

Caso clínico de adenovirus en delfines en cautividad

Anastasia Pickford

Grado en Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid
anapickf@ucm.es

Tutores

Consuelo Rubio Guerri. Jose Manuel Sánchez-Vizcaíno.

Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid
consuelo@sanidadanimal.info jmvizcaino@visavet.ucm.es

Resumen: El pasado octubre del año 2013, varios delfines mulares (*Tursiops truncatus*) del Oceanogràfic de Valencia cursaron con diarrea sanguinolenta, vómitos y anorexia. En estos animales se realizó el análisis serológico frente moquillo canino, encontrando en varios animales anticuerpos. A partir de muestras de heces se pudo extraer ADN que después se amplificó utilizando una PCR consenso de polimerasa de adenovirus, para posteriormente analizar el producto amplificado mediante electroforesis en gel de agarosa, purificación del producto de PCR y secuenciación de dichos fragmentos amplificados. Gracias a la electroforesis se pudo detectar que tres de las cinco muestras eran positivas a adenovirus y por lo tanto se mandaron a secuenciar para confirmar este resultado. Los resultados de la secuenciación confirmaron que los delfines habían sido infectados por la misma cepa de adenovirus al ser idénticas las secuencias entre sí y que, además, la secuencia conseguida era muy parecida a la del adenovirus de marsopa común (*Phocoena phocoena*). Podemos concluir, por tanto, que los tres animales enfermaron debido a un mismo adenovirus de cetáceos.

Palabras clave: Adenovirus. Delfín. ADN. PCR. Secuenciación.

INTRODUCCIÓN

Los adenovirus son un grupo de virus que pertenecen a la familia de *Adenoviridae* y que son capaces de infectar tanto humanos como animales. Además son los virus no encapsulados de mayor tamaño (90-100 nm) y contienen ADN bicatenario lineal. Poseen una cápside icosaédrica formada por pentones y hexones de los cuales sobresalen espículas que son los responsables de las propiedades antigénicas del virus. Dicha familia se divide en 5 géneros: *Mastadenovirus*, aislados de mamíferos; *Aviadenovirus*, aislados de aves; *Atadenovirus*, aislados en reptiles, aves y mamíferos; *Siadenovirus*, aislados en reptiles y aves; y *Ichtadenovirus*, aislado en peces (8).

En mamíferos marinos, hay algunos informes de la presencia de adenovirus en cetáceos salvajes incluyendo un rorcual norteño (*Balaenoptera borealis*) ⁽¹⁾, dos ballenas de Groenlandia (*Balaena mysticetus*) ⁽²⁾ y una beluga (*Delphinapterus leucas*) ⁽³⁾; habiéndose aislado a partir de muestras gastrointestinales. Sin embargo, todavía no está clara la correlación entre la patogenicidad y la presencia de adenovirus en estos animales. En cambio, en pinnípedos se ha demostrado la presencia de partículas víricas de adenovirus en hígados de leones marinos californianos (*Zalophus californianus*) con hepatitis ^(4,5). Recientemente se ha descrito un brote letal de adenovirus en tres especies distintas de otariidos en un acuario japonés ⁽⁶⁾. En humanos y animales terrestres los adenovirus se caracterizan por tener un rango de hospedadores relativamente estrecho, mientras que en mamíferos marinos el rango de hospedadores, la patogenicidad, la morbilidad y la mortalidad producida por adenovirus sigue siendo una incógnita⁽⁵⁾.

En este caso clínico se describe un brote de diarrea sanguinolenta, vómitos y anorexia en un grupo de delfines mulares (*Tursiops truncatus*) del Oceanogràfic de Valencia. En el suero de estos animales se encontraron anticuerpos frente a adenovirus y este diagnóstico pudo confirmarse mediante técnicas moleculares y secuenciación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y muestras

El pasado octubre del año 2013 tres delfines mulares del Oceanogràfic de Valencia, los cuales se llamaban Venus, Nala y Neptuno, desarrollaron un cuadro clínico típicamente vírico con fiebre, diarreas sanguinolentas, vómitos y anorexia. Se tomaron muestras sanguíneas y fecales para la identificación del problema. Los sueros fueron mandados a un laboratorio de diagnóstico para que realizaran un análisis serológico inespecífico de moquillo canino mediante ELISA. En algunas de las muestras se encontraron anticuerpos frente al moquillo canino. Es por ello que las muestras fecales de los animales afectados fueron enviadas junto a muestras de animales sanos (Billy y Pfizer) a nuestro laboratorio del Centro VISAVET en la Facultad de Veterinaria de la UCM para realizar el diagnóstico molecular de las mismas.

A partir de las muestras de heces congeladas se procedió a la extracción de ADN mediante el *High Pure PCR Template Preparation Kit* de Roche siguiendo las instrucciones del fabricante. Como control negativo de extracción se utilizó agua libre de ADNasa y ARNasa; y como control positivo de extracción un macerado de hígado procedente de un león marino que tuvo hepatitis y que fue diagnosticado como positivo en el brote de adenovirus que se produjo en el Oceanografic de Valencia en el año 2010.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Tras la extracción del ADN de las muestras de heces, se procedió a amplificar el material genético obtenido mediante PCR. Se utilizó una PCR convencional que amplifica una región de aproximadamente 500 pares de bases (pb) del gen de la ADN polimerasa, obtenida a partir de la optimización de la PCR anidada consenso, desarrollada por Wellehan y col.⁽⁷⁾ y utilizada en la mayoría de las especies para la detección de adenovirus.

En esta PCR optimizada se utiliza únicamente la primera ronda de amplificación de la PCR de Wellehan, prescindiendo de la segunda. En dicha primera ronda se usan dos cebadores denominados pol -Fouter ("forward-primer" – cebador a corriente) y pol-Router (reverse-primer" - cebador a contracorriente). El primero es complementario a la hebra 5'-3' del ADN, de manera que la polimerasa añade nucleótidos al mismo en sentido "a corriente"; mientras que el segundo es complementario a la hebra 3'-5' y la polimerasa lo amplifica en sentido inverso con respecto al primero.

Para la preparación de la PCR se añadió 1,25µl de cada primer a 20µM junto a 12,5µl de Buffer Kappa (con los nucleótidos para la amplificación, el Cl₂Mg cofactor de la polimerasa y la polimerasa), y 2µl de muestra para tener un volumen final de 23 µl. También se preparó un control negativo de PCR (agua libre de ARNasa y ADN asa) y un control positivo de PCR (ADN de adenovirus de león marino).

La PCR presentaba las siguientes condiciones de temperatura: una desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos; seguido de 39 ciclos de amplificación a 95°C para 30 segundos, 46°C para 45 segundos y 72°C para 40 segundos; y por último una elongación final a 72°C durante 7 minutos.

Electroforesis y purificación de las muestras de ADN obtenidas de la PCR

Para analizar los fragmentos de ADN amplificados en la PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (120V, 400mA, 20 minutos). Durante la lectura del gel de agarosa, mediante luz ultravioleta en el lector de geles, se pudo observar los resultados de la PCR. Posteriormente, se cortaron las bandas de interés con el fin de purificar los amplicones y mandar los fragmentos a secuenciar.

A continuación, se purificaron los amplicones, tanto a partir del producto de PCR, como a partir del gel de agarosa tras cortar las bandas de interés. Para ello, se utilizó respectivamente la *PCR Purification Kit* y la *Gel Extraction Kit*, ambas de Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez purificados los amplicones, se mandaron a secuenciar a SecuGen un total de 10 µl del producto purificado junto a 1µl de los dos cebadores a 5µM por separado, empleados en la PCR (pol-Fouter y pol-Router).

RESULTADOS

Se pudo comprobar que tres de los cinco animales (Venus, Nala y Neptuno; 1V, 3N y 5N respectivamente) dieron positivo a la PCR optimizada, ya que se pudo observar las bandas de 500pb en estos tres animales (Figura 1). Sin embargo el animal 1V parecía ser un positivo mucho más débil en contraste a los otros dos animales positivos, que parecían ser positivos muy fuertes. En los otros dos animales (Billy y Pfizer; 2B y 4P) la ausencia de ninguna banda del tamaño esperado hicieron pensar que eran negativos (Figura 1). Además en la Figura 1 se puede ver la presencia del control positivo y del control negativo que confirmaron que tanto la extracción como la PCR se habían realizado correctamente.

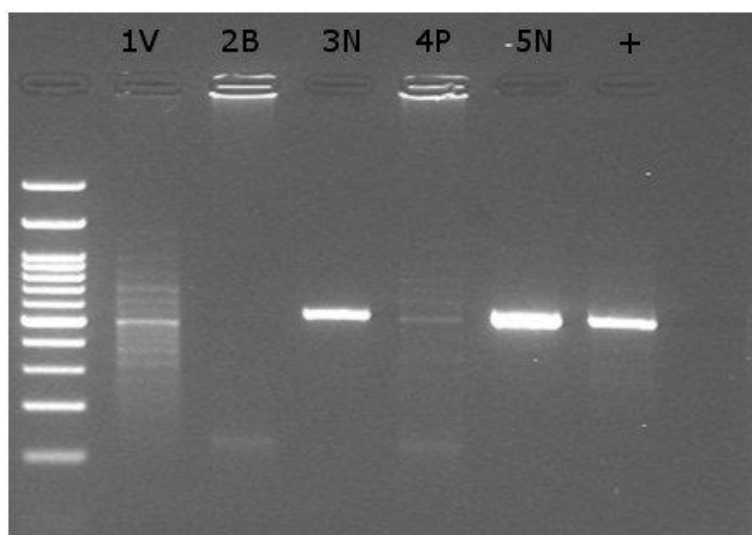


Figura 1. Foto de la electroforesis en gel de agarosa con los resultados de la PCR.

En cuanto a los resultados de secuenciación, de las 8 muestras que se habían mandado, se obtuvieron secuencias muy limpias (sin poli-N) en las muestras purificadas a partir de producto y mandadas con el cebador pol-Fouter. Sin embargo las secuencias obtenidas de las muestras purificadas a partir de gel o purificadas a partir de producto, pero enviadas con el cebador pol-Router, dieron más errores a la hora de la lectura de las mismas por la presencia de muchos nucleótidos no identificados.

Por tanto, en primer lugar, se siguió con el alineamiento múltiple de todas las secuencias limpias obtenidas (muestras 3N y 5N), utilizando el programa informático Mega 4.0, alineándolas con ClustalW. En el alineamiento se observó que todas las secuencias eran idénticas lo cual confirmaba que los animales habían sido infectados por el mismo virus.

En segundo lugar, las secuencias fueron comparadas con todas las secuencias

existentes a través de la base de datos del Genbank (con el BLASTn) con el fin de ver a qué otras secuencias se parecían y confirmar que se trataba de un adenovirus. Se comprobó que la secuencia que más se parecía a la obtenida era la correspondiente a la polimerasa de adenovirus de marsopa común (*Phocoena phocoena*) en un 73% habiendo amplificado un 94% de la proteína. Además de ser la secuencia más parecida era la única de adenovirus de cetáceos que se puede encontrar en la base de datos, ya que también se encontraban adenovirus de otras especies como la bovina o el murciélago. Este grado de similitud fue suficiente para afirmar que se trataba de un adenovirus de cetáceos.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Ante el diagnóstico molecular y posterior secuenciación de adenovirus en las heces de tres de los cinco animales que fueron enviados desde el Oceanogràfic se podría decir que estamos ante un caso clínico de adenovirus en cetáceos.

Además, al obtener la misma secuencia en todos los animales del brote también sugiere que los casos podrían haber estado causados por el mismo virus.

Podemos concluir, por tanto, que los tres animales enfermaron debido a un adenovirus de cetáceos, tratándose pues de un caso poco común. En un futuro, para confirmar nuestra hipótesis será necesario amplificar otras proteínas del mismo virus, por ejemplo la correspondiente al hexón; y después desarrollar un árbol filogenético del mismo para ver a qué género corresponde.

Los adenovirus podrían ser agentes etiológicos importantes de enfermedad en cetáceos, tanto en libertad como en cautividad. Dado el desconocimiento de sus mecanismos de patogenicidad se requiere seguir estudiando los casos de infección por adenovirus en cetáceos mediante análisis clínicos, serológicos y genéticos para poder remediar dicha incompreensión.

BIBLIOGRAFÍA

1. Smith AW, Skilling DE. Viruses and virus diseases of marine mammals. J Am Vet Med Assoc. 1979 Nov 1;175(9):918-20.
2. Smith AW, Skilling DE, Benirschke K, Albert TF, Barlough JE. Serology and virology of the bowhead whale (*Balaena mysticetus* L.). J Wildl Dis. 1987 Jan; 23(1):92-8.
3. 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 Apr;112(3):257-71.

4. Goldstein T, Colegrove KM, Hanson M, Gulland FM. Isolation of a novel adenovirus from California sea lions *Zalophus californianus*. Dis Aquat Organ. 2011 May 9;94(3):243-8.
5. Dierauf LA, Gulland FMD. CRC Handbook of Marine Mammal Medicine. 2ª ed. EEUU: CRC Press; 2001.
6. Inoshima Y, Murakami T, Ishiguro N, Hasegawa K, Kasamatsu M. An outbreak of lethal adenovirus infection among different otariid species. Veterinary Microbiology [en línea]. 2013. 165.
7. Wellehan JFX, Johnson AJ, Harrach B, Benkö M, Pessier AP, Johnson CM, Garner MM, Childress A, Jacobson ER. Detection and analysis of six lizard adenoviruses by consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the Atadenoviruses. Journal of Virology [en línea]. 2004. 78.

RECURSOS ELECTRÓNICOS

Viral Zone. Fecha de consulta: 23 febrero 2014. Disponible en:
<http://viralzone.expasy.org>

Recibido: 17 marzo 2014.

Aceptado: 26 abril 2014.