson, V., Have, P., 1990, Immunological relationships between phocid and canine distemper virus studied with monoclonal antibodies. *J Gen Virol* 71 (Pt 9), 2085-2092.
- Osterhaus, A., Groen, J., Niesters, H., van de Bildt, M., Martina, B., Vedder, L., Vos, J., van Egmond, H., Abou-Sidi, B., Barham, M.E., 1997, Morbillivirus in monk seal mass mortality. *Nature* 388, 838-839.
- Osterhaus, A.D., de Swart, R.L., Vos, H.W., Ross, P.S., Kenter, M.J., Barrett, T., 1995, Morbillivirus infections of aquatic mammals: newly identified members of the genus. *Vet Microbiol* 44, 219-227.
- Philippa, J.D., Leighton, F.A., Daoust, P.Y., Nielsen, O., Pagliarulo, M., Schwantje, H., Shury, T., Van Herwijnen, R., Martina, B.E., Kuiken, T., Van de Bildt, M.W., Osterhaus, A.D., 2004, Antibodies to selected pathogens in free-ranging terrestrial carnivores and marine mammals in Canada. *Vet Rec* 155, 135-140.
- Pitcovski, J., Mualem, M., Rei-Koren, Z., Krispel, S., Shmueli, E., Peretz, Y., Gutter, B., Gallili, G.E., Michael, A., Goldberg, D., 1998, The complete DNA sequence and genome organization of the avian adenovirus, hemorrhagic enteritis virus. *Virology* 249, 307-315.
- Raga, J.A., Banyard, A., Domingo, M., Corteyn, M., Van Bresse, M.F., Fernandez, M., Aznar, F.J., Barrett, T., 2008, Dolphin morbillivirus epizootic resurgence, Mediterranean Sea. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 471-473.

- Raut, C.G., Yadav, P.D., Towner, J.S., Amman, B.R., Erickson, B.R., Cannon, D.L., Sivaram, A., Basu, A., Nichol, S.T., Mishra, A.C., Mourya, D.T., 2012, Isolation of a novel adenovirus from *Rousettus leschenaultii* bats from India. *Intervirology* 55, 488-490.
- Reidarson, T.H., 2003, Cetacea (Whales, Dolphins, Porpoises), In: Fowler, M., Miller, E.R. (Eds.) *Zoo and Wild Animal Medicine*. Saunders, Elsevier Science, Port Melbourne, pp. 442-459.
- Reidarson, T.H., Griner, L.A., Pappagianis, D., McBain, J., 1998a, Coccidioidomycosis in a bottlenose dolphin. *J Wildl Dis* 34, 629-631.
- Reidarson, T.H., McBain, J., House, C., King, D.P., Stott, J.L., Krafft, A., Taubenberger, J.K., Heyning, J., Lipscomb, T.P., 1998b, Morbillivirus infection in stranded common dolphins from the Pacific Ocean. *J Wildl Dis* 34, 771-776.
- Renner, M.S., Ewing, R., Bossart, G.D., Harris, D., 1999, Sublingual squamous cell carcinoma in an Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Zoo Wildl Med* 30, 573-576.
- Rosel, P.E., Hansen, L., Hohn, A.A., 2009, Restricted dispersal in a continuously distributed marine species: common bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* in coastal waters of the western North Atlantic. *Mol Ecol* 18, 5030-5045.
- Roshkhar, F., Mohammadi, G., Mayameci, A., 2012, Serological evaluation of relationship between viral pathogens (BHV-1, BVDV, BRSV, PI-3V, and Adeno3) and dairy calf pneumonia by indirect ELISA. *Trop Anim Health Prod* 44, 1105-1110.
- Ross, P.S., Visser, I.K., Broeders, H.W., van de Bildt, M.W., Bowen, W.D., Osterhaus, A.D., 1992, Antibodies to phocine distemper virus in Canadian seals. *Vet Rec* 130, 514-516.
- Rowles, T.R., Schwacke, L.S., Wells, R., Saliki, J.T., Hansen, L., Hohn, A., Townsend, F.I., Sayre, R.A., Hall, A.J., 2011, Evidence of susceptibility to morbillivirus infection in cetaceans from United States. *Mar. Mamm. Sci.* 27, 1-19.
- Rubio-Guerri, C., Melero, M., Esperon, F., Belliere, E.N., Arbelo, M., Crespo, J.L., Sierra, E., Garcia-Parraga, D., Sanchez-Vizcaino, J.M., 2013, Unusual striped dolphin mass mortality episode related to cetacean morbillivirus in the Spanish Mediterranean Sea. *BMC Vet Res* 9, 106.
- Russell, W.C., Benko, M., 1999, Animal adenoviruses, In: Granoff, A., Webster, R.G. (Eds.) *Encyclopedia of virology*. Academic Press, New York, NY, pp. 14-21.
- Saliki, J.T., Lehenbauer, T.W., 2001, Monoclonal antibody-based competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of morbillivirus antibody in marine mammal sera. *J Clin Microbiol* 39, 1877-1881.
- Schulman, F.Y., Lipscomb, T.P., Moffett, D., Krafft, A.E., Lichy, J.H., Tsai, M.M., Taubenberger, J.K., Kennedy, S., 1997, Histologic, immunohistochemical, and polymerase chain reaction studies of bottlenose dolphins from the 1987-1988 United States Atlantic coast epizootic. *Vet Pathol* 34, 288-295.
- Seibold, H.R., Neal, J.E., 1956, Erysipelothrix septicaemia in the porpoise. *J Am Vet Med Assoc* 1956, 537-539.
- Siebert, U., Wunschmann, A., Weiss, R., Frank, H., Benke, H., Frese, K., 2001, Post-mortem findings in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from the German North and Baltic Seas. *J Comp Pathol* 124, 102-114.
- Sierra, E., Sanchez, S., Saliki, J.T., Blas-Machado, U., Arbelo, M., Zucca, D., Fernandez, A., 2014a, Retrospective study of etiologic agents associated with nonsuppurative meningoencephalitis in stranded cetaceans in the canary islands. *J Clin Microbiol* 52, 2390-2397.
- Sierra, E., Zucca, D., Arbelo, M., Garcia-Alvarez, N., Andrada, M., Deniz, S., Fernandez, A., 2014b, Fatal systemic morbillivirus infection in bottlenose dolphin, canary islands, Spain. *Emerg Infect Dis* 20, 269-271.

- Singh-Naz, N., Rodriguez, W., 1996, Adenoviral infections in children. *Adv Pediatr Infect Dis* 11, 365-388.
- Smith, A.W., Skilling, D.E., 1979, Viruses and virus diseases of marine mammals. *J Am Vet Med Assoc* 175, 918-920.
- Smith, A.W., Skilling, D.E., Benirschke, K., Albert, T.F., Barlough, J.E., 1987, Serology and virology of the bowhead whale (*Balaena mysticetus* L.). *J Wildl Dis* 23, 92-98.
- Soto, S., Alba, A., Ganges, L., Vidal, E., Raga, J.A., Alegre, F., Gonzalez, B., Medina, P., Zorrilla, I., Martinez, J., Marco, A., Perez, M., Perez, B., Perez de Vargas Mesas, A., Martinez Valverde, R., Domingo, M., 2011, Post-epizootic chronic dolphin morbillivirus infection in Mediterranean striped dolphins *Stenella coeruleoalba*. *Dis Aquat Organ* 96, 187-194.
- Stamper, M.A., Gulland, F.M., Spraker, T., 1998, Leptospirosis in rehabilitated Pacific harbor seals from California. *J Wildl Dis* 34, 407-410.
- Stephens, N., Duignan, P.J., Wang, J., Bingham, J., Finn, H., Bejder, L.s., Patterson, A.P., Holyoake, C., 2014, Cetacean morbillivirus in coastal Indo-Pacific bottlenose dolphins, Western Australia. *Emerg Infect Dis* 20, 666-670.
- Stone, B.M., Blyde, D.J., Saliki, J.T., Blas-Machado, U., Bingham, J., Hyatt, A., Wang, J., Payne, J., Crameri, S., 2011, Fatal cetacean morbillivirus infection in an Australian offshore bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Aust Vet J* 89, 452-457.
- Stone, B.M., Blyde, D.J., Saliki, J.T., Morton, J.M., 2012, Morbillivirus infection in live stranded, injured, trapped, and captive cetaceans in southeastern Queensland and northern New South Wales, Australia. *J Wildl Dis* 48, 47-55.
- Taubenberger, J.K., Tsai, M., Krafft, A.E., Lichy, J.H., Reid, A.H., Schulman, F.Y., Lipscomb, T.P., 1996, Two morbilliviruses implicated in bottlenose dolphin epizootics. *Emerg Infect Dis* 2, 213-216.
- Taubenberger, J.K., Tsai, M.M., Atkin, T.J., Fanning, T.G., Krafft, A.E., Moeller, R.B., Kodosi, S.E., Mense, M.G., Lipscomb, T.P., 2000, Molecular genetic evidence of a novel morbillivirus in a long-finned pilot whale (*Globicephalus melas*). *Emerg Infect Dis* 6, 42-45.
- Thomson, D., Meers, J., Harrach, B., 2002, Molecular confirmation of an adenovirus in brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*). *Virus Res* 83, 189-195.
- Thurman, G.D., Downes, S.J., Fothergill, M.B., Goodwin, N.M., Hegarty, M.M., 1983, Diagnosis and successful treatment of subacute erysipelas in a captive dolphin. *J S Afr Vet Assoc* 54, 193-200.
- Tsur, I., Yakobson, B., Elad, D., Moffett, D., Kennedy, S., 1997, Morbillivirus infection in a bottlenose dolphin from the Mediterranean Sea. *European Journal of Veterinary Pathology* 3, 83-85.
- Turnbull, B.S., Cowan, D.F., 1999, Angiomatosis, a newly recognized disease in Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the Gulf of Mexico. *Vet Pathol* 36, 28-34.
- Uchida, K., Muranaka, M., Horii, Y., Murakami, N., Yamaguchi, R., Tateyama, S., 1999, Non-purulent meningoencephalomyelitis of a Pacific striped dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*). The first evidence of morbillivirus infection in a dolphin at the Pacific Ocean around Japan. *J Vet Med Sci* 61, 159-162.
- Van Bresseem, M.F., Duignan, P.J., Banyard, A., Barbieri, M., Colegrove, K.M., De Guise, S., Di Guardo, G., Dobson, A., Domingo, M., Fauquier, D., Fernandez, A., Goldstein, T., Grenfell, B., Groch, K.R., Gulland, F., Jensen, B.A., Jepson, P.D., Hall, A., Kuiken, T., Mazzariol, S., Morris, S.E., Nielsen, O., Raga, J.A., Rowles, T.K., Saliki, J., Sierra, E., Stephens, N., Stone, B., Tomo, I., Wang, J., Waltzek, T., Wellehan, J.F., 2014, Cetacean morbillivirus: current knowledge and future directions. *Viruses* 6, 5145-5181.

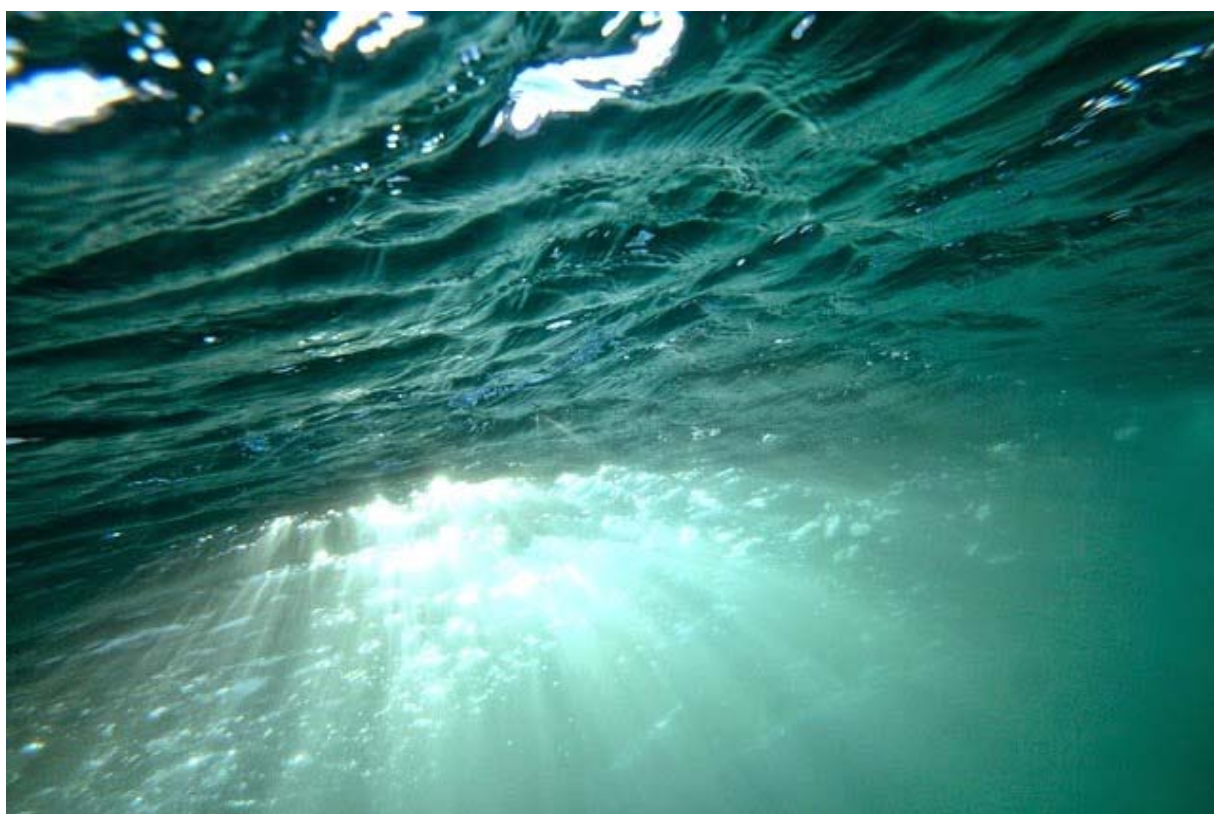
BIBLIOGRAFÍA

- Van Bresseem, M.F., Van Waerebeek, K., Fleming, M., Barrett, T., 1998, Serological evidence of morbillivirus infection in small cetaceans from the Southeast Pacific. *Vet Microbiol* 59, 89-98.
- Van Bresseem, M.F., Van Waerebeek, K., Piérard, G.E., Desaintes, C., 1996, Genital and lingual warts in small cetaceans from coastal Peru. *Dis. Aquat. Organisms* 26, 1-10.
- Van Bresseem, M.F., Van Waerebeek, K., Raga, J.A., 1999, A review of virus infections of cetaceans and the potential impact of morbilliviruses, poxviruses and papillomaviruses on host population dynamics. *Dis Aquat Organ* 38, 53-65.
- Van Bresseem, M.F., Visser, I.K., De Swart, R.L., Orvell, C., Stanzani, L., Androukaki, E., Siakavara, K., Osterhaus, A.D., 1993, Dolphin morbillivirus infection in different parts of the Mediterranean Sea. *Arch Virol* 129, 235-242.
- Van Bresseem, M.F., Visser, I.K., Van de Bildt, M.W., Teppema, J.S., Raga, J.A., Osterhaus, A.D., 1991, Morbillivirus infection in Mediterranean striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Vet Rec* 129, 471-472.
- Van Bresseem, M.F., Waerebeek, K.V., Jepson, P.D., Raga, J.A., Duignan, P.J., Nielsen, O., Di Benedetto, A.P., Siciliano, S., Ramos, R., Kant, W., Peddemors, V., Kinoshita, R., Ross, P.S., López-Fernandez, A., Evans, K., Crespo, E., Barrett, T., 2001a, An insight into the epidemiology of dolphin morbillivirus worldwide. *Veterinary Microbiology* 20, 287-304.
- Van Bresseem, M.F., Waerebeek, K.V., Jepson, P.D., Raga, J.A., Duignan, P.J., Nielsen, O., Di Benedetto, A.P., Siciliano, S., Ramos, R., Kant, W., Peddemors, V., Kinoshita, R., Ross, P.S., López-Fernandez, A., Evans, K., Crespo, E., Barrett, T., 2001b, An insight into the epidemiology of dolphin morbillivirus worldwide. *Vet Microbiol* 20, 287-304.
- van de Bildt, M.W., Kuiken, T., Osterhaus, A.D., 2005, Cetacean morbilliviruses are phylogenetically divergent. *Arch Virol* 150, 577-583.
- van de Bildt, M.W., Martina, B.E., Vedder, E.J., Androukaki, E., Kotomatas, S., Komnenou, A., Sidi, B.A., Jiddou, A.B., Barham, M.E., Niesters, H.G., Osterhaus, A.D., 2000, Identification of morbilliviruses of probable cetacean origin in carcasses of Mediterranean monk seals (*Monachus monachus*). *Vet Rec* 146, 691-694.
- van de Bildt, M.W., Vedder, E.J., Martina, B.E., Sidi, B.A., Jiddou, A.B., Ould Barham, M.E., Androukaki, E., Komnenou, A., Niesters, H.G., Osterhaus, A.D., 1999, Morbilliviruses in Mediterranean monk seals. *Vet Microbiol* 69, 19-21.
- Visser, I.K., Kumarev, V.P., Orvell, C., de Vries, P., Broeders, H.W., van de Bildt, M.W., Groen, J., Teppema, J.S., Burger, M.C., UytdeHaag, F.G., et al., 1990, Comparison of two morbilliviruses isolated from seals during outbreaks of distemper in north west Europe and Siberia. *Arch Virol* 111, 149-164.
- Visser, I.K., Van Bresseem, M.F., de Swart, R.L., van de Bildt, M.W., Vos, H.W., van der Heijden, R.W., Saliki, J.T., Orvell, C., Kitching, P., Kuiken, T., et al., 1993, Characterization of morbilliviruses isolated from dolphins and porpoises in Europe. *J Gen Virol* 74 (Pt 4), 631-641.
- Webb, J., 1991, Dolphin epidemic spreads to Greece. *New scientist* 131, 18.
- Wedekin, L.L., Freitas, A., Engel, M.H., Sazima, I., 2004, Rough-toothed dolphins (*Steno bredanensis*) catch diskfishes while interacting with humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) off Abrolhos Bank breeding ground, southwest Atlantic. *Aquat. Mamm* 30, 327-329.
- Wellehan, J.F., Johnson, A.J., Harrach, B., Benko, M., Pessier, A.P., Johnson, C.M., Garner, M.M., Childress, A., Jacobson, E.R., 2004, Detection and analysis of six lizard adenoviruses by

BIBLIOGRAFÍA

- consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the atadenoviruses. *J Virol* 78, 13366-13369.
- West, K.L., Levine, G., Jacob, J., Jensen, B., Sanchez, S., Colegrove, K., Rotstein, D., 2015, Coinfection and vertical transmission of Brucella and Morbillivirus in a neonatal sperm whale (*Physeter macrocephalus*) in Hawaii, USA. *J Wildl Dis* 51, 227-232.
- West, K.L., Sanchez, S., Rotstein, D.S., Robertson, K.M., Dennison, S., Levine, G., Davis, N., Schofield, D., Potter, C.W., Jensen, B., 2013, A Longman's beaked whale (*Indopacetus pacificus*) strands in Maui, Hawaii, with first case of morbillivirus in the central Pacific. *Mar. Mamm. Sci.* 29, 767-776.
- Wilson, M.E., 1999, Emerging infections and disease emergence. *Emerg Infect Dis* 5, 308-309.
- Woo, P.C., Lau, S.K., Wong, B.H., Fan, R.Y., Wong, A.Y., Zhang, A.J., Wu, Y., Choi, G.K., Li, K.S., Hui, J., Wang, M., Zheng, B.J., Chan, K.H., Yuen, K.Y., 2012, Feline morbillivirus, a previously undescribed paramyxovirus associated with tubulointerstitial nephritis in domestic cats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 5435-5440.
- Yang, W.C., Pang, V.F., Jeng, C.R., Chou, L.S., Chueh, L.L., 2006, Morbilliviral infection in a pygmy sperm whale (*Kogia breviceps*) from Taiwanese waters. *Vet Microbiol* 116, 69-76.
- Yolken, R.H., Lawrence, F., Leister, F., Takiff, H.E., Strauss, S.E., 1982, Gastroenteritis associated with enteric type adenovirus in hospitalized infants. *J Pediatr* 101, 21-26.
- Young, J.F., Huff, D.G., Ford, J.K.B., Anthony, J.M.G., Ellis, G., Lewis, R.L., 1997. First case report: mortality of wild resident killer whale (*Orcinus orca*) from *Erysipelothrix rhusopathiae*. In: *Proc 28th Annu Conf Int Assoc Aquat Anim Med*, Harderwijk, pp. 70-74.

ANEXOS



ANEXOS

Óceano Provincia/Especies	Años	Países	Diagnóstico	Cepa	Referencias
Atlántico oriental /Mar del Norte					
<i>Phocoenaphocoena</i>	1988-1990	Irlanda, UK, Países Bajos	AV, IHC, S, RT-PCR	PMV	[1,2,3,4,5,6]
<i>Delphinus delphis</i>	1988-1990	UK, PaísesBajos	S	CeMV	[2,5,6]
<i>Lagenorhynchus albirostris</i>	1988-1990, 2007, 2011	Alemania, PaísesBajos	S, IHC, RT-PCR	DMV	[2,7,5,8]
<i>Balaenoptera physalus</i>	1983	Islandia	S	CeMV	[9]
<i>B. physalus</i>	1997-1998	Bélgica, Francia	IHC	Desconocido	[10]
<i>Tursiops truncatus</i>	1999	Kent, UK	S	CeMV	[6]
<i>Globicephalamacrorhynchus</i>	1996	Islas Canarias	IHC,RT-PCR	PWMV	[11]
<i>T. truncatus</i>	2005	Islas Canarias	IHC,RT-PCR	DMV	[12]
<i>S. coreulealba</i>	2002-2011	Islas Canarias	IHC,RT-PCR	DMV	[13]
<i>D. delphis</i>	2007	Islas Canarias	IHC,RT-PCR	DMV	[13]
Mar Mediterráneo					
<i>S. coreuleoalba</i>	1990-1992	España, Francia, Italia, Grecia	AV, IHC, S, RT-PCR	DMV	[14,15,16,17,18]
<i>S. coreuleoalba</i>	2006-2007	España, Francia, Italia	IHC,RT-PCR	DMV	[19,20,21]
<i>T. truncatus</i>	1994; 2007- 2008	España, Israel, Franciae Italia	IHC,RT- PCR, S	DMV	[19,6,20,22]
<i>D. delphis</i>	1990	Italia	S	CeMV	[16]
<i>Globicephalamelas</i>	2006-2007	España, Francia	IHC,RT-PCR	DMV	[23]
<i>Grampus griseus</i>	1997, 1999	Valencia (España)	S	CeMV	[6]
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	1993	Toscana (Italia)	RT-PCR	DMV	[17]
<i>B. physalus</i>	2011	Toscana (Italia)	RT-PCR	DMV	[24]
Noroeste Atlántico					
<i>T. truncatus</i>	1982	Florida (USA)	S, IHC	CeMV	[25,26]
<i>T. truncatus</i>	1987-1988	Costa este USA	IHC,RT-PCR	DMV y PMV	[27,28]
<i>T. truncatus</i>	1993-1994	Golfo de Méjico (USA)	IHC,RT-PCR	PMV	[25,27,28]
<i>T. truncatus</i>	2003-2007	Florida (USA)	S, IHC	CeMV	[29,30]

ANEXOS

Óceáno Provincia/Especies	Años	Países	Diagnóstico	Cepa	Referencias
<i>T. truncatus</i>	2013-2014	Costa este USA	IHC,RT-PCR	DMV	[31,32]
<i>T. truncatus</i>	1992-1994	Costa este USA	S	CeMV	[25]
<i>G. Melas</i>	1982-1993	Costa noreste de USA	S	CeMV	[33]
<i>G. mrorhynchus</i>	1986-1994	Florida, USA	S	CeMV	[33]
<i>G. melas</i>	Finales 90	New Jersey, USA	IHC,RT-PCR	PWMV	[34]
<i>S. coreuleoalba</i>	1991-1993	Costa noreste USA	S	CeMV	[35]
<i>Stenella frontalis</i>	1993	Costa noreste USA	S	CeMV	[35]
<i>D. delphis</i>	1980-1994	Costa noreste USA	S	CeMV	[35]
<i>Lagenorhynchus acutus</i>	195-1993	Costa noreste USA	S	CeMV	[35]
<i>Kogiabreviceps</i>	1983-1991	Costa sureste USA	S	CeMV	[35]
<i>Feres aattenuata</i>	1983	Costa sureste USA	S	CeMV	[35]
<i>Pseudorca crassidens</i>	1982-1988	Costa sureste USA	S	CeMV	[35]
<i>Lagenodelphis hosei</i>	1994	Golfo de Méjico	S	CeMV	[35]
<i>P. phocoena</i>	1993-1994	Costa este, Canada	S	CeMV	[35]
Suroeste Atlántico					
<i>L. hosei</i>	1999	Puerto Madryn, Argentina	S	CeMV	[6]
<i>L. hosei</i>	1999	Río de Janeiro, Brasil	S	CeMV	[6]
<i>Sotalia guianensis</i>	2010	Espiritu Santo, Brasil	IHC,RT-PCR	CeMV	[36]
Pacífico oriental					
<i>Lagenorhynchus obscurus</i>	1993-1994	Perú Central	S	CeMV	[37]
<i>T. truncatus</i>	1993-1995	Perú Central	S	CeMV	[37]
<i>Delphinus capensis</i>	1993-1995	Perú Central	S	CeMV	[37]
<i>D. delphis</i>	1995-1997	California USA	S,IHC,RT- PCR	CeMV	[34,38]
<i>Indopacetus pacificus</i>	2010	Hawaii, USA	IHC, RT- PCR	BWMV	[39]

ANEXOS

Óceáno Provincia/Especies	Años	Países	Diagnóstico	Cepa	Referencias
<i>Physeter macrocephalus</i>	2011	Hawaii, USA	RT-PCR	BWMV	[40]
Pacífico occidental					
<i>Lagenorhynchus sobliques</i>	1993-1995	Miyazaki (Ja pón)	IHC	Desconocido	[41]
<i>K. breviceps</i>	2009	SW, (Taiwan)	IHC, RT- PCR	DMV	[42]
<i>G. melas</i>	1997	Northland (Nueva Zelanda)	S	CeMV	[6]
<i>T. truncatus</i>	1997	Tasmania, Australia	S	CeMV	[6]
<i>Peponocephala electra</i>	2005-2007	NE Australia	S	CeMV	[43]
<i>Tursiops aduncus</i>	2005-2010	NE Australia	S	CeMV	[43]
<i>L. hovei</i>	2006	NE Australia	S	CeMV	[43]
<i>T. truncatus</i>	2009-2010	Queensland (Australia)	S, IHC, RT- PCR	DMV	[43,44]
Oceáno Índico					
<i>D. delphis</i>	1999	East London (Sudáfrica)	S	CeMV	[6]
<i>T. aduncus</i>	2009	Australia occidental	IHC, RT-PCR	CeMV	[45]
Oceáno Antártico					
<i>T. aduncus</i>	2012-2013	Sur de Australia	IHC, RT-PCR	CeMV	[46]
<i>T. truncatus</i>	2013	Sur de Australia	IHC, RT-PCR	CeMV	[46]
<i>D. delphis</i>	2012-2013	Sur de Australia	RT-PCR	CeMV	[46]

Anexo I: Infecciones por CeMV en odontetos y misticetos en todo el mundo. Las referencias utilizadas son las siguientes: [1]: (McCullough et al., 1991), [2]: (Visser et al., 1993), [3]: (Kennedy et al., 1988), [4]: (Kennedy et al., 1991), [5]: (Van Bressem et al., 1998a), [6]: (Van Bressem et al., 2001), [7]: (van Elk et al., 2014), [8]: (Wohlsein et al., 2007), [9]: (Blizenkrone-Moller et al., 1994), [10]: (Jauniaux et al., 2000), [11]: (Bellière et al., 2011), [12]: (Sierra et al., 2014b), [13]: (Sierra et al., 2014a), [14]: (Domingo et al., 1990) [15]: (Van Bressem et al., 1991), [16]: (Van Bressem et al., 1993), [17]: (Di Guardo et al., 1995), [18]: (Aguilar and Raga, 1993), [19]: (Keck et al., 2010), [20]: (Di Guardo et al., 2013), [21]: (Raga et al., 2008), [22]: (Tsur et al., 1997), [23]: (Fernandez et al., 2008), [24]: (Mazzariol et al., 2012), [25]: (Duignan et al., 1996), [26]: (Hersh et al., 1990), [27]: (Lipscomb et al., 1994), [28]: (Taubenberger et al., 1996), [29]: (Bossart et al., 2010), [30]: (Bossart et al., 2011), [31]: (NOAA, 2014a), [32]: (NOAA, 2014b), [33]: (Duignan et al., 1995b), [34]: (Taubenberger et al., 2000), [35]: (Duignan et al., 1995a), [36]: (Groch et al., 2014), [37]: (Van Bressem et al., 1998b), [38]: (Reidarson et al., 1998), [39]: (West et al., 2013) [40]: (West et al., 2015), [41]: (Uchida et al., 1999), [42]: (Yang et al., 2006), [43]: (Stone et al., 2012), [44]: (Stone et al., 2011), [45]: (Stephens et al., 2014), [46]: (Kemper et al., 2013)

