

**ESTUDIO MOLECULAR DE UNA NUEVA CEPA DE MORBILLIVIRUS DE
CETÁCEO AISLADA DE UN CALDERON TROPICAL
MOLECULAR STUDY OF A NEW STRAIN OF CETACEAN MORBILLIVIRUS
FROM A SHORTFIN PILOT WHALE**

**Edwige Nina Bellière¹, Fernando Esperón Fajardo¹, José Manuel Sánchez-Vizcaíno
Rodríguez²**

¹ Grupo de Epidemiología y Sanidad Ambiental, CISA-INIA; ² Dpto Sanidad Animal,
Facultad Veterinaria, UCM

RESUMEN

El morbillivirus de cetáceo (CeMV) es el virus más patógeno de cetáceos. Comprende tres cepas cuyos nombres provienen de la especie de donde se aisló por primera vez: el morbillivirus de delfín (DMV), el morbillivirus de la marsopa (PMV) y el morbillivirus del calderón (PWMV). En este estudio se pretende completar la caracterización molecular de una nueva cepa de CeMV obtenida del encéfalo de un calderón tropical que varó muerto en las Islas Canarias, con lesiones compatibles con enfermedad por morbillivirus. La construcción de árboles filogenéticos con todas las especies de morbillivirus indicó una mayor homología con PWMV por lo que se propone llamar esta nueva cepa “PWMV II”. Además, en base a los árboles filogenéticos y una exhaustiva revisión bibliográfica, se hace la propuesta de renombrar las tres cepas de CeMV en “CeMV-1” para el DMV, “CeMV-2” para el PMV y “CeMV-3” para el PWMV.

Palabras clave: *Paramyxoviridae*, morbillivirus de cetáceo, Pilot Whale morbillivirus, calderón tropical, caracterización molecular, Islas Canarias.

SUMMARY

Cetacean morbillivirus (CeMV) is the most pathogenic virus in cetaceans. It includes three strains whose names refer to the species of odontocete from which it was initially isolated: Dolphin morbillivirus (DMV), Porpoise morbillivirus (PMV) and Pilot Whale morbillivirus (PWMV). The aim of this work was to complete a molecular characterization of a new strain of CeMV obtained from the brain of a short finned pilot whale stranded dead around Canary Islands with lesions compatible with morbilliviral disease. Phylogenetic trees including sequences of all the morbillivirus species have shown a higher homology with PWMV, so this strain is tentatively named “PWMV II”. Moreover, from the phylogenetic trees analysis and an exhaustive bibliographical review we propose new names for the CeMV strains: “CeMV-1” for DMV, “CeMV-2” for PMV and “CeMV-3” for PWMV.

Key words: *Paramyxoviridae*, Cetacean morbillivirus, Pilot Whale morbillivirus, shortfin pilot whale, molecular characterization, Canary Islands.

INTRODUCCIÓN

El morbillivirus de cetáceos es un virus perteneciente a la familia *Paramyxoviridae*. Se considera el agente patógeno más importante en cetáceos, siendo el causante de importantes episodios de varamientos en todo el mundo y en varias especies de cetáceos odontocetos. Inicialmente, se han descrito el morbillivirus del delfín (“dolphin morbillivirus” o DMV) (Domingo *et al.*, 1990), que se describió por primera vez en delfines, y el morbillivirus de la marsopa (“porpoise morbillivirus” o PMV), que se describió por primera vez en marsopas (Kennedy *et al.*, 1988). Basándose en estudios antigénicos y filogenéticos, el DMV y el PMV se consideran dos cepas de una misma especie viral, el CeMV (van de Bildt *et al.*, 2005). En 2000, se describe una tercera cepa aislada de un calderón, denominada morbillivirus del calderón (“pilot whale morbillivirus” o PWMV) (Taubenberger *et al.*, 2000).

En el presente escrito, que es parte y complemento de un trabajo recientemente mandado a publicar (Bellière *et al.*), se hallan nuevas secuencias de los genes de la nucleoproteína, fosfoproteína, proteína de fusión y hemaglutinina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó el diagnóstico y la caracterización molecular del aislado a partir de la muestra “20E” de encéfalo conservado a -70°C obtenida de un calderón tropical (*Globicephala macrorhynchus*) varado en Canarias en 1996, que presentaba una encefalitis no supurativa difusa, compatible con una infección por morbillivirus. El diagnóstico molecular se realizó empleando una RT-PCR que detecta un fragmento de la fosfoproteína, inicialmente descrita por Barrett *et al.* (1993) y modificada por Reidarson *et al.* (1998), cuyos primers son el DMV C y el DMV P2 (Tabla 1).

El control positivo empleado fue una muestra de la cepa DMV muc, proporcionada por el Dr. Barrett (Pirbright Institute, UK), crecida en células Vero bajo condiciones estándares (Mohanty y Dutta, 1981; Visser *et al.*, 1993). Para la extracción de ARN, 1 g de tejido se maceró en 10 mL de PBS estéril. Los macerados se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 minutos, y se procedió la extracción con trizol de ARN a partir de 100 µL de sobrenadante. El total del ARN extraído se eluyó en 10 µL de agua estéril. Posteriormente a la confirmación de la presencia de morbillivirus por secuenciación, se procedió a la caracterización molecular del aislado, empleando otras 23 RT-PCR (Tabla 1), combinando 22 cebadores diferentes, de los

cuales 16 fueron diseñados en este estudio a partir de la secuencia del genoma completo de DMV (número de acceso al GenBank AJ608288CG). Los productos de RT-PCR (10 µL) se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, se purificaron y secuenciaron. Las secuencias se compararon con las previamente recogidas en el GenBank usando el buscador BLAST. Se alinearon las secuencias con el software Clustal W, y el análisis filogenético se llevó a cabo con el software MEGA 4.0 Tamura *et al.* (2007).

Tabla 1. Lista de las 24 RT-PCR empleadas, donde las siete reacciones que dieron lugar a producto están marcados con un asterisco (*)

RT-PCR	Nombre de los cebadores	T ^a de fusion (°C)	Tamaño esperado del amplicon (pares de bases)	Referencia
1	DMV N1 – DMV N2	48	509	Van de Bilt <i>et al.</i> (2005)
*2	DMV C – DMV P2	51	429	Barrett <i>et al.</i> (1993), Reidarson <i>et al.</i> (1998)
3	P1 - M2	51	298	Este estudio
4	M3 - F4	51	256	Este estudio
5	F5 - F6	51	589	Este estudio
*6	FuF – FuR	55	192	Este estudio
7	F7 – F8	51	215	Este estudio
8	F9 – H10	51	245	Este estudio
*9	CeMV He1 – CeMV He2	59	233	Este estudio
10	DMV C – M2	48	1434	Este estudio
11	P1 – F4	48	1731	Este estudio
12	M3 – F6	48	1126	Este estudio
13	F5 – DMV FuR	48	1395	Este estudio
14	DMV FuF – F8	51	345	Este estudio
15	DMV FuF – H10	51	727	Este estudio
*16	F7 – H10	51	597	Este estudio
*17	F7 – CeMV He2	51	814	Este estudio
18	NgeneF – DMVN2	48	863	Este estudio
*19	N gene F – N gene R	48	230	Taubenberger <i>et al.</i> (2000)
20	DMVN1-DMVP2	48	1358	Este estudio
21	NgeneF – CeMV He2	48	6578	Este estudio
*22	DMV N1 – CeMV He2	48	6204	Este estudio
23	DMV1 – NgeneR	50	1078	Este estudio
24	F9 – DMV 5	50	2130	Este estudio

RESULTADOS

La RT-PCR de la fosfoproteína (Barrett *et al.*, 1993; Reidarson *et al.*, 1998) permitió el diagnóstico de morbillivirus dando la banda esperada de 429 pb. Después, en la caracterización molecular, se observó que de los 22 cebadores empleados, todos se unieron al control positivo DMV, mientras que solamente 11 a la muestra 20E (Tabla1). Este resultado permite sugerir que el morbillivirus detectado podría ser otra cepa diferente del DMV. En total (Tabla 2) se consiguieron cinco fragmentos de cuatro genes: dos correspondieron a la nucleoproteína, uno a la fosfoproteína, uno a la proteína de fusión y otro al de la hemaglutinina (Bellière *et al.*, enviado a publicar).

Tabla 2. Siete productos de PCR obtenidos a partir de la muestra analizada. La longitud de los fragmentos amplificados no se corresponde con la longitud esperada porque al secuenciar los productos de PCR se ha perdido longitud de fragmento y el fragmento obtenido es entonces más corto que el esperado.

Número de la RT - PCR	Posición en el genoma	Longitud de los productos de PCR (bp).	Referencia
19	898 – 1055	158	Taubenberger <i>et al.</i> (2000)
22	1270 – 1414	145	Este estudio
2	2183 – 2540	358	Barrett <i>et al.</i> (1993), Reidarson <i>et al.</i> (1998)
6	6503 – 6654	152	Este estudio
16	6630 – 7159	530	Este estudio
17	6858 – 7370	513	Este estudio
9	7214 – 7406	193	Este estudio

La construcción de árboles (Bellière *et al.*, enviado a publicar), donde se incluyeron todas las especies de morbillivirus, ubicó las secuencias dentro del linaje CeMV. En dos árboles filogenéticos correspondientes a la nucleoproteína y a la fosfoproteína, se ha observado que el aislado 20E está más cercano filogenéticamente a la cepa PWMV descrita por Taubenberger *et al.* (2000), que al resto de secuencias de CeMV. Debido a ello, y a que esta nueva muestra se haya aislado de un calderón tropical, se propone llamarla “PWMV II” (Figura 1).

En cada uno de estos árboles, se han observado dentro del linaje CeMV tres grupos nombrados en este estudio: CeMV-1 para el grupo formado por los aislados de DMV, CeMV-2 para el grupo formado por los aislados de PMV y CeMV-3 para el formado por PWMV y PWMVII” (Figura 1).

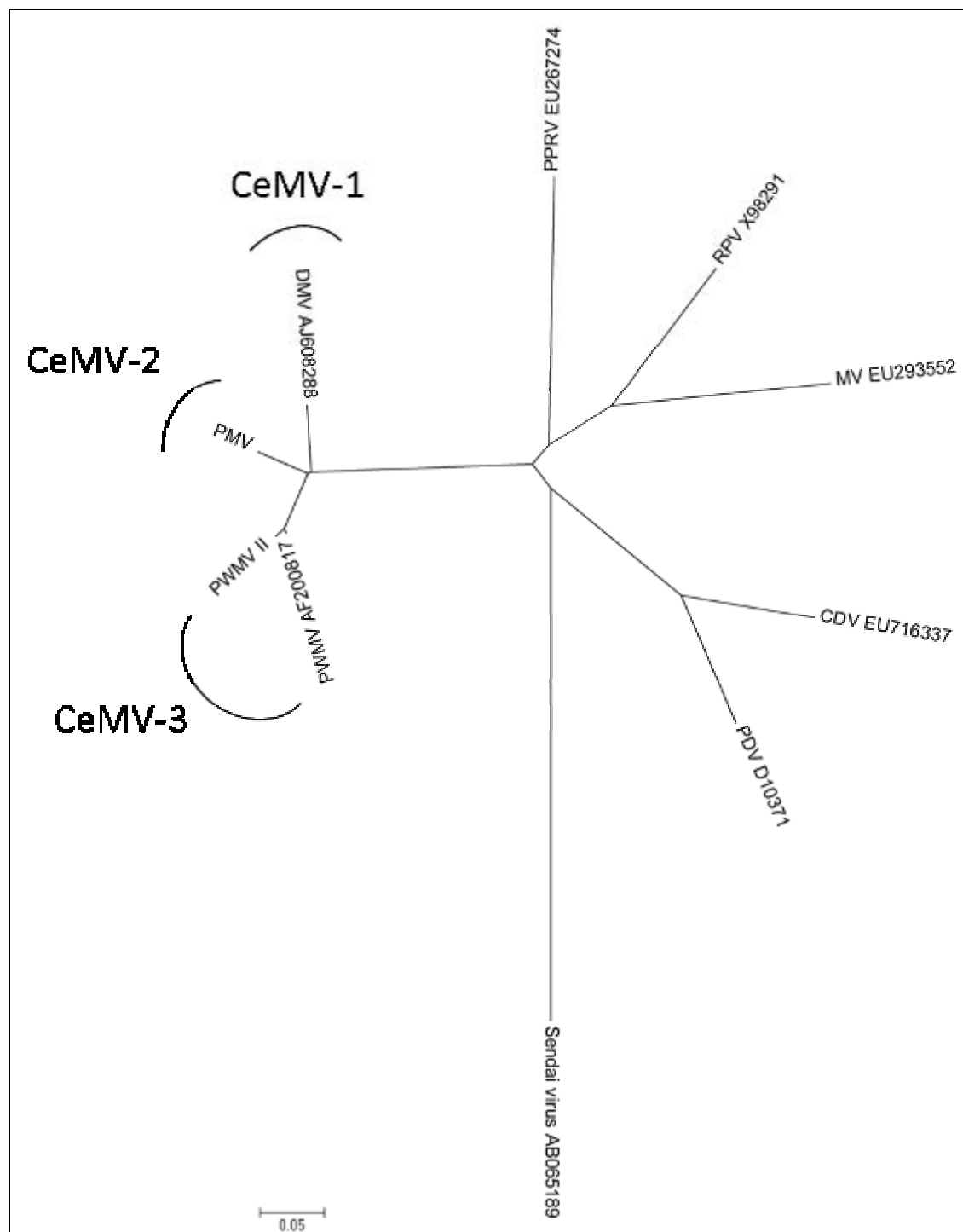


Figura 1. Árbol filogenético de la fosfoproteína en cuya construcción se han incluido todas las especies de morbillivirus. A continuación del nombre de la especie del virus se indica el número de acceso al GenBank. MV: virus del sarampión, RPV: virus de la peste bovina, PPRV: peste de los pequeños rumiantes, CDV: virus del moquillo canino, PDV: virus del moquillo de la foca, DMV: morbillivirus de delfín, PMV: morbillivirus de la marsopa, PWMV: morbillivirus del calderón.

DISCUSIÓN

La clasificación viral no debe basarse exclusivamente en el análisis molecular, sino que se debe incluir entre otros criterios la especie hospedadora, la distribución geográfica y la patogenicidad del virus (van de Bildt *et al.*, 2005). A pesar de que las lesiones producidas por la infección de los tres grupos de CeMV son similares, incluyendo encefalitis no supurativa y neumonía (Kenedy *et al.*, 1988; Domingo *et al.*, 1990; Taubenberger *et al.*, 2000), las tasas de mortalidad de los varamientos son diferentes. En la tabla 3, establecida a raíz de una revisión bibliográfica exhaustiva, se resume la importancia de cada uno de estos parámetros, basándose únicamente en los brotes cuya cepa de CeMV haya sido identificada molecularmente. La Tabla 3 podría indicar que el grupo CeMV-3 presenta un espectro de hospedador más restringido, una distribución geográfica más reducida, así como un porcentaje de mortalidad menor en comparación con los otros dos grupos. Estas tres observaciones indicarían una mayor adaptación de las cepas CeMV-3 al calderón. Sin embargo, los resultados deben ser tomados con cautela debido a la escasez y heterogeneidad de los datos disponibles.

Tabla 3. Parámetros epidemiológicos ligados a los diferentes grupos de CeMV.

	CeMV-1	CeMV-2	CeMV-3
Rango de hospedador	+++	++	+
Distribución geográfica	+++	++	+
Virulencia	+++	++	+

CONCLUSIONES

Las altas homologías entre las secuencias halladas y el PWMV podrían indicar que la nueva cepa de CeMV descrita estuviese altamente relacionada con el PWMV, y se propone llamarla “PWMV II”. Además, la realización de los árboles filogenéticos ha permitido la observación de tres grupos para el CeMV: CeMV-1 al que reúne las secuencias de DMV, CeMV-2 al que reúne las secuencias de PMV y CeMV-3 al que reúne las secuencias del PWMV.

Por último, el papel de los calderones comunes y tropicales en la epidemiología del CeMV necesita ser reevaluado, a tenor de los últimos hallazgos en estas dos especies.

AGRADECIMIENTOS

A través de estas líneas quiero agradecer a las personas que han hecho posible la realización de este trabajo, es decir mis compañeras de laboratorio: Elena Neves, Raquel Cabrera y Verónica Nogal. Además, en nombre de todo el equipo, agradecemos a nuestros compañeros

del Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria por la muestra provista objeto de este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Barrett, T, Visser, IK, Mamaev, L, Goatley, L, van Bresseem, MF, Osterhaust, AD.** 1993. Dolphin and porpoise morbilliviruses are genetically distinct from phocine distemper virus. *Virology* 193: 1010-1012.
- Domingo, M, Ferrer, L, Pumarola, M, Marco, A, Plana, J, Kennedy, S, McAliskey, M, Rima, BK.** 1990. Morbillivirus in dolphins. *Nature* 348: 21.
- Kennedy, S, Smyth, JA, Cush, PF, McCullough, SJ, Allan, GM, McQuaid, S.** 1988. Viral distemper now found in porpoises. *Nature* 336: 21.
- Mohanty, SB y Dutta, SK.** 1981. Laboratory diagnosis of viral disease. En: *Veterinary virology*. Philadelphia: Lea & Febiger; London: Baillière Tindal, pp. 87-96.
- Reidarson, TH, McBain, J, House, C, King, DP, Stott, JL, Krafft, A, Taubenberger, JK, Heyning, J, Lipscomb, TP.** 1998. Morbillivirus infection in stranded common dolphins from the Pacific Ocean. *J. Wildl. Dis.* 34: 771-776.
- 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, JK, Tsai, MM, Atkin, TJ, Fanning, TG, Krafft, AE, Moeller, RB, Kodosi, SE, Mense, MG, Lipscomb, TP.** 2000. Molecular genetic evidence of a novel morbillivirus in a long-finned pilot whale (*Globicephalus melas*). *Emerg. Infect. Dis.* 6: 42-45.
- van de Bildt, MW, Kuiken, T, Osterhaus, AD.** 2005. Cetacean morbilliviruses are phylogenetically divergent. *Arch. Virol.* 150: 577-583.
- Visser, IK, Van Bresseem, MF, de Swart, RL, van de Bildt, MW, Vos, HW, van der Heijden, RW, Saliki, JT, 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.