



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



CARACTERIZACIÓN DE LA CARGA
MICROBIANA Y PARASITARIA DE TRES
ESPECIES DE MISTICETOS EN LAS COSTAS
DE LA PENÍNSULA DE BAJA CALIFORNIA,
MÉXICO.

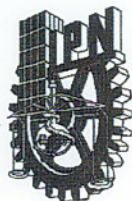
TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN
MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA

AGNES ROCHA GOSSELIN

LA PAZ, B.C.S., 29 DE ABRIL DE 2009



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 17 del mes de Marzo del 2009 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis de grado titulada:

"CARACTERIZACIÓN DE LA CARGA MICROBIANA Y PARASITARIA DE TRES ESPECIES DE MISTICETOS EN LAS COSTAS DE LA PENÍNSULA DE BAJA CALIFORNIA, MÉXICO"

Presentada por el alumno:

ROCHA
Apellido paterno

GOSSELIN
materno

AGNES
nombre(s)

Con registro:

A	0	7	0	3	3	7
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Director de tesis
PRIMER VOCAL

DRA. KARINA ACEVEDO WHITEHOUSE

PRESIDENTE

DR. NORMAN SILVERBERG

SECRETARIO

MC. GUSTAVO DE LA CRUZ AGÜERO

SEGUNDO VOCAL

DRA. DIANE GENDRON LANIER
2°. DIRECTOR

TERCER VOCAL

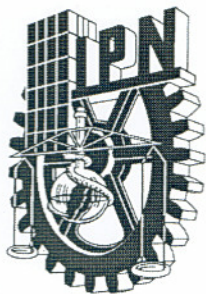
DRA. BÁRBARA GONZÁLEZ ACOSTA

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE



IPN
CICIMAR
DIRECCION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 15 del mes Abril del año 2009, el (la) que suscribe MVZ. AGNES ROCHA GOSSELIN alumno(a) del

Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

con número de registro A070337 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DRA. KARINA ACEVEDO WHITEHOUSE y DRA. DIANE GENDRON LANIEL y cede los derechos del trabajo titulado:

“CARACTERIZACIÓN DE LA CARGA MICROBIANA Y PARASITARIA DE TRES ESPECIES DE

MISTICETOS EN LAS COSTAS DE LA PENÍNSULA DE BAJA CALIFORNIA, MÉXICO”

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: agnrocha@gmail.com Karina.Acevedo.Whitehouse@ioz.ac.uk dgendron@ipn.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

MVZ. AGNES ROCHA GOSSELIN

nombre y firma

Dedicado a mi familia,

terrestre y marina:

FAMILIA ROCHA-GOSSELIN:

A mis dos raíces: Carlos y Thérèse.

A mis hermanos: Rodrigo y Carlos.

Por ser el pilar.

Con todo amor...

AL MAR

A tus interminables olas, a tus sueños azules y a tus misterios.

Por mantener la inspiración ...

AGRADECIMIENTOS

Sin el apoyo y ayuda de todas estas personas e instituciones en La Paz y en Londres, este trabajo no hubiera sido posible, o por lo menos, no hubiera sido igual, tanto por la parte económica, logística e intelectual, como por la parte emocional y humana...

¡Muchas gracias a todos!

A las instituciones, fondos y becas nacionales y extranjeras, que apoyaron este proyecto e hicieron posibles mis estancias de investigación en Londres, así como la presentación de este trabajo en varios congresos.

Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas y al Instituto Politécnico Nacional,

Instituto de Zoología de Londres – ZSL,

CONACYT,

PIFI,

COFAA,

Universidad de Cambridge - SCCS,

Cetacean Society International - William Rossiter.

Principalmente a mis dos directoras por todo su trabajo y esfuerzo para la revisión y correcciones a esta tesis, así como a los miembros del comité revisor:

Karina Acevedo-Whitehouse, directora de este proyecto, muchas gracias por tu genial idea, por haberme aceptado, dirigido (aún con el obstáculo de la distancia...) y apoyado en esta fabulosa Montaña-Rusa de aprendizaje. Por ser parte fundamental en mi formación de investigadora y por toda la ciencia aprendida en el universo del MMMEL, siempre salpicada de música, política e ingeniosos inventos (como *el Vórtex!*). Y claro, por enseñarme el invisible y *-aunque usted no lo crea-* emocionante mundo de los ácidos nucleicos.

Diane Gendron, mi otra directora, la *dame des baleines bleues*... Muchísimas gracias por permitirme trabajar y enseñarme a desenvolverme en este competitivo medio de la investigación de cetáceos! Por la invaluable enseñanza acerca de las “gigantas” azules y sobre la investigación en el mar! Por aconsejarme, guiarme y apoyarme en este proyecto desde el inicio.

Bárbara González Acosta, por tu valiosa asesoría, apoyo y aprendizaje en el laboratorio de Microbiología (Hay que inaugurar el área molecular!)... Por enseñarme a cultivar los soplos de las ballenitas y contagiarme esa pasión por las bacterias! Gracias por tu buen humor, por escucharme y tenerme esa paciencia “maternal”!

Norman Silverberg, por tus preguntas que ponen a pensar en lo que uno no había pensado... Por todo tu apoyo cuando Diane no estuvo y por ofrecerme tu equipo fotográfico para los parásitos.

Gustavo de la Cruz Agüero, gracias por entrar al último momento, por resolver mis dudas con una sonrisa y por tus atinados comentarios (queda pendiente lo del depósito!).

Jaime Gómez Gutiérrez (aunque ya no estés “legalmente” dentro del comité.), por todo tu apoyo, asesoría y retroalimentación sobre el espeluznante mundo de los parásitos de eufásidos (aún desde Australia)!

A todos mis compañeros del Laboratorio de Ecología de Cetáceos, colegas y amigos, que han sabido compartir el espacio en el *lab* y en las lanchas, por saber ser un verdadero equipo de investigadores marinos con “tendedero flotante”, por compartir experiencias increíbles junto a las *azules*, y sobre todo por apoyar y criticar atinadamente mis presentaciones y trabajo... A **Azu**, por aconsejarme y resolver muchas dudas acerca de la tesis... A **Cristina**, por ser la única en compartir y valorar la “caca de ballena” de una manera tan alegre! A **Jos**: por tu amistad, y por cuidar a mis hijos cuando no estuve!! A todos les agradezco su apoyo y amistad durante la maestría: Nat, Fabi, Marisol, Aurora, Mario, Geraldine, Ernesto y a todas (mayoría de mujeres...) las que han circulado por este laboratorio: Genevieve, Tiffany, Mali, Paula y claro a *Lau* (vienes en otra sección porque estás en todos lados!).

A Christian, babisuri #1, porque tú fuiste la conexión intergaláctica que me hizo llegar a este laboratorio y enterarme del proyecto, gracias! No olvidaremos jamás al fantasma que arrastraba sus cadenas y golpeaba la CICIMAR XV, impidiéndonos dormir durante tres noches de viento...

A Raulito, *of course...* *Rosita-fresita*: por las salidas al mar compartidas, por tus atinados comentarios, críticas y apoyo incondicional... Pero sobre todo por tu amistad, las muchas fiestas, cenas, disfraces y brindis compartidos (alcohol???)... Por cuidarme cuando fue necesario (A mí??!) y aguantar mis tropezones... Por ayudarme con el mapa! Y aunque *jamás* agradeceré tu desmesurada “guarréz” en una tesis de maestría, reconozco que nos haces reír mucho!! Y sin risa, la vida no sabe igual!

A nuestros queridos capitanes, quienes nos han sabido cuidar y procurar en el mar, de quienes aprendemos constantemente todo aquello que va más allá de la ciencia y porque sin ellos las aventuras marinas a bordo de la CICIMAR XV no serían tan amenas. Al **Capi Javier**: cómo olvidar esos ronquidos de oso y tu paternal forma de cuidarnos!! A **Ciro**, el capitán *místico*: por tus poemas balleneros, por tu *sashimi* y sopa de caracol!!

A los investigadores y técnicos del CICIMAR quienes me ayudaron mucho con los trámites, prestándome material e instalaciones: A Silverio y a Sonia por su amable apoyo en el Laboratorio de Química Orgánica y por aguantar los malos olores de los análisis de heces! A la Dra. Aída, por permitirme trabajar con el microscopio en el Laboratorio de Fitoplancton y por todas sus sugerencias! A los miembros del Seminario Departamental de Pesquerías por las críticas y comentarios en cada seminario! A Humberto, por su ayuda y paciencia cuando irrumpía en su oficina cada 5 minutos!

A todos los amigos y voluntarios que me ayudaron y participaron en las salidas de muestreo de ballena gris: Mauricio, Felipe, María-José (Gracias Titi!), Fabiola, Raulito, Joselyn, Emma, Genevieve, entre otros... Gracias por su colaboración!

Al **Puerto A. López Mateos** y a todos los que me ayudaron en los muestreos, por sus descuentos en las rentas de las lanchas, a los pangueros y amigos que colaboraron amablemente con este proyecto! A Víctor de La Toba y familia (por su hospitalidad y amistad de siempre), así como a Mario y a todos los amigos de *Aquendi* !!

A **Agustín**, el único y sabio piloto de *Nanuk*, el helicóptero-estrella de este proyecto... Gracias por ayudarnos con la toma aérea de soplos y la comprobación de este método de muestreo!

A mi familia de La Paz:

A mis tres HERMANAS *DORIS*...

Comixxx (alias **Deny-Doris**): por ser mi hermanita mayor, por apoyarme en todo y por tu gran cariño!! Muchas gracias por cuidar a mis coyotes (y ser su madrina) cuando no estuve en casa!! Por invitarme en tus salidas de tiburón ballena, que siempre me relajan! Por tus consejos y las pláticas de 28,000 hrs con chela en mano (Nosotraaas?? La guayaba y la tostada??!), risas y lágrimas, tu síndrome *Dinai* que tanto me hace reír, las movidas de greña, tortícolis y acrobacias fiesteras mejores que *Matrix* !! Nadie nos quitará lo brincado y bailado, comadritaaaaa!!!

Chiki-Doris (Lau !!!): por ser mi hermanita ballenera (ahora sí...): gracias por tu apoyo en los momentos duros y ayudarme con los PCR de *mocos* de ballena! Por saber ser *un petit cochon* siempre y ser la abuelita 2 de la camada de coyotitos cuando yo no estuve ... Por tu alegría constante, tu “baile del pato” y las miles de fiestas, chelas (otra borrachita más??), risas, nexos y anexos compartidos entre Londres y La Paz!!! Esto es destino, loca!! (*Es sexual? No! Es geeeeennnnial!!!*)

Doris-Mayor, Clarukaaaa, porque sabes compartir con mucha alegría las locuras, fiestas, cenas, bailes, botellas de vino y chelas (¿También?!), pláticas, lágrimas y filosofeadas! Porque nunca dices que *no* y por esos bailes siempre tan chidos y *sexys* !!

Nadaremos...Nadaremos...En el mar...En el mar....!

Emma... Por ser el único *Vampirito* de alas saladas (*por el agua de mar, no por el sudor!!*...)...Por ser muchas cosas: mi entrañable amigo, compañero de lucha planetaria, de discusiones y *filosofeadas* nocturnas con chela en mano (otro que no suelta la chela...?!?)... por tener ese *in-genio* con mis boletos de avión para Londres y con el chidísimo diseño artístico!!! Pero sobre todo por tu gran amor y apoyo, por esa *omelette* de ternura y locura, por el caminito compartido juntos y esa fabulosa complicidad que nos une... ... ¡Te amo!! ...Sigue aleteando sobre *nuestro* mar!!

Confitón (Inge. Felipe, pá' los que no sepan), querido y bien ponderado *Confi*, por todas tus confiterías y tener una enoorme sonrisa en el rostro, por todas las cotorreadas, platicadas, filosofeadas, bailadas y fiesteadas juntos (Otro más??!!...), así como tus abrazos de rompe-huesos que siempre reviven...o *re-matan* !!! Gracias por todo tu apoyo, cariño y buena vibra en todo momento, querido *Sha-mán* de pelos necios...Qué comes que adivinas???

Mau! Super *sharky* ! Por hacerme reír tanto y por tener esa *chispa* inigualable...Por tomar esas fotos bonitas durante el muestreo de ballena gris!! Por mantener viva esa competencia ilusoria *ballena vs. -tiburón* que bien sabes que NUNCA ganarás...Por el tamaño (...*sharky ser chiquitou...ballena ser grandoutaa...*) y porque se te olvida que las orcas matan tiburones...! Pero... Sigue tirando mordidas, *sharky* !

ConCIENCIA MÉXICO, A.C. Un gran logro que comparto con nuestra *niña de 7 años*, esperando sea de utilidad para seguir luchando juntos por el planeta, por sus playas y mares y por una generación de Conciencia en México! (Porque somos pioneros) Gracias por ese gran espíritu!!

Ale, Gracias por ser más que una compañera de maestría, por todo tu apoyo, asesoría, buena vibra y fiestas compartidas!! Mil gracias por los cafecitos los sábados en Cicimar y por ofrecerme tu casa pa' la fiesta!! Por tu energía y *depredadora* manera de ser!!

A mis entrañables amigos *chilaquiles*:

Itzel, mi hermana cósmica de toda la vida...Aunque no estés en La Paz, estás siempre cerca y eres mi conexión chilaquil!! Gracias por seguir bailando como un *hada-divertida* en este mundo, por tus dotes de psicóloga que siempre me ayudan o me vuelven más loca...Porque a pesar de que pasan los años, entre nosotras pasan solo unos días...

Betrusko, por tu amistad, locuras y conexión intergaláctica!! Después de tantos años, la buena vibra, el cariño y el *shamanismo* nos conectan a través de la distancia!! Gracias por permitirlo y mantenerlo!!

A familia peruana - londinense:

U, porque sin ti la vida en Londres no hubiera sido igual! Por abrirme tu hogar, ser una maestra sin darte cuenta y por tu enorme apoyo en los momentos difíciles...Por esos vinitos y quesitos eternos, por las fiestas, paseadas, *museadas, patchangeadas* y brindadas de calidad (Sí!...otra borracha más....!!!)... Por ser mi única amiga artista que tuvo tantos lazos con los *mocos* de las ballenas!! Por prestarme tu pared para escribir el mapa de mi tesis, dejarme invadir tu cuarto y por supuesto: por aguantar mis ronquidos de *Orca*...Eres parte esencial de esto!!

A los *Chakaneros*, a la fabulosa *Latin-House*, nunca sabré como agradecerles tanta hospitalidad durante mis estancias de investigación y tantos ratos compartidos en medio de cerveza, vino y queso!! Fueron el desestrés total para mí cada noche!! Gracias chicos, son lo máaaaximo: Ursu (de nuevo túU), Lú (porque *sos* bella), Tana (la princesita), Pepito (por tus *máscaras* y sonrisas), Primis-Nakis (tu arroz y tu baile son lo mejor, *Panchito*), Janito (porque *sos besho*)! Y a todos los latinos y peruanos con los que compartí las paseadas por Inglaterra!! Que viva la Pachamama!!!

A mi familia de sangre y alma,

Porque si hubiera tenido que elegir, los elijo de nuevo a ustedes: ¡Los amo!

Má, por ser *el alma más bella del ejido* y la mujer con más buena vibra y sabiduría de este mundo!! Siempre supiste decirme las palabras más sencillas y llenas de aliento!! Por tu buen humor constante, tu jovialidad, tu enorme apoyo en todas mis aventuras y locuras, por entenderme siempre (creo que la locura se hereda...), por inculcarme la conciencia ecológica y nunca dudar de mí!! Qué haría sin ti, ma *sheriff normande*? Gracias Má!!

Papiringo, por ser el *gran hombre fuerte del circo*, hacerme reír tanto, darme tu gran amor y fortaleza en todo momento, porque siempre estás ahí y no imagino la vida sin tus bromas, tus abrazos y tu fuerza! Por entrenarme en esto de la “*carrilla*” humana! Por llamarme a las 7 de la mañana en domingo y despertarme con bromas y regaños telefónicos (Grrrrr)!! Claro, por ser el *padre mío que estás en la tierra*, de verdad!! Gracias Pá!!

Ro, mi hermanito mayor, mi maestro y consejero en tantos momentos cruciales de mi vida, por llenarme de cariño y amor siempre que lo necesito, por ser un genio-soñador como pocos!!! Te admiro y tienes que reproducirte más, hermano (¿?!) Gracias por todo lo que me has dado desde que llegué a esta tierra de desierto y mar!!! Y porque ahora tienes una bella extensión de tu alma y sabiduría que se llama Eyleen....

Carlangas, el más pequeño grandulón de la familia, por todo ese amor que no te cabe en el pecho, por tu nobleza y simpleza!! Porque la *carrilla* contigo siempre ha sido la *mejor* de todas y estamos simplemente conectados para decir babosadas!! Porque también eres un luchador en vida, mi querido *ingeniebrío* !! Te extraño mucho y sabes que te llevo en mi corazón, hermano!

A mi, por nunca bajar los guantes y mantenerme a flote en esta emocionante lucha de aprendizaje humano y de crecimiento.

Y a las bellas ballenas...

Por bañarme con sus soplos y permitirme conocerlas un poco a través de ellos,

Por seguir siendo un misterio azul y navegar en las profundidades del mundo...

TABLA DE CONTENIDO

GLOSARIO.....	i
RESUMEN.....	ii
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE TABLAS	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. IMPACTO DE LOS PATÓGENOS SOBRE LAS POBLACIONES NATURALES	1
I.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS AGENTES INFECCIOSOS.....	1
I.1.2. ENFERMEDADES EMERGENTES EN LAS POBLACIONES NATURALES	4
I.2. INTERACCIÓN DE LOS PATÓGENOS CON FACTORES INTRÍNSECOS Y EXTRÍNSECOS A LOS HOSPEDADORES.....	6
I.3. CO-EVOLUCIÓN PATÓGENO-HOSPEDADOR Y GENERACIÓN DE DIVERSIDAD GENÉTICA	8
II. ANTECEDENTES	10
II.1. FACTORES DE IMPACTO Y ENFERMEDADES INFECCIOSAS EN EL MEDIO MARINO	10
II.2. ALGUNAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS EN LOS MAMÍFEROS MARINOS.....	12
II.2.1. ENFERMEDADES EMERGENTES EN CETÁCEOS	13
II.2.2. BACTERIAS DEL TRACTO RESPIRATORIO	14
II.2.3. HONGOS DEL TRACTO RESPIRATORIO	15
II.2.4. HELMINTOS GASTROINTESTINALES	16
II.3. HÁBITOS DE AGREGACIÓN Y DE ALIMENTACIÓN DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS	17
III. JUSTIFICACIÓN.....	19

IV. OBJETIVOS.....	20
IV.1. OBJETIVOS PARTICULARES	22
V. METODOLOGÍA.....	21
V. 1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS	21
V.1.1. ÁREA DE ESTUDIO	21
V.1.2. RECOLECCIÓN DE SOPLOS.....	22
V.1.3. RECOLECCIÓN DE HECES	28
V.2. ANÁLISIS MOLECULARES	29
V.2.1. EXTRACCIÓN DE ADN.....	30
V.2.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	33
V.2.3. EXTRACCIÓN DE ADN DE LAS MUESTRAS DE SOPLO MEDIANTE EL MÉTODO DE COLUMNAS DNEASY	35
V.2.4. SELECCIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS	35
V.2.5. PROGRAMA BLAST	39
V.2.6. PCR DE LAS MUESTRAS DE SOPLO.....	39
V.2.7. CLONACIÓN.....	43
V.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.....	47
V.4. EXÁMENES COPROPARASITOSCÓPICOS.....	48
V.4.1. EXÁMEN MACROSCÓPICO.....	48
V.4.2. EXÁMEN MICROSCÓPICO	48
V.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	53
VI. RESULTADOS	55
VI. 1. EVALUACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE MUESTREO DE SOPLOS.....	55
VI. 2. ANÁLISIS MOLECULARES	56
VI.2.1. PCRS CON OLIGONUCLEÓTIDOS UNIVERSALES PARA EUBACTERIAS	56
VI.2.2. PCRS MÚLTIPLES	58
VI.2.2.1. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS PRELIMINARES.....	61

VI.2.3. PCRS INDIVIDUALES DE BACTERIAS RESPIRATORIAS Y DE HONGOS.....	64
VI.2.4. ANÁLISIS DE SECUENCIA DE UN PRODUCTO CLONADO DE LA PCR DE HONGOS.....	71
VI. 3. CULTIVOS MICROBIOLÓGICOS.....	73
VI.3.1. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS CEPAS.....	73
VI.3.2. ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS BIOMASAS CULTIVADAS	74
VI.4. ANÁLISIS COPROPARASITOSCÓPICOS	75
VI.4.1. ANÁLISIS MACROSCÓPICO	75
VI.4.2. ANÁLISIS MICROSCÓPICO.....	77
VII. DISCUSIÓN	85
VII.1. TÉCNICAS DE MUESTREO NO-INVASIVAS PARA LA DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS Y PARÁSITOS DE CETÁCEOS.....	85
VII.2. CARGA MICROBIANA EN SOPLOS, POTENCIAL PATÓGENO Y ZONÓTICO.....	86
VII.3. CARGA PARASITARIA EN HECES, POTENCIAL PATÓGENO Y ZONÓTICO.....	92
VII. 4. IMPLICACIONES Y TRABAJO A FUTURO.....	97
VIII. CONCLUSIONES	100
BIBLIOGRAFÍA.....	102

GLOSARIO

Enfermedad emergente: Enfermedad de reciente aparición o que presenta un incremento en su incidencia o en la expansión geográfica de la infección. Puede ser provocada por patógenos "nuevos", pero generalmente son patógenos que vuelven a aparecer (resurgentes). Con mucha frecuencia, estas enfermedades son zoonóticas.

Enzootia: Enfermedad o infección presente de manera constante en los animales de un área geográfica determinada.

Epizootia: Brote de una enfermedad infecciosa que afecta a un gran número de animales de manera simultánea. Las epizootias generalmente se diseminan rápidamente en las poblaciones animales y provocan altas mortalidades.

Digestión enzimática: Proceso o técnica usada en biología molecular que se sirve de enzimas para catalizar reacciones específicas de las moléculas de ADN. Por ejemplo, el uso de la enzima Polimerasa en la PCR para la desnaturalización in vitro del ADN, o el uso de enzimas de restricción para separar fragmentos genéticos.

Gen ribosomal: Un gen es una secuencia o segmento de ADN necesario para la síntesis de ARN funcional, como el ARN de transferencia o el ARN ribosomal. Por lo tanto, un gen ribosomal es todo segmento de ADN que codifica para la síntesis de ARN ribosomal (i.e. genes 16S y 23S ARNr, entre otros).

Hospedador (Sinónimos: huésped, hospedero): ser vivo que aloja o provee subsistencia a algún parásito (virus, bacterias, hongos y parásitos protozoarios y metazoarios).

Hospedador definitivo (Sinónimo: hospedador final): hospedador dentro del cual el parásito lleva a cabo su reproducción sexual.

Hospedador intermediario: Hospedador dentro del cual ocurren generalmente las fases asexuales o inmaduras del parásito (i.e., las larvarias, en el caso de los helmintos o artrópodos).

Incidencia: Número de casos nuevos de cierta infección con respecto al número total de individuos de la población, durante un periodo de tiempo determinado.

Infección: Presencia de micro y macroparásitos en un hospedador.

Inmunidad: Conjunto de procesos naturales que combaten la infección mediante la destrucción del parásito, contención de sus efectos o limitando su replicación.

Inmunosupresión: Reducción o supresión de la inmunidad.

Patogenia: Origen y desarrollo de una enfermedad; incluye el conjunto de mecanismos de generación del daño o de la enfermedad.

Patógeno: Microorganismo o parásito con la capacidad de producir daño en el hospedador, es decir de provocar una enfermedad.

Patógeno oportunista: Parásito que normalmente habita en un organismo sin causar enfermedad. Cambios en la ecología del hospedero o del parásito pueden permitir que colonice y provoque enfermedad. Muchas veces forman parte de la flora comensal del organismo (i.e. cavidad oral, tracto digestivo).

Parásito: Organismo que depende de su hospedador para obtener metabolitos esenciales y con el cual existe una relación recíproca. La definición estricta incluye tanto a metazoarios como a protozoarios y microorganismos que infectan los tejidos del hospedador (i.e.: virus, bacterias y hongos). Sin embargo, en esta tesis se hablará de parásitos o carga parasitaria para el caso de los macroparásitos (o metazoarios) y de microorganismos para aquellos microscópicos (o microparásitos), como las bacterias y los hongos.

Plásmido: Molécula de ADN extracromosómico de las bacterias que presenta capacidad de autorreplicación. En ingeniería genética son llamados vectores y se usan por su capacidad de autoreplicarse independientemente del ADN cromosomal y porque es relativamente fácil insertar nuevas secuencias genéticas en ellos.

Prevalencia: Número de individuos infectados con respecto a la población total.

Reservorio (hospedador): Animal infectado que sirve como fuente de infección para otros animales, sin manifestar la enfermedad.

Virulencia: capacidad de un patógeno de producir daño.

Zoonosis: Enfermedad infecciosa trasmisible de forma natural entre animales y humanos. En el sentido amplio, la definición incluye a cualquier especie animal, pero la mayoría de los estudios involucran únicamente a patógenos zoonóticos de vertebrados.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Número de muestras de soplo y muestras ambientales por especie y por técnica (panel extensible y helicóptero.....	28
Tabla 2.	Número de muestras de heces recolectadas en el Golfo de California entre 2006 y 2008.....	29
Tabla 3.	Pares de oligonucleótidos universales de hongos. Se muestran las secuencias de cada uno y el producto esperado.....	36
Tabla 4.	Pares de oligonucleótidos para detectar microorganismos respiratorios en el soplo de cetáceos.....	38
Tabla 5.	Combinaciones de oligonucleótidos y temperaturas de alineación (Tm) utilizados para las reacciones de amplificación múltiple.....	41
Tabla 6.	Ventajas y desventajas de las dos técnicas de muestreo de soplos de cetáceos.....	56
Tabla 7.	Productos esperados y productos inespecíficos amplificados para cada reacción múltiple.....	60
Tabla 8.	Resultados del análisis con BLASTn para verificar los productos que podrían ser amplificados por los juegos de oligonucleótidos de cada PCR múltiple.....	62
Tabla 9.	Muestras de soplo y ambientales con bacterias respiratorias y bacterias no identificadas. Se muestra el número de muestras y la frecuencia entre paréntesis.....	67
Tabla 10.	Muestras de soplo y ambientales con hongos no identificados.....	69
Tabla 11.	Proporción de muestras de heces positivas en relación a las muestras analizadas con la técnica de Ritchie convencional y estandarizada.....	78

LISTA DE FIGURAS

Fig.1	Área de estudio. Golfo de California: Bahía de Loreto - La Paz. Pacífico Norte: Puerto A. López Mateos, Bahía Magdalena.....	21
Fig.2	Panel de acrílico sujeto a un tubo extensible de aluminio, implementado para coleccionar muestras de soplo de cetáceos.....	24
Fig.3	Helicóptero a escala de control remoto marca Raptor 30 V2 Thunder Tiger, con hisopos estériles sujetos a los flotadores.....	25
Fig.4	Técnica aérea de colección de muestras de soplo mediante helicóptero a control remoto.....	26
Fig.5	Caja hermética para cultivos microbiológicos anaerobios.....	28
Fig.6	Gel de agarosa al 1 % en el cual se observan únicamente fragmentos amplificados en el ADN extraído mediante el método de DNeasy.....	34
Fig.7	Fotografía que muestra el último paso de la técnica de Ritchie, previo al decantado. Se observa la separación de los 3 estratos.....	51
Fig.8	Fotografía de la filtración de muestras de heces con tamiz de nylon de 100 micras (Modificación a la técnica de Ritchie).....	53
Fig.9	Prevalencia de ADN eubacteriano en las muestras de soplo de ambas especies y muestras ambientales detectado por medio de PCR.....	57
Fig.10	Prevalencia de ADN eubacteriano en las muestras de soplo de ballenas grises y ballenas azules detectado por medio de de PCR.....	57
Fig.11	Prevalencia de microorganismos respiratorios detectados en soplos de ballena gris y ballena azul por medio de PCR múltiples (Resultados preliminares).....	58
Fig.12	Fotografía de un gel de agarosa donde se observan los fragmentos amplificados mediante PCR múltiple " <i>Whale Path 3</i> ".....	60
Fig.13	Fotografía de uno de los geles de agarosa en donde se observan algunas de las bandas fluorescentes de aproximadamente 253 pb. con productos esperados para <i>Streptococcus</i> β -hemolíticos en algunas muestras de soplo de ballena gris y ballena azul.....	65
Fig.14	Prevalencia de muestras con <i>Streptococcus</i> β -hemolíticos en ballena gris y ballena azul.....	65

Fig.15	Fotografía del gel de agarosa donde se observan las cinco bandas fluorescentes de aproximadamente 270 pb. de productos amplificados de <i>Streptococcus intermedius</i> en soplos de ballena gris.....	66
Fig.16	Prevalencia de muestras con <i>Streptococcus intermedius</i> en ballena gris y ballena azul.....	66
Fig.17	Prevalencia de muestras de soplo de ballena gris, ballena azul y muestras ambientales con presencia de una o más bacterias respiratorias.....	68
Fig.18	Prevalencia de hongos en las muestras de soplo de ambas especies y las muestras ambientales.....	69
Fig.19	Prevalencia de hongos en las muestras de ballena gris, ballena azul y muestras ambientales.....	70
Fig.20	Fotografía de un gel de agarosa donde se observan productos de hongos de cuatro tamaños distintos usando los oligonucleótidos 28S en muestras de ballenas grises y ballenas azules.....	71
Fig.21	Secuencia S08BM-HoH y secuencia de <i>Cryptococcus neoformans</i> , gen 25S (291 pb).....	72
Fig.22	Secuencia S08BM-HoC y secuencia de <i>Fusarium</i> spp., gen 28S (255 pb).....	72
Fig.23	Secuencia S08BM-HoD y secuencia de un hongo no cultivado.....	73
Fig.24	Fotografías de las colonias bacterianas aisladas a partir de muestras de soplo y teñidas con la técnica de Gram :A) Colonias de <i>Streptococcus</i> spp.; B) Colonias de <i>Staphylococcus</i> spp.....	74
Fig.25	Prevalencia de acantocéfalos detectados en las heces de ballena azul y ballena de aleta.....	75
Fig.26	Fotografías de los acantocéfalos encontrados en heces de ballena azul y ballena de aleta.....	76
Fig.28	Fotografías de los tipos de huevo de helmintos encontrados en heces de ballena azul y ballena de aleta con la técnica de Ritchie estandarizada: tipos A (Anisakidae), B (Diphyllobothriidae), C y D (no identificados).....	80
Fig.27	Prevalencia de huevos de helmintos en las muestras de heces de ballena azul y ballena de aleta analizadas con la técnica de Ritchie modificada para ballenas.....	77

Fig.29	Prevalencia de cada uno de los tipos de huevos de helmintos en las muestras de heces de ballena azul y ballena de aleta.....	81
Fig.30	Prevalencia total de helmintos en muestras de heces de ballena azul y ballena de aleta.....	82
Fig.31	Porcentaje de ballenas azules y de aleta con un solo tipo de helminto (huevo o adulto) e individuos multiparasitados, es decir con más de un solo tipo de parásito, detectados a partir de muestras de heces.....	83
Fig.32	Prevalencia de las tres familias e helmintos en ballena azul y ballena de aleta, identificadas morfológicamente a partir de muestras de heces.....	84

RESUMEN

Se investigaron las cargas patógenas respiratoria y digestiva de la ballena gris, la ballena azul y la ballena de aleta en Bahía Magdalena y el Golfo de California, con el fin de comparar su diversidad y determinar su potencial zoonótico. A la fecha, se conoce poco sobre patógenos de cetáceos en vida libre, por lo que es difícil inferir epizootias y determinar riesgos sanitarios. Para el presente estudio se implementaron dos técnicas de recolección de soplos, una mediante un panel extensible y la otra utilizando un helicóptero de control remoto, con las cuales se colectaron 43 muestras de soplos de ballena gris, 21 de ballena azul y 36 muestras ambientales. Las muestras se analizaron por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar microorganismos. Para los exámenes de parásitos digestivos, se recolectaron 30 muestras de heces (23 de ballena azul y siete de ballena de aleta) que se examinaron mediante una técnica de Ritchie estandarizada. Se encontró ADN bacteriano en 40 muestras de soplo, de las cuales 26 y 33 % amplificaron a *Streptococcus* β -hemolíticos en ballena gris y ballena azul, respectivamente. Doce por ciento de las muestras de ballena gris fueron positivas a *Streptococcus intermedius*. Treinta y nueve por ciento de las muestras de ballena gris y 67 % de las muestras de ballena azul presentaron ADN de hongos. La secuencia obtenida a partir de la clonación de uno de los productos amplificados presentó 83 % de similitud con *Cryptococcus neoformans*. En las muestras ambientales no pudo encontrarse ADN de los microorganismos respiratorios investigados. Se encontraron acantocéfalos (*Polymorphidae*) en 22 % de las muestras de heces de ballena azul y 29 % de ballena de aleta, huevos de céstodos (*Diphylobothriidae*) en 17 % de las ballenas azules y 29 % de las ballenas de aleta; y huevos de nemátodos (*Anisakidae*) en 26 % de las ballenas azules. El estudio demostró que es posible el muestreo sanitario no-invasivo de cetáceos en vida libre. Los microorganismos respiratorios detectados son potencialmente zoonóticos, pueden ocasionar enfermedad severa en individuos inmunosuprimidos y se han asociado con epizootias virales. Los helmintos encontrados en las heces de las

ballenas estudiadas son comunes en cetáceos y pueden ser virulentos cuando las tasas de infección son altas.

ABSTRACT

Respiratory and digestive pathogen loads were investigated in gray, blue and fin whales from Magdalena Bay and the Gulf of California, in order to compare their diversity and determine their zoonotic potential. To date, little is known about pathogens of wild cetaceans, so it is difficult to infer epizootic outbreaks, as well as to determine public health risks. For this study, we implemented two methods for collection of whale blow, one with an extensible panel, and another using a hand-controlled helicopter. With these methods, we collected blow samples from 43 gray whales and 21 blue whales, as well as 36 environmental samples, which were analyzed using polymerase chain reactions (PCR) for microbial detection. For the parasitology analyses, we collected fecal samples from 23 blue whales and seven fin whales, and examined them using Ritchie's standardized technique. Forty blow samples amplified bacterial DNA and of these, 26 % and 33 % amplified *Streptococcus β-haemolyticus* in gray and blue whales, respectively. Twelve percent of the gray whale samples amplified *Streptococcus intermedius*. Fungal DNA was detected in 39 % of the gray whale samples and 67 % of the blue whale. One of these products was cloned and one of the sequences showed 83 % of homology with *Cryptococcus neoformans*. No DNA from pathogens was found in the environmental samples. Adult acanthocephalans (*Polymorphidae*) were found in 22 % of the blue whales and 29 % of the fin whales, and cestode eggs (*Diphyllobothriidae*) were detected in 17 % of the blue whales and 29 % of the fin whales, while nematode eggs (*Anisakidae*) were only found in 26 % of the blue whales. Our results demonstrate that it is possible to use non-invasive sampling methods to assess the health of free-ranging cetaceans. The respiratory microorganisms detected in this study are potentially zoonotic, may cause chronic infections in immunosuppressed animals, and have been associated with viral epizooties. The helminths detected are common in cetaceans and can be virulent when infection rates are high.

I. INTRODUCCIÓN

Junto con la depredación y la competencia sexual, las infecciones actúan como presiones de selección y por lo tanto, como agentes reguladores de las poblaciones naturales (Anderson & May, 1979). Mediante procesos ecológicos y evolutivos, los patógenos tienen un impacto importante en la dinámica y supervivencia de sus hospedadores y juegan un papel determinante en el mantenimiento de la biodiversidad. (Scott, 1988; Real, 1996; Azpiri *et al.*, 2000; Woolhouse & Gowtage-Sequeira, 2005; Smith *et al.*, 2009). Sin embargo, a pesar de que en los últimos años la incidencia y emergencia de las enfermedades infecciosas ha aumentado en las poblaciones humanas y animales, siguen siendo escasos los estudios de ecología y de conservación que consideran a los patógenos como factores claves para el mantenimiento y viabilidad de las poblaciones silvestres (McCallum & Dobson, 1995; Real, 1996; Smith *et al.*, 2009).

I.1. IMPACTO DE LOS PATÓGENOS SOBRE LAS POBLACIONES NATURALES

Desde hace más de 30 años, diversos estudios han señalado la importancia de los patógenos como uno de los principales factores de mortalidad en las poblaciones naturales de mamíferos, mientras que es el principal en las poblaciones de aves silvestres (Anderson & May, 1979; Azpiri *et al.*, 2000) y humanas (Real, 1996). Es por medio de distintos mecanismos que los patógenos afectan la supervivencia y éxito reproductivo del hospedador (eficacia biológica: *fitness*), restringiendo en consecuencia el crecimiento de las poblaciones. Por ejemplo, mientras más parasitado o enfermo esté un individuo, incrementará su susceptibilidad a la depredación (Anderson & May, 1979; Scott, 1988; Azpiri *et al.*, 2000).

A nivel de comunidades, los patógenos pueden tener efectos reguladores, ya que los brotes infecciosos en una determinada región pueden ocasionar la mortalidad de alguna de las especies dominantes, provocando que otras ocupen esos nichos ecológicos. (Anderson & May, 1979; Azpiri *et al.*, 2000). Sin embargo, si ocasionan la mortalidad de especies o poblaciones pequeñas y vulnerables, pueden conducir a su extinción (Azpiri *et al.*, 2000; Daszak *et al.*, 2000, Daszak y Cunningham, 1999).

I.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS AGENTES INFECCIOSOS

El éxito de los patógenos depende de diversos mecanismos y estrategias de adaptación y transmisión. En términos generales, los patógenos pueden clasificarse como micro- y macroparásitos. Los microparásitos (i.e. virus, bacterias, algunos protozoarios y hongos) se caracterizan por un tamaño microscópico (i.e. virus: 0.009 a 0.02 μm de diámetro; bacterias: 0.1 a 5.0 μm de diámetro; hongos: 5 a 10 μm de largo) (Pelczar *et al.*, 1977; O'Leary, 1990), tiempos de generación muy cortos y tasas de mutación y reproducción dentro del hospedador extremadamente altas (Anderson & May 1979; Scott, 1988; Hudson *et al.*, 2002). No presentan estadios infectivos específicos y la duración del proceso infeccioso es generalmente corta en relación al tiempo de vida del hospedador. De manera general, conducen a la muerte, o, generan una respuesta inmune de larga duración, que muchas veces es permanente en los hospedadores que sobreviven a la infección. (Anderson & May 1979; Anderson & May, 1991; Hudson *et al.*, 2002).

Los microparásitos se transmiten generalmente por contacto directo entre los hospedadores (i.e. contacto sexual, cutáneo, por mordida, por inhalación) (Anderson & May 1979, Anderson & May, 1991), por lo que afectan más frecuentemente a especies con tendencia a agregarse y que mantienen altas tasas de contacto entre los individuos (Anderson & May, 1991). Las infecciones por microparásitos tienden a ser epidémicas, es decir que afectan a un gran número de individuos de la población, en un periodo corto de tiempo y con impactos poblacionales importantes (McCallum & Dobson, 1995). Un ejemplo de esto es la epidemia de *Rinderpest* (morbillivirus), que a finales del siglo XIX causó mortalidades de hasta 90 % y restringió la distribución geográfica de la mayoría de las especies de ungulados en África (Anderson & May, 1979; Broad, 1983; Woolhouse & Gowtage-Sequeira, 2005).

En contraste, los macroparásitos (i.e. helmintos y artrópodos) son relativamente más grandes y sus tiempos de generación son mucho más largos (Anderson & May 1979; Scott, 1988; Anderson & May 1991). La respuesta inmune generada por los macroparásitos es generalmente de corta duración y dependiente del número de parásitos presentes en el hospedador, es decir de la intensidad de la infección. Por esta razón, las infecciones por macroparásitos suelen ser de naturaleza endémica, con re-infecciones constantes en las poblaciones hospedadoras (Anderson & May, 1979; McCallum & Dobson, 1995). Rara vez conducen a la mortalidad del hospedador, pero lo pueden debilitar, incrementando su susceptibilidad a infecciones por microparásitos (Hudson *et al.*, 2002). En la mayoría de los casos, la transmisión de los macroparásitos es de forma indirecta a través de hospedadores intermediarios (otros vertebrados) o vectores (insectos o moluscos), necesarios para completar sus ciclos de vida (Anderson & May 1979, Scott, 1988; Anderson & May, 1991; Real, 1996). Por ejemplo, varios géneros de tremátodos se transmiten a través de caracoles u otros moluscos,

hasta llegar a su fase infectiva y parasitar al hospedador definitivo (Anderson & May 1991; Hudson *et al.*, 2002). Por lo que generalmente los macroparásitos no requieren de un contacto directo entre individuos e infectan a especies con tendencia a dispersarse. Sin embargo, también afectan a poblaciones con una alta tasa de agregación, siempre y cuando los hospedadores intermediarios o vectores estén presentes en la zona (Anderson & May, 1991; Real, 1996). Un ejemplo del impacto poblacional que pueden ocasionar los macroparásitos es la alta mortalidad del borrego cimarrón de Norte América que fue provocada principalmente por los nemátodos *Protostrongylus stilesi* y *P. rushi*, transmitidos a través de caracoles. La infestación incrementó la susceptibilidad de los animales a otras infecciones respiratorias, conduciendo a neumonías fatales (Anderson & May, 1979).

I.1.2. ENFERMEDADES EMERGENTES EN LAS POBLACIONES NATURALES

Las enfermedades infecciosas emergentes son aquellas que surgen en lugares y poblaciones hospedadoras nuevos o que presentan un incremento en la incidencia o expansión geográfica de la infección (Daszak *et al.*, 2001; Woolhouse *et al.*, 2002; Woolhouse & Gowtage-Sequiera, 2005). Pueden ser provocadas por patógenos de reciente aparición, pero generalmente involucran a patógenos resurgentes (Daszak *et al.*, 2001; Woolhouse *et al.*, 2002) y muchas veces son zoonóticos, como *Mycobacterium tuberculosis*, agente causal de la tuberculosis; o *Brucella spp.*, agente causal de la fiebre de Malta en humanos y trastornos reproductivos en otros mamíferos (Debeaumont *et al.*, 2005; Trevejo *et al.*, 2005).

La incidencia de muchas enfermedades infecciosas ha aumentado en las últimas tres décadas, tanto en los humanos, como en los animales

domésticos y de vida libre (Real, 1996; Daszak *et al.*, 2000; Woolhouse *et al.*, 2002; Trevejo *et al.*, 2005; Garner *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2009). La mayoría de las enfermedades emergentes y epizootias en fauna silvestre han estado relacionadas con patógenos zoonóticos, es decir aquellos transmisibles entre los animales y el humano (Woolhouse & Gowtage-Sequeira, 2005; Wolfe *et al.*, 2005, Trevejo *et al.*, 2005) y con patógenos de animales domésticos (Smith *et al.*, 2009). Existe una interacción entre los animales domésticos, el humano y la fauna silvestre y este contacto ha incrementado en los últimas décadas debido a factores antropogénicos como las translocaciones de especies, el ecoturismo y la degradación del hábitat, lo que ha permitido que la transmisión de patógenos y el paso de enfermedades entre los tres grupos haya incrementado a su vez (Cunningham, 1996; Woolhouse *et al.*, 2002; Woolhouse & Gowtage-Sequeira, 2005; Smith *et al.*, 2009).

Algunas de estas enfermedades han ocasionado grandes pérdidas económicas, como por ejemplo los brotes virales de *fiebre aftosa* y de *lengua azul* en el ganado bovino, o el virus de influenza en las aves; y se han convertido en un riesgo real para la conservación de especies vulnerables (Scott, 1988; McCallum & Dobson, 1995; Real, 1996; Azpiri *et al.*, 2000; Woolhouse *et al.*, 2002). Algunas enfermedades emergentes en poblaciones naturales, tales como los brotes de encefalopatía espongiiforme bovina en ungulados o de moquillo (*morbillivirus*) en fócidos y cetáceos, han tenido un impacto creciente sobre la salud animal y la conservación de la biodiversidad (Woolhouse *et al.*, 2002).

Un ejemplo actual del impacto dramático que pueden ocasionar las infecciones emergentes en poblaciones naturales es la *chytridiomycosis*, ocasionada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, que en los últimos años ha sido asociado a altas mortalidades locales y globales de por lo menos 43 especies de anfibios (Cunningham *et al.*, 2005). Esta enfermedad ha

contribuido, junto con otros factores ambientales, a una disminución marcada (más del 40 %) de este orden taxonómico, incluyendo la extinción reciente de la rana de hocico largo (*Taudactylus acutirostris*) en Australia (Daszak & Cunningham, 1999; Daszak *et al.*, 2000; Daszak *et al.*, 2001; Brooks *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2009). Otros ejemplos son el moquillo canino (morbillivirus) que ocasionó la extinción del hurón de patas negras (*Mustela nigripes*) en 1987 y la microsporidiosis que provocó la extinción en vida libre de los caracoles terrestres *Partula turgida* (Cunningham & Daszak, 1998; Daszak & Cunningham, 1999.).

I.2. INTERACCIÓN DE LOS PATÓGENOS CON FACTORES INTRÍNSECOS Y EXTRÍNSECOS A LOS HOSPEDADORES

Los patógenos rara vez conducen a la extinción por sí solos, ya que requieren de algunas condiciones particulares para ser transmitidos e interactúan con diversos factores externos y propios al hospedador.

La susceptibilidad del hospedador a los patógenos depende de factores intrínsecos y extrínsecos, y suele verse incrementada bajo condiciones que producen estrés crónico y que reducen la variabilidad genética (Lafferty & Gerber, 2002). La condición fisiológica de los hospedadores (como la gestación o la lactancia), su edad (algunas enfermedades afectan más a individuos jóvenes o viejos), el sexo (algunas infecciones del tracto reproductor afectan más a las hembras) o factores genéticos (como la baja heterocigocidad en las poblaciones) (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2003; Woolhouse & Gowtage-Sequiera, 2005) son factores intrínsecos que influenciarán la susceptibilidad a infecciones.

Algunos factores extrínsecos como el cambio climático, la contaminación, la translocación de especies, la degradación del hábitat o el

contacto incrementado con las poblaciones humanas (Daszak *et al.*, 2001; Wolfe *et al.*, 2005; Gaydos *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2009) también juegan un papel importante en la incidencia de enfermedades en poblaciones naturales.

Los cambios antropogénicos que conducen a la reducción y degradación del hábitat han permitido que la transmisión de patógenos entre individuos de una misma población se vea incrementada, debido a un mayor contacto entre ellos, así como con poblaciones o especies-hospedadoras nuevas. La urbanización ha sido citada como un factor clave en el incremento de la transmisión de varias infecciones humanas virales y bacterianas (Woolhouse & Gowtage-Sequiera, 2005). También ha favorecido un incremento en la presión selectiva de los patógenos, lo que conduce a la formación de cepas patógenas resistentes, adaptadas a nuevas condiciones ambientales, productos químicos y antibióticos (Daszak *et al.*, 2001).

Otro factor extrínseco que permite la diseminación e importación de patógenos nuevos dentro de poblaciones inmunológicamente “vulnerables”, es la translocación de especies, por medio de la cual se han introducido especies cuyos patógenos y flora comensal infectan a hospedadores nuevos y pueden afectar así a poblaciones enteras. Por este mecanismo también se han llegado a introducir especies nuevas en un medio donde existen patógenos que su sistema inmune no reconoce (Cunningham, 1996).

El flujo de patógenos entre las especies domésticas, los humanos y la fauna silvestre, se ve favorecido por el incremento del contacto humano durante las actividades de eco-turismo o las de investigación, o por la proximidad de las poblaciones humanas con el hábitat natural de las especies. Esto conduce a un aumento en la contaminación del ambiente así como a la transmisión de patógenos (Gaydos *et al.*, 2007).

I.3. CO-EVOLUCIÓN PATÓGENO-HOSPEDADOR Y GENERACIÓN DE DIVERSIDAD GENÉTICA

La co-evolución es un proceso de cambio adaptativo y recíproco entre dos o más especies que co-existen. Los cambios en las frecuencias de genes en una población debido a la selección natural, provocan cambios en las frecuencias de genes en la(s) otra(s) población(es). Así, la co-evolución puede ocurrir entre la presa y su depredador, las plantas y los herbívoros, entre competidores o mutualistas; así como en los sistemas patógeno-hospedador, en los cuales la asociación es íntima y se producen fuertes presiones selectivas de ambos (Woolhouse *et al.*, 2002).

Las interacciones patógeno-hospedador son consideradas de gran importancia evolutiva ya que tienen efectos sobre la eficacia biológica del hospedador y de los patógenos (Keymer & Read, 1990; Brooks *et al.*, 2006; Kouyos *et al.*, 2007). Por un lado, esta co-evolución provoca un fenómeno de flexibilidad ecológica, el cual permite que los patógenos con ciclos de vida complejos se establezcan y dispersen rápidamente en la población hospedadora, siempre y cuando existan todos los elementos del ecosistema (i.e., hospedadores intermediarios, vectores) para llevar a cabo las etapas de su ciclo de vida (Brooks *et al.*, 2006). Esto sucede cuando se realizan translocaciones de especies y sus patógenos “viajan” con ellas, diseminándose en el “nuevo hábitat” e infectando a nuevas especies hospedadoras. Este fenómeno sucedió con el tremátodo pulmonar *Haematoloechus floedae* al introducir ejemplares de la rana toro (*Rana catesbeiana*) infectados al Suroeste de los Estados Unidos y en la península de Yucatán, en donde se infectaron cuatro especies de rana leopardo (Brooks *et al.*, 2006).

Por otro lado, la presencia de los patógenos en las poblaciones naturales ayuda a regular la biodiversidad y contribuye a la generación de diversidad genética de las especies (Kouyos *et al.*, 2007; Woolhouse *et al.*, 2002). La Hipótesis de la Reina Roja (Van Valen, 1973) sugiere que la dinámica co-evolutiva antagonista de los sistemas parásito-hospedador (o patógeno-hospedador) puede favorecer la recombinación genética en el hospedador (Keymer & Read, 1990; Kouyos *et al.*, 2007). Como las interacciones entre patógenos y hospedadores tienen generalmente una fuerte base genética, la recombinación entre los hospedadores puede incrementar la fracción de crías con nuevos genotipos potencialmente resistentes a los patógenos (Kouyos *et al.*, 2007), representando esto a su vez una presión de selección sobre los patógenos con respecto a su infectividad. Esto continúa en un ciclo, permitiendo que tanto los patógenos como los hospedadores sigan existiendo. Así, los patógenos tienen un efecto de “control” sobre las poblaciones hospedadoras, y juegan un papel central en el mantenimiento de la diversidad genética (Brooks *et al.*, 2006).

A la fecha, son escasos los estudios de ecología y conservación que consideran la importancia relativa de los patógenos como factores de impacto y de regulación de las poblaciones naturales. Entre otras razones, esto se debe a la escasa información que se tiene sobre los patógenos que afectan a especies silvestres (Smith *et al.*, 2009), particularmente de aquellas especies consideradas como vulnerables (Baillie *et al.*, 2004).

II. ANTECEDENTES

II.1. FACTORES DE IMPACTO Y ENFERMEDADES INFECCIOSAS EN EL MEDIO MARINO

El medio marino ha sido afectado por diversos factores durante las últimas décadas, lo cual ha incrementado la susceptibilidad de varias especies a los brotes de enfermedades infecciosas (McCallum *et al.*, 2003; Harvell *et al.*, 2002). Un ejemplo de esto es el cambio climático global, que ha provocado un incremento paulatino de la temperatura superficial de los océanos y un aumento del nivel del mar en los últimos cincuenta años (Harvell *et al.*, 2002; Simmonds & Isaac, 2007); así como cambios en la circulación de los océanos y una baja salinidad (Harvell *et al.*, 2002). En conjunto, estos cambios han ocasionado alteraciones en el comportamiento migratorio de algunas especies, en la abundancia y distribución de sus presas, así como en las dinámicas del sistema patógeno-hospedador (Daszak *et al.*, 2001; Kutz *et al.*, 2005; Simmonds & Isaac, 2007). Específicamente, el incremento de la temperatura en el mar puede afectar la distribución de los vectores u hospedadores intermediarios de algunos patógenos, así como el desarrollo parasitario y las tasas de transmisión patogénica. Por ejemplo, el incremento de la temperatura puede acelerar y ampliar geográficamente la dispersión de patógenos que requieren altas temperaturas para reproducirse (como muchas bacterias y virus gastroentéricos) debido a la “pérdida” de las barreras de bajas temperaturas en ciertas zonas, como se explica la expansión hacia el Norte de la enfermedad de las ostras del Oriente, a mediados de los años 80 en las costas orientales de E.E.U.U (Harvell *et al.*, 2002). En el hospedador, los cambios de temperatura también tienen efectos nocivos, ya que pueden provocar un incremento en la susceptibilidad a infecciones debido a la inmunosupresión ocasionada por el estrés térmico y por una disminución en la

disponibilidad de presas, sensibles a su vez al cambio térmico (Geraci *et al.*, 1999; Harvell *et al.*, 2002).

Otro factor de impacto sobre la viabilidad de las poblaciones marinas ha sido el incremento de las actividades antropogénicas, principalmente en las zonas costeras, que han dado origen a una mayor contaminación química y biológica del agua, a una degradación del hábitat y a la mortalidad de diversas especies debido a intoxicación (Harwood, 2000; Neale *et al.*, 2005). Se ha demostrado que la exposición a niveles altos de compuestos químicos tóxicos (i.e. compuestos bifenoles clorinados) reducen la competencia inmune de los mamíferos, haciéndolos más vulnerables a los patógenos (e.g. Kannan *et al.*, 1993; Gulland & Hall, 2005). Por otro lado, la proximidad de las poblaciones humanas parece estar provocando un incremento en la prevalencia de patógenos zoonóticos en algunas especies, debido a las descargas de aguas negras que acarrean diversos microorganismos y huevos de parásitos gastrointestinales al mar (e.g. Birkun, 2002; Gulland & Hall, 2005; Gaydos *et al.*, 2007).

Las enfermedades infecciosas en el medio marino se han incrementado de manera importante en las últimas dos décadas, incluyendo enfermedades emergentes que han provocado mortalidades masivas de diversas especies marinas y han estado relacionadas en su mayoría al cambio antropogénico y climático. Como ejemplos de esto, destacan la micosis por *Aspergillus sydowii* y diversas infecciones bacterianas en los corales (Daszak *et al.*, 2001; Harvell *et al.*, 2002), la enfermedad de las ostras del Oriente (Harvell *et al.*, 2002), los herpesvirus en sardinas y tortugas, el virus de la anemia del salmón (Dunn, 2006), así como el morbillivirus en mamíferos marinos (Guardo, 2005). Es muy probable que la velocidad de dispersión de los patógenos y su impacto en el medio marino se relacionen

con la carencia de barreras físicas en el medio oceánico y un mayor grado de conectividad entre los distintos ecosistemas marinos (McCallum *et al.*, 2003).

II.2. ALGUNAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS EN LOS MAMÍFEROS MARINOS

Debido a los diversos factores mencionados que han impactado al medio marino en las últimas décadas, los mamíferos marinos son un grupo especialmente vulnerable al efecto de los patógenos, incluyendo bacterias, virus, protozoarios, hongos y macroparásitos (Dunn, 2006; Dubey *et al.*, 2005; Burek *et al.*, 2005; 2005; Bracht *et al.*, 2006; Castinel *et al.*, 2006), algunos de los cuales son zoonóticos (Hugh-Jones *et al.*, 1995; Tryland, 2000; Cowan *et al.*, 2001) y han sido causantes de enfermedades emergentes (Hugh-Jones *et al.*, 1995; Lee Miller *et al.*, 2000; Saliki *et al.*, 2002; Godfroid *et al.*, 2005). Esto cobra particular importancia al considerar que tanto las actividades de investigación como las turísticas relacionadas con estas especies han aumentado considerablemente en todo el mundo, por lo que el contacto entre humanos y cetáceos es cada vez más estrecho y más frecuente, implicando que el riesgo de transmisión de patógenos sea mayor (Smith *et al.*, 1978; Geraci y Ridgway, 1991; Tryland, 2000; Cowan *et al.*, 2001; Rocha, 2005). Los patógenos emergentes, además, representan un riesgo real para las especies más vulnerables, especialmente aquellas que tienen una distribución geográfica reducida y se consideran en peligro (Dybas, 2001; Guardo *et al.*, 2005), como la vaquita marina (*Phocoena sinus*) (Brownell, 1986) o la ballena franca del Norte (*Eubalaena glacialis*) (Goddard & Rugh, 1998), e incluso para las especies menos amenazadas pero vulnerables, como la ballena azul (*Balaenoptera musculus*), la ballena de aleta (*Balaenopterna physalus*) o el cachalote (*Physeter macrocephalus*) (Young & Shapiro, 2000; Baillie *et al.*, 2004) en el caso de los cetáceos.

II.2.1. ENFERMEDADES EMERGENTES EN CETÁCEOS

Morbillivirus

Las mortalidades masivas ocasionadas por las epizootias de moquillo (morbillivirus) en los últimos veinte años, han afectado principalmente a poblaciones de odontocetos en Europa, en el Atlántico Norte y en el Golfo de México, como lo fueron el delfín listado del Mediterráneo (*Stenella coeruleoalba*) en 1990-1992, la marsopa de puerto (*Phocoena phocoena*), el delfín mular del Atlántico (*Tursiops truncatus*) en 1982, 1987-1988 y 1993 (Van Bresseem *et al.*, 1998; Lee Miller *et al.*, 2000; Saliki *et al.*, 2002; Gulland & Hall, 2005; Guardo *et al.*, 2005) y los calderones en el Atlántico occidental (*Globicephala* sp.) (Duignan *et al.*, 1995). Este virus, que también afecta a varias especies de pinnípedos (Harding *et al.*, 2002; Van Bresseem *et al.*, 1998) y carnívoros terrestres (en los que aparentemente se originó), infecta el aparato respiratorio y el nervioso, ocasionando emaciación, inmunosupresión, neumonía intersticial, necrosis bronquial, meningo-encefalitis no supurativa y, frecuentemente, la muerte (Duignan *et al.*, 1992; Duignan *et al.*, 1995).

Influenza

Los virus de Influenza tipo A son patógenos que afectan a un gran número de especies, incluyendo al humano, aves, así como mamíferos terrestres y marinos, representando en la actualidad una zoonosis de distribución mundial. En los cetáceos, el virus se ha relacionado a varamientos masivos y muerte ocasionada por neumonía y se ha encontrado evidencia serológica de la infección en muchas especies (Russell *et al.*, 1998; Kennedy-Stoskopf, 2001), tales como las marsopas de puerto en las costas de Nueva Inglaterra, E.U. en 1979-1980 (Gulland & Hall, 2005). Se han reportado cuadros de traqueítis y neumonía bronquio-intersticial en delfines

mulares infectados con el virus de Parainfluenza, así como infecciones secundarias por hongos y bacterias (Venn-Watson *et al.*, 2008)

Brucelosis

La brucelosis es una zoonosis re.emergente a nivel mundial. *Brucella melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*, son los agentes causales de la fiebre de Malta en los humanos (infección que cursa con fiebres recurrentes, afección respiratoria e inflamación articular) y varias especies domésticas son los reservorios terrestres. La infección se reportó en mamíferos marinos por primera vez en 1990 y hace menos de una década, se evidenció la aparición de especies nuevas de *Brucella* que han afectado a varias especies de marsopas y delfínidos, así como a algunos mysticetos (*Balaenoptera acutorostrata* y *B. borealis*) (Cloeckaert *et al.*, 2003; Godfroid *et al.*, 2005). Ocasiona lesiones del aparato reproductor y trastornos como abortos e infertilidad. A la fecha se desconocen los efectos que la brucelosis pueda tener en las poblaciones de mamíferos marinos silvestres (Geraci *et al.*, 1999; Dunn *et al.*, 2001; Foster *et al.*, 2002).

II.2.2. BACTERIAS DEL TRACTO RESPIRATORIO

Se han detectado diversos géneros bacterianos como parte de la microflora respiratoria de lobos marinos y delfínidos clínicamente sanos, tales como *Micrococcus*, *Arcanobacterium*, *Corynebacterium*, *Moraxella*, *Escherichia*, *Kurthia*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Brevibacillus*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Pasteurella*, *Shewanella*, *Flavobacterium*, *Oligella*, *Vibrio*, y *Edwardsiella*, (Smith *et al.*, 1978; Buck & Spotte, 1986; Hernández-Castro *et al.*, 2004; Buck *et al.*, 2006). Muchos de estos microorganismos son, sin embargo, patógenos oportunistas y pueden ocasionar enfermedad en las vías

respiratorias de animales inmunosuprimidos. Generalmente se les ha asociado a cuadros severos de parasitismo, presentándose como una infección secundaria (Birkun, 2002; Dunn *et al.*, 2001, Kelly *et al.*, 2005).

Los cetáceos con pasteurelosis (*Pasteurella* spp.), por ejemplo, manifiestan un cuadro de septicemia aguda y mueren generalmente a los pocos días, revelando lesiones de neumonía intersticial y bronquial, así como miocarditis, hepatitis, esplenitis y nefritis en el examen postmortem (Dunn *et al.*, 2001). Igualmente, varias especies de *Streptococcus* han sido asociadas con infecciones de las vías respiratorias y cuadros de neumonía en mamíferos marinos (i.e. *Streptococcus marinammalium*) (Lawson *et al.*, 2005); principalmente los *Streptococcus* β -hemolíticos, como *Streptococcus phocae* y *S. equi* subs. *zooepidemicus* (Alber *et al.*, 2004; Akineden *et al.*, 2005). Muchos de estos *Streptococcus* son zoonóticos (Han Goh *et al.*, 1998).

Otras infecciones respiratorias como las ocasionadas por *Mycobacterium* spp. se han reportado esporádicamente en mamíferos marinos. Desde 1900 existen reportes tanto de mycobacterias atípicas no-tuberculosas (i.e. *Mycobacterium marinum*), como de aquellas asociadas al complejo tuberculosis (*Mycobacterium bovis*, *M. tuberculosis*), el cual provoca un cuadro de neumonía granulomatosa y emaciación crónica (Geraci *et al.*, 1999; Dunn *et al.*, 2001) y que además es una enfermedad zoonótica.

II.2.3. HONGOS DEL TRACTO RESPIRATORIO

Varias especies de hongos ocasionan bronconeumonía en los mamíferos marinos y la infección se relaciona con cuadros de inmunosupresión ya que los hongos no son parte de la flora normal del tracto respiratorio. Como agentes causales de estas micosis respiratorias y

sistémicas se han reportado principalmente a *Aspergillus fumigatus*, *Candida sp.* y *Cryptococcus neoformans* (Reidarson *et al.*, 2001; Birkun, 2002).

II.2.4. HELMINTOS GASTROINTESTINALES

Los nemátodos pertenecientes a la familia *Anisakidae* (*Anisakis* spp., *Pseudotarranova decipiens* y *Contracoecum* spp.), son considerados como los nemátodos gastrointestinales más comunes en mamíferos marinos y existen reportes de estos parásitos tanto en odontocetos como en misticetos (Mignucci-Gianonni *et al.*, 1998; Raga *et al.*, 2002; Nadler *et al.*, 2005; Azusa *et al.*, 2006). Su ciclo de vida se desarrolla en el medio marino, siendo los mamíferos marinos su hospedador definitivo y las presas de éstos (eufáusidos, algunos peces y cefalópodos), sus hospedadores intermediarios (Jackson *et al.*, 1997; Anderson, 2000; Umehara *et al.*, 2006). Estos nemátodos son zoonóticos, y el humano es un hospedador accidental dentro de su ciclo de vida por ingerir peces o cefalópodos crudos infestados (Raga *et al.*, 2002; Asuza *et al.*, 2006). Cuando hay un grado alto de infestación por estos nemátodos, los animales pueden presentar cuadros agudos de gastritis, diarrea y ulceración (Dailey, 2001).

Los céstodos gastrointestinales más comunes en cetáceos y pinnípedos se agrupan dentro de las familias *Tetrabothriidae* y *Diphyllobothriidae*, aunque únicamente una especie es considerada patogénica: *Strobicephalus triangularis* (Noble & Noble, 1982; Dailey, 2001;). Dos géneros de acantocéfalos de la familia *Polimorphidae* (*Corynosoma* spp. y *Bolbosoma* spp.) se presentan con una prevalencia importante en varias especies de mamíferos marinos, incluyendo misticetos (Dailey & Vogelbein; 1991; Bush *et al.*, 2001). Aunque no se relacionan a cuadros patológicos graves, algunos han ocasionado la formación de numerosos abscesos en

algunos cetáceos, como por ejemplo, *Bolbosoma balanae* en las ballenas grises (*Eschrichtius robustus*) (Dailey, 2001).

II.3. HÁBITOS DE AGREGACIÓN Y DE ALIMENTACIÓN DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS

En esta investigación se seleccionaron a la ballena gris (*Eschrichtius robustus*), la ballena azul (*Balaenoptera musculus*) y la ballena de aleta (*Balaenoptera physalus*) como especies de estudio considerando, 1) la posibilidad de acercamiento desde embarcaciones menores; 2) la información de base y estudios previos sobre la ecología y biología de cada especie realizados en el laboratorio de Ecología de Cetáceos del CICIMAR, 3) la presencia y abundancia significativas de dichas especies en el área de estudio y 4) las diferencias entre los hábitos de agregación y alimentarios de estos mysticetos.

Los microorganismos que infectan el aparato respiratorio de mamíferos se transmiten generalmente por contacto directo a partir de los aerosoles de la respiración (dentro de gotas de vapor exhaladas) y por la inhalación de éstos. (Anderson & May, 1991). En este estudio se buscó así comparar la flora microbiana y carga patógena respiratoria de la ballena gris (*Eschrichtius robustus*) y la ballena azul (*Balaenoptera musculus*), considerando las diferencias entre los hábitos de agregación de estos dos mysticetos. La ballena gris es una especie gregaria temporal que se congrega durante el invierno (de diciembre a marzo) en varias lagunas costeras de la costa occidental de la Península de Baja California (Scammon, 1869). En las lagunas de Bahía Magdalena (B.C.S.) se han llegado a encontrar hasta 200 individuos, en grupos de más de tres, así como parejas de madres con cría (Urbán, 2000). En contraste, la ballena azul es una especie más solitaria, aunque se presentan asociaciones de individuos en determinados periodos

del año (Martínez, 2005). De enero a abril, se estimó el número de ballenas azules en alrededor de 500 individuos dispersos a lo largo del Golfo de California (Gendron, 1993; Gendron, 2002), siendo una especie menos gregaria que la ballena gris (Ver Fig. 1, sección V.1.1).

La transmisión de la mayoría de los parásitos gastrointestinales de mamíferos se da generalmente de forma indirecta por medio de la ingesta de fases de desarrollo (i.e., larvas, huevos) que se encuentran dentro de hospedadores intermediarios (Bush *et al.*, 2001). Por esta razón, se buscó investigar diferencias en las cargas parasitarias digestivas entre la ballena azul (*Balaenoptera musculus*) y la ballena de aleta (*Balaenoptera physalus*), relacionadas con diferencias en los hábitos de alimentación. La ballena azul es especialista en alimentarse de zooplancton, mientras que la ballena de aleta es más generalista y puede incluir desde copépodos hasta peces pelágicos menores en su dieta (Gaskin, 1976; Jaume-Shinckel, 2003). Durante la temporada invernal, cuando ambos coinciden en el Golfo de California, los dos rorcuales se alimentan del eufáusido dominante de esta región (*Nyctiphanes simplex*) (Gendron, 1990; Del Ángel, 1997; Gendron *et al.*, 2001; Jaume-Shinckel, 2003).

III. JUSTIFICACIÓN

Los mamíferos son considerados centinelas del ecosistema marino (Reddy *et al.*, 2001; Neale *et al.*, 2005). Estas especies han mostrado ser buenos indicadores de cambios a mediano y largo plazo en el ambiente, debido a su distribución global, a que muchas de ellas tienen un promedio de vida largo, son depredadores tope o se encuentran en una posición trófica alta; y cuentan con un importante depósito de grasa corporal en el cual se almacenan las toxinas y los contaminantes que adquieren del medio (Kannan *et al.*, 1993; Reddy *et al.*, 2001; Neale *et al.*, 2005).

En los últimos años un número importante de especies de mamíferos marinos ha sido afectado por brotes infecciosos (Saliki *et al.*, 2002; KuKanich *et al.*, 2004; Bracht *et al.*, 2006); sin embargo, se conoce poco acerca de estos patógenos y sus mecanismos de transmisión en las poblaciones naturales de cetáceos, ya que la mayoría de los estudios han caracterizado los microorganismos y parásitos metazoarios provenientes de cetáceos mantenidos en cautiverio y de animales varados o cazados, pero que no son representativos de las poblaciones naturales (Geraci *et al.*, 1999; Dunn *et al.*, 2001; Reddy *et al.*, 2001; Foster *et al.*, 2002; KuKanich *et al.*, 2004).

Tener conocimiento sobre los patógenos presentes en los cetáceos en vida libre permitiría establecer los niveles 'basales' de infección, estimar el estado de salud general de las poblaciones, e inferir amenazas patógenas para estas especies, así como para algunos organismos relacionados (como aquellos de los cuales se alimentan) (Dybas, 2001). Con esta aproximación sería posible identificar daños ecológicos ocasionados por brotes epizooticos de ciertos patógenos, así como inferir riesgos de transmisión zoonótica en el mar.

IV. OBJETIVOS

El objetivo general de este estudio fue caracterizar la carga microbiana respiratoria y parasitaria digestiva de la ballena azul (*Balaenoptera musculus*), la ballena gris (*Eschrichtius robustus*) y la ballena de aleta (*Balaenoptera physalus*) en las costas de la península de Baja California (Golfo de California y costa del Pacífico), México.

IV.1. OBJETIVOS PARTICULARES

Se buscó abordar los siguientes objetivos particulares:

- 1) Detectar microorganismos respiratorios a partir de muestras de soplos de ballena azul y ballena gris.
- 2) Detectar parásitos gastrointestinales a partir de muestras de heces de ballena azul y ballena de aleta.
- 3) Evaluar las diferencias de prevalencia de microorganismos y parásitos entre las especies estudiadas.
- 4) Evaluar el potencial zoonótico de los patógenos detectados.

V. METODOLOGÍA

V. 1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

V.1.1. ÁREA DE ESTUDIO

Se buscaron individuos de ballena azul y ballena de aleta en la región media del Golfo de California, desde Bahía de la Paz a Bahía de Loreto ($24^{\circ}06' - 26^{\circ}05' \text{ N}$, $110^{\circ}17' - 111^{\circ}21' \text{ W}$); mientras que la ballena gris se muestreó en la laguna de Puerto A. López Mateos, Bahía Magdalena (costa Pacífico de B.C.S ($25^{\circ}02' - 25^{\circ}19' \text{ N}$, $112^{\circ}11' - 112^{\circ}45' \text{ W}$) (Fig. 1).

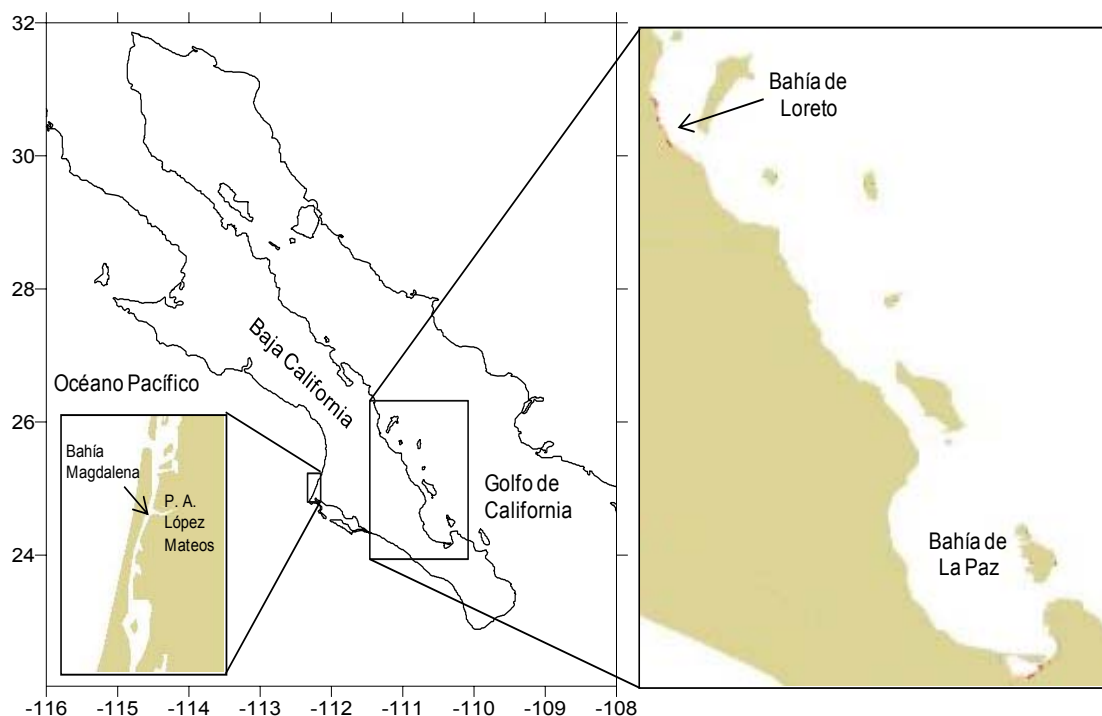


Fig. 1. Área de estudio. Golfo de California: Bahía de Loreto - La Paz. Pacífico Norte: Puerto A. López Mateos, Bahía Magdalena.

Los muestreos en el Golfo de California se llevaron a cabo durante las salidas de campo del 2005 al 2007 del Laboratorio de Ecología de Cetáceos del CICIMAR, en las cuales se recolectan datos y muestras para otros proyectos de investigación con cetáceos. Las salidas al Puerto A. López Mateos, se realizaron durante las temporadas de invierno del 2006 y 2007.

Las muestras de soplo se recolectaron exclusivamente de ballena gris y de ballena azul, ya que era posible aproximar la embarcación de muestreo a estas especies. Las muestras de heces se recolectaron de manera oportunista de ballenas azules y ballenas de aleta durante el 2006, 2007 y 2008. No se incluyó a la ballena gris en el análisis de carga parasitaria digestiva, ya que es logísticamente difícil recolectar muestras de heces de esta especie.

V.1.2. RECOLECCIÓN DE SOPLOS

La exhalación de los cetáceos, comúnmente llamada “soplo”, es visible y fácilmente identificable en el mar, al formar una nube por encima de la superficie del agua, que puede durar varios segundos en el aire antes de desaparecer. Para este proyecto, se implementaron dos técnicas para recolectar las muestras de soplo:

Técnica manual con panel extensible de unicel ó de acrílico

La técnica manual de recolección de soplos consistió en un panel de forma rectangular, de 50 X 35 cm, de acrílico o de unicel, sujeto a un tubo de aluminio extensible de 200 a 320 cm de largo (Fig. 2). La superficie para adhesión de los soplos en el panel de unicel consistió en una hoja de plástico libre de microorganismos que se cambiaba para cada muestreo. En el caso del panel de acrílico, este se limpió entre los muestreos utilizando una

solución viricida, bactericida, fungicida e inactivante de ácidos nucleicos: TriGene (Medichem, R.U.). Los materiales utilizados para la construcción de ambos paneles fueron accesibles y poco costosos (tubo de red de alberca al cual se sujetó una lámina de acrílico plano recortada o la tapa de una hielera de unicel con bolsas de plástico tipo Zip-lock adheridas). Al momento de la exhalación del cetáceo, y manteniendo la embarcación a una distancia de diez a 20 metros para ballena azul y de uno a ocho metros para ballena gris, se extendió el panel en dirección al soplo (Fig. 2).

En el caso de la ballena gris fue posible colocar el panel horizontalmente sobre el orificio respiratorio de los animales al momento de exhalar, cuando éstos se encontraban a una distancia menor a tres metros de la embarcación (Fig. 2). Cuando se encontraban más lejos, fue necesario pasar con la embarcación a través del soplo, cuando éste todavía permanecía visible en el aire. De esta forma se recolectaron todas las muestras de soplo de ballena azul con el panel y aunque el soplo estuviera relativamente lejos (hasta 20 metros de la embarcación), era posible pasar con la embarcación a través del mismo, ya que éste es mucho más grande (hasta 9 metros de altura) que el soplo de las ballenas grises y permanece por más tiempo en el aire.



Fig. 2. Panel de acrílico sujeto a un tubo extensible de aluminio, implementado para recolectar muestras de soplo de cetáceos. En la foto se observa el muestreo de una cría de ballena gris.

Las muestras se recolectaron frotando la superficie de adhesión con hisopos estériles. El cambio de la hoja de plástico o la desinfección del acrílico entre muestreos, así como el uso de hisopos estériles y guantes fueron medidas usadas para evitar contaminar las muestras con microorganismos ambientales y/o humanos.

Técnica aérea con helicóptero de control remoto

Con el fin de recolectar muestras de cetáceos desde una mayor distancia (~30 a 60 m de distancia de la embarcación), se utilizó un helicóptero a escala de control remoto, marca Raptor 30 V2 Thunder Tiger, con motor Thunder Tiger Pro-39 (H), Radio (Computer Radio System) de 6 canales marca Airtronics y Flight box marca Ripmax (Fig. 3). Para obtener las muestras, el helicóptero se piloteaba hacia el cetáceo y volaba a través del soplo, logrando que los hisopos y cajas de Petri estériles, sujetadas a los

flotadores del helicóptero, quedaran impregnados de la muestra. Los hisopos y cajas de Petri se cambiaban entre los muestreos (Figs. 3 y 4).



Fig. 3. Helicóptero a escala de control remoto marca Raptor 30 V2 Thunder Tiger, con hisopos estériles sujetos a los flotadores.



Fig. 4. Técnica aérea de recolección de muestras de sopro mediante helicóptero a control remoto. En la foto se observa el muestreo de una ballena azul.

Toma de muestras de sopro y muestras ambientales para el análisis molecular

Se recolectaron por lo menos dos réplicas de cada individuo muestreado. Cada hisopo se conservó en un tubo criogénico estéril con etanol al 95 % como conservador de ácidos nucleídos. Los tubos se mantuvieron en congelación en el tanque de nitrógeno líquido a $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ o refrigerados hasta su

llegada al laboratorio. Estas muestras se sometieron posteriormente a análisis moleculares (Ver sección V.2).

Con la finalidad de descartar una posible contaminación de las muestras con microorganismos ambientales o de humanos, se recolectaron muestras ambientales como “controles”, durante los muestreos, las cuales fueron sometidas al mismo análisis y conservación que las muestras de soplos. Estas muestras se recolectaron, en ausencia de cetáceos, de la manera anteriormente descrita utilizando hisopos estériles sujetos alrededor de 10 minutos al helicóptero antes de recolectar la muestra; y en el caso del panel, 10 a 15 minutos después de haberse desinfectado la superficie de adhesión o de haberse cambiado los plásticos, según el método de recolecta empleado.

El número de muestras recolectadas por cada individuo, así como la información relevante acerca del muestreo y del individuo muestreado fueron anotados en la hoja de avistamiento del laboratorio de Ecología de Cetáceos, correspondiente a cada individuo.

Número de muestras de soplo recolectadas

Se buscó muestrear el mayor número posible de individuos de las dos especies. En total se recolectaron 64 muestras de soplos, de las cuales 43 fueron de ballena gris y 21 de ballena azul; además de 36 muestras ambientales. La relación de muestras de soplo recolectadas entre enero y abril durante las salidas del 2005, 2006 y 2007, por especie y por método de recolección, así como las muestras ambientales recolectadas, puede verse en la tabla 1.

Tabla. 1. Número de muestras de soplo y muestras ambientales por especie y por técnica (panel extensible y helicóptero).

Muestras	Panel	Helicóptero	Total
Ballena gris	42	1	43
Ballena azul	18	3	21
Muestras ambientales	33	3	36



Fig. 5. Caja hermética para cultivos microbiológicos anaerobios

V.1.3. RECOLECCIÓN DE HECES

El muestreo de heces de misticetos fue oportunista y se realizó buscando visualmente la presencia de heces en la “huella” que dejan los cetáceos después de sumergirse. En los casos en los cuales se observaron heces compactas en la superficie, éstas se recolectaron con una cubeta de tres litros. El agua de mar se removió lo más posible por decantación y con un colador de plástico se retenían las heces dentro de la cubeta. Las muestras, de entre 150 y 500 g, se preservaron en frascos de plástico de 500 o 1000 ml

con etanol al 70 % (1:3) hasta su procesamiento en el laboratorio (Alba, 1994; Méndez, 2002). Las tapas de los frascos fueron selladas con cinta adhesiva para evitar la deshidratación. Los datos referentes a la recolección de heces fueron anotados en la hoja de avistamiento para cada individuo muestreado.

Se recolectaron 30 muestras de heces, 23 provenientes de ballena azul y 7 de ballena de aleta, durante los años 2006, 2007 y 2008 (Tabla 2). Las dos muestras del 2006 habían sido preservadas en etanol a una concentración diferente a la empleada para este estudio (50 %).

Tabla 2. Número de muestras de heces recolectadas en el Golfo de California entre 2006 y 2008.

Especie	2006	2007	2008	Total
Ballena azul	0	12	11	23
Ballena de aleta	2	1	4	7

V.2. ANÁLISIS MOLECULARES

Los análisis moleculares para este estudio fueron financiados por el Instituto de Zoología de Londres (ZSL, R.U.) y se realizaron en el Laboratorio de Epidemiología Molecular de Mamíferos Marinos de dicho Instituto, durante tres estancias de investigación realizadas en el 2006, 2007 y 2008.

V.2.1. EXTRACCIÓN DE ADN

Debido a que las muestras recolectadas predeciblemente tendrían una baja concentración celular, se probaron tres métodos comerciales de extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) con el fin de utilizar aquel que proporcionara ADN con alta concentración, calidad y pureza ($A_{260}/A_{280} = 1.7-1.9 \mu\text{g} / \text{ml}$ de ADN). Los tres métodos que se utilizaron fueron: Prepman (Applied Biosystems, R.U.), Gene Releaser (Bioventures, R.U.) y DNEasy (Qiagen, R.U.). Con el fin de probar las técnicas, se realizaron cuatro diluciones seriadas con agua estéril (1:50, 1:100, 1:200, 1:300) a partir de una colonia pura de *Escherichia coli* y como control negativo se usó agua estéril. Se extrajo el ADN de la colonia pura, de las cuatro diluciones y del control negativo, utilizando para las seis muestras las tres metodologías descritas a continuación:

Método Prepman (método de lisis)

1. Se homogeneizaron las muestras en un vortex durante 3 minutos;
2. Se transfirieron 500 μl de cada muestra a un tubo de 1.5 ml para microcentrífuga;
3. Se centrifugaron los tubos a 13,000 rpm durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante;
4. Se resuspendió el paquete celular (pellet) con 200 μl de solución *Prepman*;
5. Se incubaron los tubos en baño maría a 100 °C por 10 minutos;
6. Se centrifugaron a 13,000 rpm durante 3 minutos;
7. Se recolectaron 200 μl del sobrenadante (ADN extraído).

Método Gene Releaser (método de resina)

1. Se homogeneizaron las muestras en un vortex durante 3 minutos;
2. Se transfirieron 500 µl de cada muestra a un tubo de 1.5 ml para microcentrífuga;
3. Se centrifugaron los tubos a 13,000 rpm durante 10 minutos;
4. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 50 µl de solución amortiguadora (búfer) TE (Tris-base 10mM; EDTA 1mM);
5. Se añadieron 20 µl de solución *Gene Releaser*;
6. La lisis celular y extracción de ADN fueron completadas dentro de un termociclador utilizando el siguiente programa:

65 °C - 30 seg

8 °C - 30 seg

65 °C - 90 seg

97 °C - 180 seg

8 °C - 60 seg

65 °C - 180 seg

97 °C - 60 seg

65 °C - 60 seg

80 °C

7. Se recuperaron 30 µl de los sobrenadantes.

Método DNeasy (método de columnas con membrana)

1. Se homogeneizaron las muestras en un vortex durante 3 minutos;
2. Se transfirieron 500 µl de cada muestra a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml;
3. Se resuspendió el pellet con 180 µl de búfer ATL (Qiagen, R.U.) y 20 µl de Proteinasa-K (20 µl/ml);

4. Los tubos se homogeneizaron y centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos;
5. Se incubaron en baño maría a 55 °C por 10 minutos;
6. Se homogeneizaron y se añadieron 200 µl de búfer AL;
7. Se homogeneizaron inmediatamente después;
8. Se incubaron a 70 °C durante 10 minutos;
9. Se añadieron 200 µl de etanol al 95 % y se homogeneizó la mezcla en un vortex.
10. Se transfirió la mezcla a un tubo de columna con membrana,
11. Se centrifugaron las muestras a 8,000 rpm durante 1 minuto;
12. Se desechó el líquido sobrante y se adicionaron 500 µl de búfer AW1;
13. Se centrifugaron a 8,000 rpm durante 1 minuto;
14. Se desechó el sobrante y se adicionaron 500 µl de búfer AW2;
15. Se centrifugaron a 13,000 rpm durante 3 minutos y se desechó el líquido sobrante;
16. Se transfirieron las columnas a tubos de microcentrífuga de 1.5 ml;
17. Se añadieron 100 µl de búfer AE directamente sobre la membrana;
18. Se incubaron a temperatura ambiente durante 1 minuto;
19. Se centrifugaron a 8,000 rpm durante 1 minuto;
20. Se repitieron los pasos 17 a 19;
24. Se transfirieron 200 µl del sobrenadante a tubos estériles.

Se determinaron las concentraciones de ADN en µg/ml leyendo la absorbancia de los extractos en un espectrofotómetro utilizando una longitud de onda UV de 260-280 nm (A_{260}/A_{280}).

V.2.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Una vez obtenidos los extractos de ADN por medio de los tres métodos anteriormente descritos (sección V.2.1), se comprobó la efectividad de cada técnica mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). La PCR se basa en la amplificación de fragmentos específicos de ADN (i.e. replicación del ADN in-vitro), utilizando la enzima Taq polimerasa sintetizada por la bacteria termoresistente *Thermus aquaticus*, trifosfatos de nucleósido 5' (DNTP's), amortiguadores y oligonucleótidos. Por medio de ciclos térmicos; los oligonucleótidos se alinean en sitios específicos del genoma, al inicio (oligonucleótido *Forward-F*) y al final (oligonucleótido *Reverse-R*) de la secuencia que se quiere amplificar, logrando, mediante la acción de la polimerasa, la replicación de un fragmento de ADN (Mullis *et al.*, 1986; Sambrook *et al.*, 1989; Turner *et al.*, 2000; Sambrook & Russell, 2001;).

Se utilizaron oligonucleótidos universales para el gen 16S ARNr eubacteriano (U2f: GGCGTGCTTAACACATGCAAGTCG; U3r:GCGGCTGGCACGTAGTTAG; (Hykin *et al.*, 1994), el cual es altamente conservado entre los organismos eubacterianos, por lo que es de utilidad para amplificar a todos los géneros bacterianos. El protocolo de PCR se efectuó según el protocolo de Hotstart Taq (Invitrogen, R.U.) para un volumen de reacción de 25 µl. A 3 µl de cada extracto de ADN se añadieron 2.5 µl de Buffer 10 X (concentración final de 1 µM), 2.0 µl de DNTPs (concentración final de 200 µM), 0.75 µl de cada oligo rU2-f y rU3-r (concentración final de 0.3 µM), 0.125 µl de polimerasa Hotstart-Taq (2.5 U/C) y 15.875 µl de agua estéril libre de RNAsas. Se homogeneizó la mezcla gentilmente utilizando la punta de micropipeta. Se realizó la PCR con un ciclo de desnaturalización del ADN a 95 °C durante 15 minutos; 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 90 segundos; seguidos de una fase de extensión final a 72°C por 10 minutos.

Los 18 productos de PCR se tiñeron con Sybr Gold 1X (Molecular Probes, Invitrogen, U.K.), se corrieron en un gel de agarosa al 1 %, utilizando el marcador molecular DNA-ladder (Invitrogen, U.K., 50 pb: 100, 250, 500, 1000 y 2000 pb) y se observaron con un transiluminador de luz ultravioleta (Genoplex, VWR, U.K.). Con base en los productos amplificados, se evidenció que el mejor de los tres métodos de extracción de ADN usados en este estudio fue DNeasy, ya que se obtuvo el fragmento esperado, de 540 pb, en los extractos de la colonia pura y en las diluciones 1:50 y 1:100. Con el método Prepman únicamente se pudo amplificar producto para el extracto de la colonia pura, mientras que con la técnica de GeneReleaser no se amplificó ningún producto para ninguna de las muestras procesadas (Fig. 6).

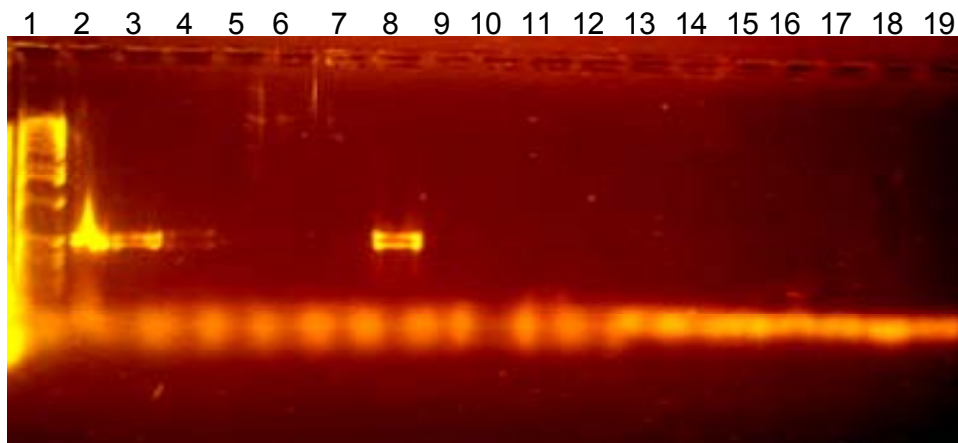


Fig. 6. Gel de agarosa al 1 % en el cual se observan únicamente fragmentos amplificados en el ADN extraído mediante el método de DNeasy: carriles 2 (colonia *E. coli*), 3 (dil 1: 50), 4 (dil 1:100); y Prepman: carril 8 (colonia *E. coli*). En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular (DNA ladder, 50 bp: 100, 250, 500, 1000 y 2000 pb). El tamaño del producto esperado es de 540 pb.

V.2.3. EXTRACCIÓN DE ADN DE LAS MUESTRAS DE SOPLO MEDIANTE EL MÉTODO DE COLUMNAS DNEasy

Una vez comprobada la eficiencia del método con las diluciones de colonias puras de *E. coli*, se realizó la extracción del ADN de las 64 muestras de soplo y las 36 muestras ambientales. Se utilizó el método de columnas con membrana DNeasy estandarizado, como se describió anteriormente (sección V.2.1). Posteriormente, se determinaron las concentraciones de ADN de los extractos en un espectrofotómetro y se obtuvieron lecturas que oscilaron entre 0.1 y 1.2 µg/ml de ADN (A_{260}/A_{280}).

V.2.4. SELECCIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos son secuencias de 15 a 25 pares de bases (purinas: adenina-A y guanina-G; pirimidinas: citosina-C y timina-T) que corresponden a secuencias del fragmento genético que se quiere amplificar con la PCR, y que se encuentran al inicio (*Forward-F*) y al final (*Reverse-R*) de éste. La dirección en la que se alinean al segmento genético va de la posición 3' a 5' en el grupo fosfato de la cadena de ADN, a su vez formada por nucleótidos (base + pentosa + fosfato) (Turner *et al.*, 2000).

Se buscó en la bibliografía la secuencia de oligonucleótidos universales y específicos para la detección de bacterias y hongos. Se utilizaron los oligonucleótidos U2-rU3 (Hykin *et al.*, 1994) mismos que se habían utilizado para amplificar el gen ribosomal 16S durante la comprobación de los tres métodos de extracción de ADN (Sección V.2.2). Estos oligonucleótidos amplifican una región altamente conservada de dicho gen asegurando así su “universalidad”, es decir que dicha región estuviera presente en un mayor número de organismos procariontes. De la misma forma, se seleccionaron oligonucleótidos universales para organismos de reino Fungi que amplifican

una región altamente conservada del gen ribosomal 28S del genoma de hongos y metazoarios (Gargas & de Priest, 1996; Sandhu *et al.*, 1995). Así, en la primera etapa para detectar patógenos en los soplos, se realizaron PCR con los oligonucleótidos universales seleccionados, con la finalidad de realizar los análisis subsecuentes únicamente en aquellas muestras que presentaran ADN bacteriano y fúngico. Las secuencias de los oligonucleótidos universales para hongos y metazoarios se pueden apreciar en la tabla 3.

Tabla 3. Pares de oligonucleótidos universales utilizados en las PCR de hongos. Se muestran las secuencias de cada uno y el producto esperado (pares de bases; pb).

PCR	Oligos	Secuencia <i>f</i>	Secuencia <i>r</i>	pb.
<i>Universal Fungi</i>	PU1/ NS1	ATCAATAAGCGGAGGAAAAG	GTAGTCATATGCTTGTCTC	644
<i>Universal Fungi</i>	28Sf/ 28Sr	GTGAAATTGTTGAAAGGGAA	GACTCCTTGGTCCGTGTT	58

Se realizó una búsqueda bibliográfica de los patógenos respiratorios más relevantes en mamíferos, muchos de ellos zoonóticos (Hugh-Jones *et al.*, 1995; Tryland, 2000; Cowan *et al.*, 2001), que han sido aislados en cetáceos en cautiverio (Dunn *et al.*, 2001; Foster *et al.*, 2002; KuKanich *et al.*, 2004), capturados o varados (Geraci *et al.*, 1999; Buck *et al.*, 2006). La mayoría de los patógenos que se eligieron son oportunistas o forman parte de la flora normal del tracto respiratorio de humanos, como *Streptococcus intermedius* (Konno *et al.*, 2006), mientras que otros son patógenos zoonóticos que pueden ocasionar problemas graves en la salud de humanos y animales, como es el caso del género *Mycobacterium* (Cowan *et al.* 2001; Trevejo *et al.*, 2005; Konno *et al.*, 2006).

Así, se utilizaron oligonucleótidos genéricos para *Streptococcus* spp. (Alber *et al.*, 2004), *Streptococcus* β-hemolíticos del grupo B (Ahmet *et al.*, 1999), *Mycobacterium* spp. y *Mycoplasma* spp.; y oligonucleótidos específicos

para *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pasteurella multocida*; *Moraxella catarrhalis*, y *Haemophilus influenzae* (Tzanakaki *et al.*, 2005). En total, se utilizaron 12 pares de oligonucleótidos para detectar microorganismos respiratorios, los cuales se muestran en la tabla 4, indicando el género microbiano que amplifican, así como el nombre de cada par de ellos, las secuencias forward y reverse y el tamaño del producto esperado (pb).

Tabla 4. Pares de oligonucleótidos utilizados para detectar microorganismos respiratorios en el soplo de cetáceos.

Microorganismo	Oligos	Secuencia f	Secuencia r	Gen	Bp
<i>Haemophilus influenzae</i>	Hib-f /-r	CAAGATACCTTTGGTCGTCTGCTA	TAGGCTCGAAGAATGAGAAGTTG	Hpd	510
<i>Haemophilus influenzae</i>	Bex-f/-r	TATCACACAAATAGCGGTTGG	GGCCAAGAGATACTCATAGAACTT	Bex	181
<i>Mycobacterium</i> spp	Myc14/Myc7	G(AG)TACTCGAGTGGCGAAC	GGCCGGCTACCCGTCGTC	16S ARNr	203
<i>Mycobacterium</i> spp.	PT8/PT9	GTGCGGATGGTCGCAGAGAT	CTCGATGCCCTCACGGTTCA	16S ARNr	541
<i>Mycoplasma</i> spp.	Myc16S-f/-r	CCTATATTATGACGGTACTG	TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCC	16S ARNr	570
<i>Moraxella</i> spp.	Mor-copB-f/-r	GTGAGTGCCGCTTTACAACC	TGTATCGCCTGCCAAGACAA	Cop β	75
<i>Pasteurella</i> spp.	TOXA1-f/-r	CCTAGATGAGCGACAAGG	GAATGCCACACCTCTATAG	Tox A	1420
<i>Streptococcus</i> spp.	DSF 1-f/-r	TGCTAGGTGTTAGGCCCTTT	CTTGCGACTCGTTGTACCAA	16S ARNr	319
<i>Streptococcus</i> β -hemolíticos	DSF2-f/-r	GGCCTAGAGATAGGCTTTCT	CTTGCGACTCGTTGTACCAA	16S ARNr	253
<i>Streptococcus</i> spp.	SodA-f/-r	CAGCATTCTGCTGACATTCGTCA-GG	CTGATCAGCCTTATTCACAACCAGCC	Superox-dism.	234
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	StPn-f/-r	ACGCAATCTAGCAGATGAAGC	TGTTTGGTTGGTTATTCGTGC	Lyt	100
<i>Streptococcus intermedius</i>	BU5/StIn	GTGAATACGTTCCCGGGCCT	AGGATATGGAATTCACCTTTAGTTG	16S ARNr	205

V.2.5. PROGRAMA BLAST

Utilizando el programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, por sus siglas en inglés) con el algoritmo BLASTn para alineación de secuencias de nucleótidos, del Instituto Nacional de Biología de los Estados Unidos de Norteamérica (NCBI; www.ncbi.nih.gov), se verificaron los porcentajes de similitud de los oligonucleótidos con secuencias de microorganismos reportadas en el banco de genes Genbank, así como los tamaños de los productos que amplificarían. Dicho programa está diseñado para encontrar regiones de similitud local entre secuencias de nucleótidos, comparándolas con secuencias de organismos reportadas en la base de datos del banco de genes, y calcula la significancia estadística de las alineaciones realizadas, utilizando un valor esperado probabilístico E (*Expected Value*). Una alineación de secuencia con un valor E igual a 0.05 significa que esa similitud tiene una probabilidad de 5 en 100 (o 1 en 20) de haber sido ocasionada por el azar. Aunque estadísticamente este valor podría ser significativo, es necesario tomar en cuenta otros valores dados por el programa, como el porcentaje de homología de las secuencias y el número de huecos presentes en la alineación (Madden, 2003; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

V.2.6. PCR DE LAS MUESTRAS DE SOPLO

Primero se realizaron PCR en todas las muestras de soplo (n = 64) y muestras ambientales (n= 36), para la detección de ADN eubacteriano con los oligonucleótidos universales U2-rU3 (Hykin *et al.*, 1994). El producto esperado con este juego de oligonucleótidos es de aproximadamente 540 pb. El protocolo de PCR fue el mismo utilizado para la amplificación del ADN obtenido con los diferentes métodos de extracción (Ver sección V.2.2).

PCR múltiples

Aquellas muestras en las que se observó un producto de 540 pb con los oligonucleótidos eubacterianos universales fueron analizadas por medio de PCRs múltiples. Estas reacciones se efectuaron utilizando varios pares de oligonucleótidos genéricos y específicos de géneros bacterianos y los dos juegos de oligonucleótidos universales de hongos. Se prepararon las mezclas de oligonucleótidos añadiendo 10 μ l de cada oligonucleótido (concentración inicial de 10 μ M). La mezcla se ajustó a 500 μ l para obtener una concentración final de 2 μ M.

Se diseñaron 4 PCR múltiples que combinaran los 13 juegos de oligonucleótidos, en función del tamaño de los productos esperados y de las temperaturas de alineación de cada oligonucleótido (Tabla 5). Se utilizó Multiplex-PCR Kit (Qiagen, R.U.), la cual contiene concentraciones estandarizadas de polimerasa Hotstart Taq (25 U/C), $MgCl_2$ (6 mM) y DNTPs (20mM) para la amplificación simultánea de varios productos. Se prepararon reacciones de 14 μ l, que incluían 1.4 μ l de cada mezcla de oligonucleótidos y 5.6 μ l de cada muestra de ADN.

El programa de los PCR múltiples fue semejante al del PCR Universal (Sección V.2.2.), con ligeras variaciones: se aumentó el tiempo de la fase de extensión de 45 segundos a 1:30 minutos, se corrieron 35 ciclos y la temperatura de alineación se ajustó según la agrupación de los oligonucleótidos, conforme a la más baja (Tabla 5).

Tabla. 5. Combinaciones de oligonucleótidos y temperaturas de alineación (Tm) utilizados para las reacciones de amplificación múltiple.

PCR	Oligonucleótidos utilizados	Tm
Whale Path 1	<i>Moraxella</i> spp. (Mor-copB) <i>Streptococcus</i> spp. (Sod A f y r) <i>Streptococcus</i> β -hemolíticos (DSF2-DSF 1) <i>Pasteurella</i> spp. (TOXA 1 f y r)	55°C
Whale Path 2	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus</i> spp. (DSF1 f y r) <i>Mycobacterium</i> spp. (Myc14-Myc7) Fungi universal (PU1-NS1)	53°C
Whale Path 3	Fungi universal (28S f y r) <i>Mycobacterium</i> spp. (PT8-PT9) <i>Haemophilus influenzae</i> (Hib f y r) <i>Mycoplasma</i> spp. (Myc16 f y r) <i>Streptococcus intermedius</i> (BU5-Stln)	53°C
Whale Path 4	<i>Haemophilus influenzae</i> (Hib f y r) <i>Streptococcus. Intermedius</i> (BU5-Stln) <i>Streptococcus</i> β -hemolíticos (DSF2-DSF1) <i>Mycobacteria</i> spp. (Myc14-Myc7)	52°C

PCR individuales

Se corrieron reacciones individuales de las PCR para confirmar los resultados obtenidos durante las reacciones múltiples. Para esto, se utilizaron únicamente los pares de oligonucleótidos que habían amplificado productos del tamaño esperado (Tabla 4).

Así, se buscó confirmar la presencia de *Mycobacterium* spp., *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus* β -hemolíticos, *Streptococcus intermedius* y de hongos ya que los productos de PCR múltiples que se observaron en los geles de agarosa, correspondían al tamaño de los productos esperados para estos patógenos (Tabla 4). El protocolo de PCR se estandarizó para cada par de oligonucleótidos, según el

kit comercial Hotstart Taq (Qiagen, R.U.), siendo el mismo programa utilizado para los PCR universales eubacterianos, pero variando el tiempo y la temperatura de alineación, dependiendo del tamaño del producto esperado y de la secuencia de los oligonucleótidos (Ver Tablas 3 y 4). Específicamente, el tiempo y temperatura de alineación de cada PCR fueron los siguientes para cada par de oligonucleótidos: *Mycobacterium* spp. (Myc 14-7), 45 segundos a 53°C; *Mycobacterium* spp. (PT8-9), 1:00 minutos a 54°C; *Haemophilus influenzae* (Hib), 1:00 minutos a 50°C; *Haemophilus influenzae* (Bex), 30 segundos a 53 °C; *Streptococcus* β-hemolíticos (DSF2-1), 30 segundos a 50 °C; *Streptococcus intermedius* (BU5-StIn), 2:30 min. a 50 °C; Fungi-universal (PU1-NS1), 2:30 min a 44°C; Fungi-universal (28S), 2:30 min a 44°C.

Los PCR individuales para bacterias se hicieron únicamente con las 40 muestras de soplo que amplificaron con los oligonucleótidos universales para el gen 16S de bacterias (U2-rU3). La prevalencia de muestras con presencia de bacterias respiratorias se calculó sobre el número total de muestras recolectadas. Los PCR con oligonucleótidos universales para hongos se corrieron en las 64 muestras recolectadas; sin embargo hubo resultados ambiguos debido a la presencia de bandas con productos en algunos de los controles de agua estéril. Esto pudo deberse a la contaminación del agua utilizada para ajustar los volúmenes de la mezcla para PCR y para los mismos controles, o a una mala manipulación. Por esta razón únicamente se determinaron las prevalencias sobre el número de muestras que se analizaron en los PCRs que no mostraron controles de agua estéril positivos (31 para ballena gris y 9 para ballena azul), y no sobre el total de muestras recolectadas.

Electroforesis

Los productos amplificados con los oligonucleótidos universales, así como con las PCRs múltiples e individuales, se corrieron en una cámara de electroforesis horizontal en geles de agarosa de alto grado molecular (variando en concentración de 0.6 % a 1 %, dependiendo del tamaño de los productos esperados) y teñidos con SYBR-gold a una concentración de 1X (Invitrogen, R.U.). Los geles se visualizaron bajo luz ultravioleta en un transiluminador marca Genoplex (VWR, R.U.).

V.2.7. CLONACIÓN

Fundamento del método

La clonación o sub-clonación es una técnica que se utiliza para generar múltiples copias de un fragmento genético, al insertarlo por acción de la enzima ligasa, dentro de una molécula circular de ADN extracromosomal conocida como plásmido o vector (Turner *et al.*, 2000; Sambrook & Russell, 2001; Brown, 2006). Éste funciona como vehículo y tiene la capacidad de autoreplicarse cuando es incorporado en células huésped viables, también llamadas células competentes, que generalmente son *Escherichia coli*. Las bacterias son tratadas eléctrica o químicamente para que acepten la incorporación del plásmido (Sambrook & Russell, 2001). Ya que el vector contiene una secuencia modular (casete) que codifica para un gen de resistencia a antibióticos y el fragmento de ADN insertado interrumpe el marco de lectura abierto del gen LacZ (productor de la enzima β -galactosidasa), se logra un crecimiento selectivo de *E. coli* en un medio de cultivo con antibiótico y enriquecido con lactosa. Las colonias que hayan incorporado el plásmido con el inserto no degradarán la galactosa, por lo que se observarán blancas mientras que aquellas que solo hayan incorporado el plásmido podrán degradar galactosa y se apreciarán azules (Turner *et al.*, 2000; Sambrook & Russell, 2001; Brown, 2006). De esta forma es posible aislar las colonias deseadas, purificar el plásmido y secuenciar una región que incluya el fragmento clonado. Esta técnica es de particular utilidad

cuando un producto amplificado por PCR es demasiado pequeño para ser secuenciado directamente (≤ 250 pb) (Turner *et al.*, 2000; Brown, 2006).

Clonación de algunos productos de PCR

Se seleccionaron algunos productos positivos de las PCR individuales de hongos (oligonucleótidos universales 28S), y se sub-clonaron mediante el uso de plásmidos con la finalidad de aislar y secuenciar los fragmentos para comprobar su identidad. Esto se realizó ya que en las PCR para detectar hongos se utilizaron oligonucleótidos que amplifican una región altamente conservada del gen ribosomal 28S de hongos y metazoarios, por lo que era posible que el fragmento amplificado representara varios tipos de microorganismos, incluyendo dinoflagelados. Debido al pequeño tamaño del producto esperado en estas PCR (158 pb), no era posible realizar la secuenciación directamente y se recurrió a la clonación para poder secuenciar un fragmento que incluyera los productos amplificados.

Debido a limitaciones de presupuesto y tiempo, se seleccionó un solo producto de PCR, correspondiente a un extracto de soplo de ballena azul para realizar la clonación.

Se utilizó el vector pGEM-TEasy (Promega, U.K.) y células competentes DH5 α (Invitrogen, U.K.), de acuerdo al siguiente protocolo:

1) Ligación:

5 μ l de búfer 2X

1 μ l de vector pGEM (tamaño del vector: 170 pb)

1 μ l de ligasa T4

2 μ l de producto de PCR

1 μ l de agua estéril

Se incubó la ligación a temperatura ambiente durante 2 horas.

2) Transformación de las células competentes y cultivo:

Se centrifugó la ligación brevemente y se descongelaron 100 μ l de células competentes. Una vez descongeladas se añadieron a la ligación y la mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos. Se sometieron a un choque térmico por incubación a 42 °C durante 45 segundos en baño-maría e inmediatamente después se regresaron al hielo durante 2 minutos y se añadieron 800 μ l de medio líquido LB sin antibiótico (\pm 25 °C). Las transformaciones se cultivaron en una incubadora de agitación a 225 rpm, durante una hora a 37°C. Este paso permite la expresión de la resistencia a antibióticos. Posteriormente, cada transformación se sembró en placas de agar LB conteniendo ampicilina(100 μ g/ml) y x-gal(20 μ g/ml) , por medio de una varilla de vidrio acodada, utilizando 20 μ l de la transformación para una placa y 200 μ l para otra. Se incubaron las placas a 37 °C durante 12 horas y se eligieron diez colonias blancas y una azul como control interno. Las colonias seleccionadas se recolectaron con puntas estériles de pipeta y se re-sembraron en placas de agar LB con ampicilina (100mg/L) y x-gal (100mg/L). Con estas mismas puntas se realizó el PCR de colonia.

3) PCR de colonia:

Cada punta de pipeta con la cual se colectó la colonia seleccionada, se mezcló con 2.5 μ l de buffer de PCR 10 X (concentración final de 1 μ M), 0.1 μ l de cada oligonucleótido SP6 y T7 (100 pmol/ μ l), 0.5 μ l de dNTP's (10 mM), 0.1 μ l de enzima polimerasa Hotstart Taq (2.5 U/C) y 21.7 μ l de agua estéril libre de RNAsas. Se homogeneizó la mezcla gentilmente con la punta de micropipeta. La PCR se realizó con un ciclo de desnaturalización del ADN a 95 °C durante 15 minutos; 30 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 55 °C por 30 segundos y 72 °C por 1 minuto; seguidos por una fase de extensión final a 72 °C por 10 minutos.

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1 %. Las colonias blancas debían tener el tamaño esperado de 328 pb (correspondiendo a 170 pb del vector más 158 pb de la secuencia amplificada con la PCR para detección de hongos). Las colonias azules debían tener el tamaño esperado de 170 pb.

Purificación de fragmentos clonados y análisis de secuencias

Los fragmentos clonados se purificaron utilizando el kit de extracción de plásmidos Spin -MiniPrep (Qiagen, R.U.) de acuerdo al siguiente protocolo:

Utilizando un palillo de madera estéril, se recolectaron las colonias que amplificaron el producto esperado a partir de las placas que se habían re-sembrado (Ver en esta sección: *Transformación*). Se resuspendieron las colonias en 3 ml de medio líquido LB con ampicilina y se cultivaron toda la noche a 37 °C. Se transfirieron 1.5 ml de cada cultivo a dos tubos de microcentrifuga y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante, se resuspendieron los paquetes celulares con 250 µl de buffer P1, 250 µl de buffer P2 y se homogeneizaron por inversión; se añadieron 350 µl de buffer N3 e inmediatamente después se homogeneizaron por inversión. Se centrifugaron los tubos a 13,000 rpm durante 10 minutos y los sobrenadantes se centrifugaron en un tubo de columna a 13,000 rpm durante un minuto. Se decantaron los sobrenadantes, se añadieron 75 µl de buffer PB y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 1 minuto. Se desecharon los filtrados y se realizó una nueva centrifugación durante un minuto más para eliminar los residuos del buffer. La membrana se transfirió a un tubo de microcentrifuga y se añadieron 50 µl de buffer TE directamente sobre la membrana antes de centrifugar a 13,000 rpm durante un minuto. Se desechó la membrana y se recuperaron las soluciones de ADN.

Los fragmentos de ADN clonados y purificados se enviaron a secuenciar de manera comercial (Cogenics, U.K.). Una vez obtenidas las secuencias genéticas, se editaron y se analizaron utilizando el programa BLASTn (Ver sección V.2.5.).

V.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Se realizaron cultivos bacteriológicos de algunas de las muestras recolectadas. Para esto se utilizaron medios enriquecidos selectivos para bacterias anaerobias (agar sangre y agar chocolate). En el campo, el hisopo empapado con soplo se frotaba sobre la superficie del agar, con el fin de hacer una descarga masiva. Posteriormente, la siembra se realizó utilizando la técnica tradicional de estría cruzada con un asa estéril (O'Leary, 1990). Las placas de agar sembradas en el campo se incubaron en una caja hermética para crecimiento anaerobio, utilizando dos a tres sobres generadores de CO₂ (Gene Box, Biomerux, Francia) (Fig. 5), a temperatura ambiente y a la sombra, hasta llegar al laboratorio. En caso de observarse un crecimiento excesivo sobre las placas, éstas se resguardaban dentro de la caja hermética, en una hielera, para frenar el crecimiento microbiano. Se sembraron como mínimo dos placas por cada individuo muestreado.

Posteriormente, los cultivos se incubaron a 35 °C durante 48 a 72 horas en el Laboratorio de Microbiología del CICIMAR. Se re-sembraron las colonias que presentaban características distintivas en placas de agar-sangre, y se volvieron a incubar durante 24 a 72 hrs a 35°C. Se realizaron de 2 a 3 re-siembras por cada cultivo hasta lograr aislar las colonias. Una vez aisladas, se analizaron las morfologías colonial y microscópica (tinción de Gram) (O'Leary, 1990). Posteriormente se realizó la identificación taxonómica de las cepas mediante el uso de pruebas bioquímicas tradicionales con el kit BBL Crystal (Becton Dickinson, EEUU). De cada una de las cepas aisladas se tomaron fotografías en el microscopio compuesto, se recolectaron las biomasas bacterianas de cada muestra y se congelaron para analizarlas por métodos moleculares. Se hizo la extracción de ADN de las biomasas por medio de método comercial DNEasy (Qiagen, U.K. Ver sección V.2.1). Estos cultivos tuvieron como objetivo caracterizar la fracción microbiana cultivable y compararla con aquella caracterizada con técnicas moleculares.

V.4. EXÁMENES COPROPARASITOSCÓPICOS

Se analizaron en total 30 muestras de heces, 27 provenientes de ballena azul y 7 de ballena de aleta, por medio de examen macroscópico y microscópico.

V.4.1. EXÁMEN MACROSCÓPICO

El proceso de filtración de heces para la detección de helmintos adultos se llevó a cabo en el Laboratorio de Mamíferos Marinos del CICIMAR-IPN, utilizando la metodología para la identificación de remanentes duros en las heces de cetáceos (Mejía-Acosta, 2003). De cada muestra, una fracción de aproximadamente 1/3 del volumen original se paso a través de una columna de tamices metálicos (VWR Scientific, EEUUA) de 2 mm, 1 mm y 106 μm de luz de malla, se agitó vigorosamente, se vertió agua filtrada sobre la materia orgánica y los elementos remanentes en cada uno de los tamices se separaron para ser observados bajo un microscopio estereoscópico marca Olympus. Cada helminto fue medido, fotografiado con una cámara digital y preservado en etanol al 70 % (Alba, 1994; Méndez, 2002).

V.4.2. EXÁMEN MICROSCÓPICO

Con la finalidad de detectar huevos de helmintos (nemátodos y tremátodos) en las heces, se utilizó la técnica de sedimentación y concentración de Ritchie (Alba, 1994). En la primera fase del análisis se siguió la técnica de la manera descrita para muestras fijadas en formol, adaptándola a muestras fijadas en etanol (técnica descrita en detalle abajo). Posteriormente, la técnica se estandarizó para heces de cetáceos recolectadas en el mar, mediante una serie de experimentos debido a que las características de las muestras impedían el correcto desempeño del método convencional. El análisis microscópico se llevó a cabo en el Laboratorio de Química Orgánica y las observaciones al microscopio se hicieron en el Laboratorio de Fitoplancton (CICIMAR-IPN).

Fundamento de la técnica

La técnica de Ritchie es un método coproparasitoscópico cualitativo de sedimentación y concentración, por lo que es útil únicamente para detectar huevos de helmintos y no sirve para estimar el número de huevos por gramo de heces ni el grado de parasitismo. Las muestras se consideran “positivas” al detectar un solo huevo en las preparaciones. Es un método utilizado rutinariamente para la detección de huevos y larvas de algunos helmintos gastrointestinales (principalmente nemátodos y tremátodos), pero no de las fases adultas de dichos parásitos; y también es útil para la detección de fases quísticas de protozoarios (Alba, 1994; Navone *et al.*, 2005). Consiste en concentrar los huevos de helmintos en el fondo de la muestra, mientras que los detritos orgánicos y la grasa son separados en la superficie, por medio de centrifugaciones y cambios en la densidad. Ya que los huevos de helmintos tienen un peso específico mayor al del agua destilada (1.115 a 1.145 vs. 1.00), es posible precipitarlos al fondo utilizando soluciones salinas hipotónicas. Se ha demostrado que se obtienen mejores resultados y una mayor concentración con esta técnica que con otras técnicas de sedimentación como la de Charles-Barthelemy o la técnica de flotación de Willis (Navone *et al.*, 2005).

Primera fase – técnica convencional

Con la finalidad de probar la técnica de Ritchie convencional en este tipo de muestras, se comenzó por analizar 14 muestras de heces (12 de ballena azul y 2 de ballena de aleta) recolectadas en 2006 y 2007, con dicha metodología (Tabla 2, sección V.1.4.):

Cada muestra se homogenizó por agitación manual y se tomó una alícuota de aproximadamente 30 ml. Después de mantener la muestra en reposo en un frasco de plástico durante 30 a 60 minutos, se decantó el sobrenadante y el sedimento se filtró en un embudo a través de una gasa doblada en cuatro. El sedimento filtrado se vació en un tubo de vidrio de 15 ml para centrifuga clínica, hasta llenar un poco menos de

un tercio del tubo (aproximadamente 4 ml) y se re-suspendió con solución salina fisiológica (SSF) al 0.85 % hasta llenar el tubo (a 2 o 3 mm de la orilla). La muestra se homogeneizó y centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos en una centrífuga clínica (S y M Laboratorios, México). Se decantó el sobrenadante y se repitió este procedimiento de 2 a 4 veces, hasta que éste se tornó transparente. Se realizaron estos lavados para reducir al mínimo el etanol de las muestras. Después de decantar el sobrenadante en el último lavado, se re-suspendió el sedimento con formaldehído al 10 % hasta completar 6.5 ml de suspensión. Se añadieron 7 ml de solución salina (0.85 %) y 1 ml de éter anhidro (al 100 %). Se dejó reposar la suspensión durante 3 minutos y se homogeneizó mediante agitación. Finalmente la muestra se centrifugó a 1500 rpm durante 2 minutos.

En todos los casos se observó una clara separación entre las fases presentes, el sedimento al fondo del tubo, el formol y la solución salina en medio y el anillo de éter en la superficie, junto con una película de grasa y detritos orgánicos de color amarillo a marrón (Fig. 7). Se decantó el líquido y se agregó 1 ml de solución salina al sedimento. Previa homogenización por agitación, se tomó una gota de la muestra con una pipeta Pasteur. La muestra se colocó sobre un porta-objetos, se le añadió una gota de lugol y se cubrió con un cubre-objetos.

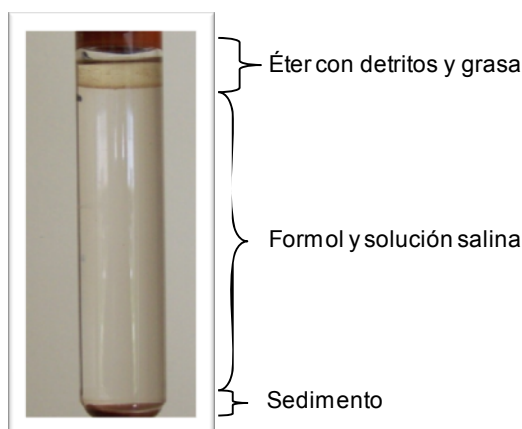


Fig. 7. Fotografía del último paso de la técnica de Ritchie, previo al decantado. Se observa la separación de los 3 estratos: sedimento, formol con solución salina fisiológica y éter con detritos y grasa en la superficie.

Las preparaciones se revisaron con el microscopio de contraste de fases (Olympus CH-2), realizando barridos con los objetivos 20 X, 40 X, y 100 X (este último al detectar huevos de helmintos). Los huevos se midieron con la regla micrométrica del ocular y se fotografiaron para su posterior descripción (Cámara del microscopio Olympus 336304; se usaron rollos Kodak a color, asa 400). Las estructuras de identificación que se buscaron en los preparados variaban en forma desde esféricas hasta ovoides o fusiformes, de color café claro, pardo, dorado o translúcido, entre 10 y 80 μm de diámetro, envueltas por una membrana y en su interior presentaron material granulado o una larva enrollada.

Segunda fase – estandarización de la técnica

Con el objetivo de eliminar la mayor cantidad de material fecal en los preparados y concentrar un mayor número de huevos en el sedimento, se realizaron cambios a la técnica de Ritchie. Se analizaron las muestras recolectadas en los años 2006, 2007 y 2008. Se volvieron a analizar las muestras examinadas con el método convencional, excepto una de ellas que había resultado positiva con dicha técnica (Tabla 2, sección V.1.4.).

Se incrementó el volumen filtrado a 80 ml, previa homogeneización. De ser necesario se utilizó un agitador de vidrio para deshacer los trozos compactos de heces y homogeneizar la muestra en su totalidad. Para reducir la pérdida de huevos de helmintos que pudieran haber flotado debido a la salinidad del agua marina en la que se encontraban las muestras al ser recolectadas, se procedió a filtrar la alícuota a través de un tamiz de poro de nylon de 100 micras unido a un embudo. El líquido filtrado fue recolectado en un matraz Erlenmeyer de vidrio (Fig. 8). En los casos en los que los poros del tamiz eran bloqueados por las partículas fecales, se añadió solución salina (0.85 %) mediante una piseta para acelerar el filtrado. Con esta técnica se recuperaron en promedio 50 ml del líquido filtrado, el cual se homogeneizó y se depositó en tres tubos de vidrio de 15 ml, los cuales se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos y se decantaron para conservar el sedimento. El remanente del

filtrado original se conservó para análisis posteriores. El sedimento obtenido por la centrifugación se re-suspendió con solución salina, se homogeneizó y centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos. Este paso se repitió de dos a tres veces, hasta que el sobrenadante se apreció transparente. El sedimento fue decantado y resuspendido con 6.5 ml de formaldehído al 10 %. Se agregaron 7 ml de solución salina y 1 ml de éter anhidro (al 100 %). Las muestras se homogeneizaron lentamente por inversión, se dejaron reposar 5 minutos y se centrifugaron a 2000 rpm durante 3 minutos. Se decantó el sobrenadante dejando únicamente el sedimento concentrado en el fondo del tubo y éste se re-suspendió con 1 ml de solución salina. Se tomaron dos gotas de cada tubo, previa homogeneización y se colocaron en un portaobjetos. A cada una se le añadió una gota de lugol. Se cubrieron las gotas con cubreobjetos y se hicieron las observaciones (en total 6 observaciones por muestra de heces examinada) en el microscopio de contraste de fases de la forma anteriormente descrita en esta sección.



Fig. 8. Fotografía del proceso de filtración de muestras de heces con tamiz de nylon de 100 micras (Modificación a la técnica de Ritchie).

V.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para todos los análisis se determinó la prevalencia de patógenos (microorganismos o parásitos) detectados en las muestras por cada especie, así como en las muestras ambientales, en el caso de los soplos. La prevalencia se usó como un índice para determinar la proporción de muestras o individuos infectados y se expresó en porcentaje (Zar, 1996):

$$P = \frac{hi \cdot 100}{ht}$$

Donde:

P = prevalencia

hi = número de muestras con determinado patógeno

ht = número total de muestras

Con base en todas las prevalencias calculadas se realizaron gráficas de columnas para mostrar los porcentajes de patógenos detectados y se calculó el error estándar para cada una de las prevalencias, utilizando la siguiente fórmula:

$$E.E (\%) = \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$$

Donde:

$E.E. (\%)$ = error estándar, expresado en porcentaje

p = proporción de muestras con el patógeno (equivalente a la prevalencia, expresada de 0 a 1)

n = número total de muestras

Para comparar las prevalencias de patógenos y determinar si había diferencias significativas entre las especies estudiadas, así como entre cada especie y las muestras ambientales; se realizaron tablas de contingencia de 2 x 2, con las frecuencias de cada patógeno detectado. Se emplearon pruebas no paramétricas de comparación de proporciones entre dos poblaciones, debido a que el tamaño de muestra fue pequeño y que las variables a comparar fueron cualitativas y los datos fueron binomiales, es decir de presencia-ausencia. Se empleó la prueba de χ^2 (Ji-cuadrada) en todos los casos, y sólo cuando alguna de las frecuencias dentro de la tabla era menor a cinco, se empleó la prueba exacta de Fisher, la cual es una prueba equivalente a la χ^2 pero ajustada para datos menores. En ambos casos los grados de libertad fueron iguales a uno, el valor de significancia α fue 0.05, por lo que el valor crítico fue: 3.841 (Zar, 1996). Para realizar ambas pruebas estadísticas se empleó el programa en línea de SISA (Simple Interactive Statistical Analysis: <http://www.quantitativeskills.com/sisa/>), con el cual se obtuvieron los valores de χ^2 y de significancia p .

VI. RESULTADOS

VI. 1. EVALUACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE MUESTREO DE SOPLOS

Tanto el panel extensible como el helicóptero fueron utilizados con éxito para obtener muestras de soplo de ballena gris y ballena azul. Sin embargo, ambas técnicas de muestreo presentaron ventajas y desventajas que se muestran en la tabla 6.

El método de panel extensible fue el más adecuado para recolectar muestras de soplo de ballena gris. Esto fue debido a que el comportamiento amistoso de esta especie en las lagunas de reproducción permitía un mayor acercamiento a los animales y la manipulación del panel era logísticamente más sencilla dentro de la embarcación pequeña que el uso del helicóptero de control remoto.

El helicóptero resultó más eficaz para muestrear ballena azul, una especie que normalmente no permite un acercamiento de las lanchas. Sin embargo, utilizando el viento a nuestro favor fue posible recolectar los soplos de esta especie con el panel de manera exitosa. De manera excepcional e inesperada, ya que no es su área de agregación, se muestrearon dos ballenas grises en el Golfo de California. Una de las ballenas fue muestreada exitosamente utilizando el método de helicóptero de control remoto (Ver tabla 1, sección V.1.4).

Tabla 6. Ventajas y desventajas de las dos técnicas de muestreo de soplos de cetáceos.

Técnica	Ventajas	Desventajas
Panel extensible	<p>Permitió el muestreo de soplos desde una distancia corta.</p> <p>Técnica sencilla; no requirió equipo ni personal entrenado.</p> <p>Relativamente económico. Costo aproximado del equipo de muestreo: \$ 500 pesos.</p> <p>Fácil de diseñar.</p>	<p>No puede utilizarse para obtener muestras de animales que mantienen su distancia de la embarcación de muestreo (> 20 m).</p>
Helicóptero	<p>Permite obtener muestras de soplo de animales que se encuentran a una distancia mayor de la embarcación de muestreo (hasta 60 m).</p>	<p>No es práctico para el muestreo de cetáceos a una menor distancia.</p> <p>Requiere de una embarcación más grande que cuente con plataforma de aterrizaje.</p> <p>Requiere de personal capacitado.</p> <p>Costoso. Costo del helicóptero y equipo asociado: \$ 20,000 pesos</p>

VI. 2. ANÁLISIS MOLECULARES

VI.2.1. PCRs CON OLIGONUCLEÓTIDOS UNIVERSALES PARA EUBACTERIAS

Se detectó ADN eubacteriano en el 62.5 % (40) de las 64 muestras de soplo, y el 77.5 % de éstas provenían de ballena gris. Veinticinco de las 36 muestras ambientales recolectadas (representando el 69.4 %) también presentaban ADN eubacteriano (Fig. 9). No se encontraron diferencias significativas en la presencia de ADN eubacteriano entre las muestras de soplos de ambas especies y las muestras ambientales ($\chi^2 = 0.488$, $p = 0.4846$).

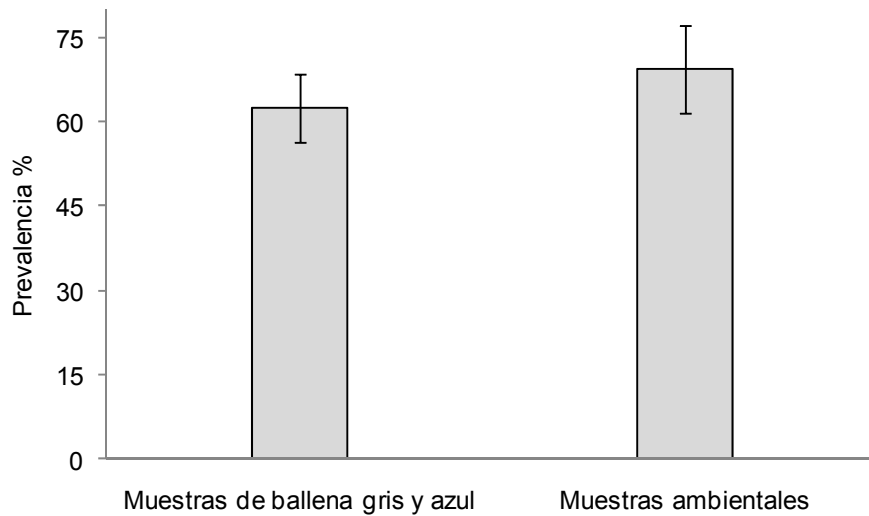


Fig. 9. Prevalencia de ADN eubacteriano en las muestras de soplo de ambas especies y muestras ambientales detectado por medio de PCR. Las barras de error muestran ± 1 de E.E.

De las muestras de ballena gris, el 72.1 % presentó ADN eubacteriano, mientras que para las ballenas azules, el 42.9 % resultaron positivas. Se encontraron diferencias significativas en la presencia de ADN eubacteriano entre las muestras de ballena gris y las de ballena azul ($\chi^2 = 5.146$, $p = 0.0233$) (Fig. 10).

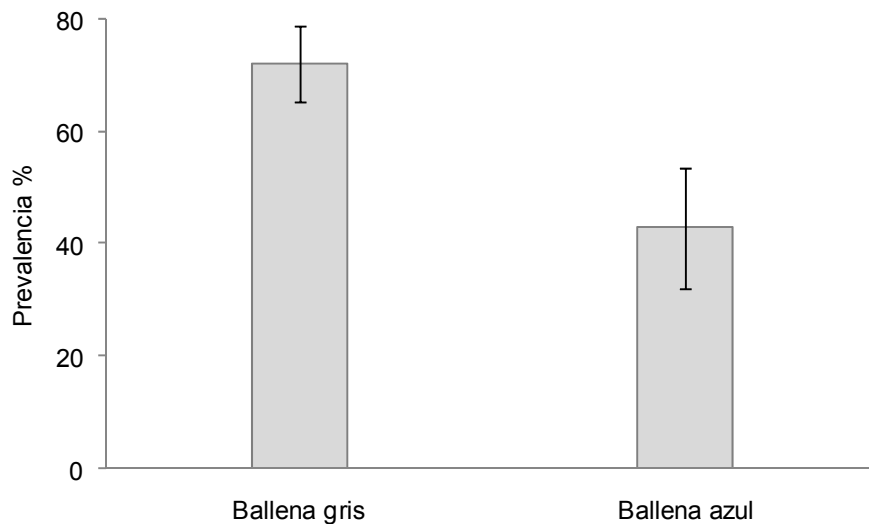


Fig. 10. Prevalencia de ADN eubacteriano en las muestras de soplo de ballenas grises y ballenas azules detectado por medio de PCR. Las barras de error muestran ± 1 de E.E.

VI.2.2. PCRs MÚLTIPLES

Mediante el uso de reacciones de amplificación múltiples, se encontraron uno o más microorganismos respiratorios en 25 (62.5 %) de las muestras de soplo que contenían ADN eubacteriano. Diecinueve de estas muestras (76 %) eran de ballena gris.

En las muestras de ballena gris se amplificaron fragmentos de tamaños esperados para *Mycobacterium* spp. en poco más de la mitad de las muestras (53.5 %), mientras que *Streptococcus* β -hemolíticos, *Haemophilus influenzae*, hongos y *Streptococcus intermedius* se encontraron en menor frecuencia. En las muestras de soplo de ballena azul se observaron productos esperados para hongos (23.8 %), *Mycobacterium* spp. (19.0 %) y *Haemophilus influenzae* (14.3 %), mientras que ninguna muestra amplificó los productos esperados para *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* spp., *Streptococcus intermedius*, *Moraxella catharralis*, *Pasteurella multocida* y *Mycoplasma* spp. (Fig. 11).

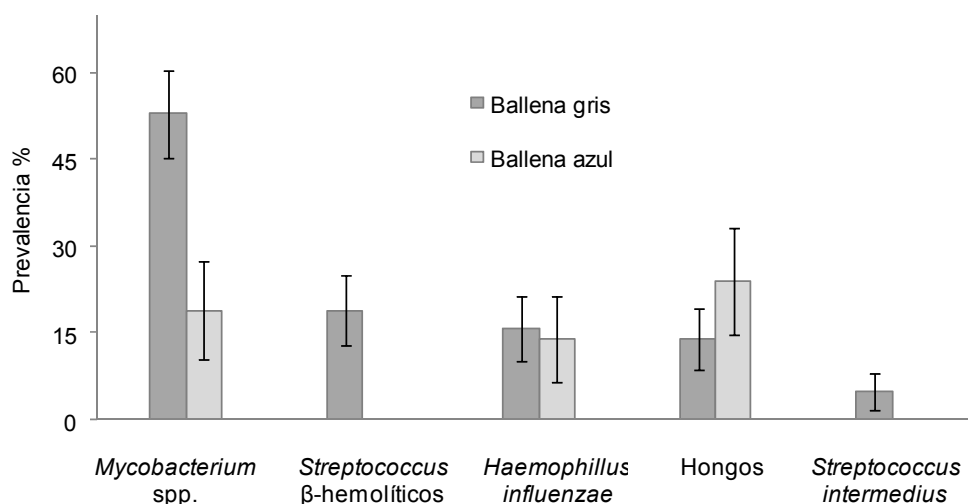


Fig. 11. Prevalencia de microorganismos respiratorios detectados en soplos de ballena gris y ballena azul por medio de PCR múltiples (Resultados preliminares). Las barras de error muestran ± 1 de E.E.

Para descartar que la presencia de estos microorganismos en las muestras se debiera a contaminación ambiental, se corrieron las reacciones múltiples en las muestras ambientales en las que se había encontrado la presencia de ADN eubacteriano (Ver sección VI.2.1). Ninguna de estas muestras amplificó productos esperados para los patógenos seleccionados por medio de los PCR múltiples.

A pesar de amplificar los productos arriba mencionados, era posible observar también un número de bandas que no correspondían en tamaño a ninguno de los productos esperados (Fig. 12). Esto puso en duda los resultados de las PCRs múltiples, ya que existía la posibilidad de que los cuatro o cinco pares de oligonucleótidos presentes en cada reacción múltiple amplificaran productos inespecíficos entre ellos (Ver detalles en la tabla 7). Esta suposición fue confirmada al observar que las muestras de ADN de las biomasas bacterianas cultivadas a partir de algunas muestras de soplo e identificadas previamente por métodos bioquímicos y morfológicos (Ver siguiente sección VI.3) también amplificaron fragmentos de tamaños no esperados (Fig. 12)

Tabla 7. Productos esperados y productos inespecíficos amplificados para cada reacción múltiple (pb: pares de bases). Se indica el número de bandas que presentaron dichos productos inespecíficos.

Multiplex	Oligonucleótidos	Producto esperado (pb)	Productos inespecíficos (pb)	Bandas
Whale Path 1	Mor-copB	75	500	3
	Sod A	234		
	DSF2-1	253		
	TOXA 1	1420		
Whale Path 2	StPn	100	250	5
	DSF 1	319	800	1
	PT8-9	541	2000	1
	PU1-NS1	1644		
Whale Path 3	28 S	158	350	4
	Myc 14-7	203	600	2
	Hib	510	700	1
	Myc 16	570	1500	2
	BU5-StIn	270	1700	1
			1900	1
Whale Path 4	Hib	510	1000	2
	BU5-StIn	270	1200	2
	DSF2-1	253	1500	3
	Myc 14-7	203		

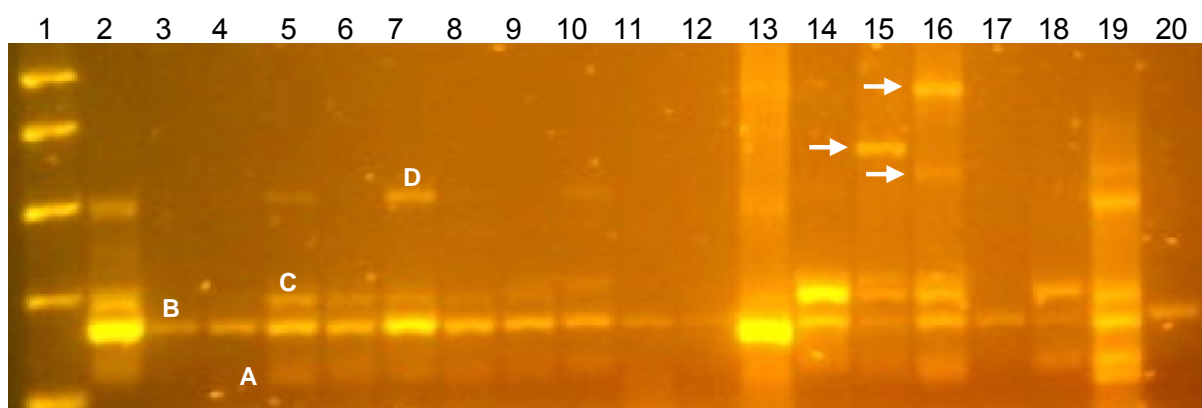


Fig. 12. Fotografía de un gel de agarosa donde se observan los fragmentos amplificados mediante el PCR múltiple “Whale Path 3”. **A.** Bandas esperadas para hongos y metazoarios (oligonucleótidos 28S, ~158 pb). **B.** *Mycobacterium* spp. (oligonucleótidos Myc 14-7, ~203 pb). **C.** Bandas esperadas para *Streptococcus intermedius* (oligonucleótidos BU5- StIn, ~270 pb). **D.** Bandas esperadas para *Haemophilus influenzae* (oligonucleótidos Hib ~510 pb). Las flechas indican algunas de las bandas con productos inespecíficos de aproximadamente 600, 700 y 1500 pb. En el primer carril está el marcador molecular (50 bp: 100, 250, 500, 1000 y 2000 pb). Las muestras de ballena azul y ballena gris están en los carriles 2 a 12 y las muestras de las biomasas cultivadas en los carriles 13 a 19.

VI.2.2.1. Interpretación de los resultados preliminares

Para confirmar la presencia de los microorganismos e investigar la causa de la presencia de bandas inespecíficas en los PCR múltiples, se buscaron similitudes de las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en las reacciones con regiones del genoma de otros microorganismos reportados en la base de datos de GenBank. Se realizó una búsqueda de similitud mediante el programa BLASTn (Ver sección V.2.5.), en primera instancia buscando similitud con toda la lista de microorganismos (bacterias u hongos) reportados en el banco de genes. Posteriormente se limitó la búsqueda a los géneros microbianos incluidos en este estudio. En la tabla 8 se muestran los resultados de dichas alineaciones que incluyen las secuencias con porcentajes de similitud más altos, valores E más bajos y que no presentaron huecos en las secuencias alineadas. Se descartaron los microorganismos que no mostraron valores estadísticamente significativos a la alineación (Ver sección V.2.5.).

Tabla 8. Resultados del análisis con BLASTn para verificar los productos que podrían ser amplificados por los juegos de oligonucleótidos de cada PCR múltiple. Se indican los microorganismos con los que se alineó cada juego de oligonucleótidos, así como el porcentaje de similitud y los valores E de las alineaciones. En negritas se indican los tamaños de los productos diferentes a los esperados (pb: pares de bases).

<i>WhalePat</i>	Oligonucleótidos	Microorganismos	Similitud	E	Pb	
1	Mor-copB	<i>Moraxella catharrallis</i>	100	0.014	75	
	SodA	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>equi</i>	100	4e-05	234	
		<i>S. equi</i> subsp. <i>Zooepidemicus</i>	100	4e-04	234	
	DSF2-1		<i>Streptococcus agalactiae</i>	100	0.008	253
			<i>Streptococcus phocae</i>	100	1e-07	253
			<i>Streptococcus diffcilis</i>	100	0.041	253
			<i>Streptococcus porcinus</i>	100	0.041	253
			<i>Streptococcus pseudoporcinus</i>	100	0.041	253
	TOXA 1	<i>Pasteurella multocida</i>	100	7e-04	1420	
	2	StPn	<i>Streptococcus pneumonia</i>	100	0.015	70
DSF1		<i>Streptococcus sanguinis</i>	100	4e-04	319	
		<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	100	4e-04	319	
		<i>Streptococcus parauberis</i>	100	4e-04	319	
PT8-9		<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	100	0.008	541	
		<i>Mycobacterium bovis</i>	100	0.008	541	
		<i>Mycobacterium microti</i>	100	0.008	541, 1198	
PU1-NS1		<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	0.002	1644	
		<i>Aspergillus. Terreus</i>	100	0.003	1644	
3	28S	<i>Aspergillus niger</i>	100	0.011	257	
		<i>Cryptococcus neoformans</i>	100	0.002	283	
		<i>Cryptococcus spp.</i>	100	0.003	330	
		<i>Candida glabrata</i>	100	0.003	268	
		<i>Penicillium spp.</i>	100	2e-04	357	
		<i>Capitella capitata</i>	100	8e-04	283	
		<i>Gymnodium spp.</i>	100	05e-04	281	
		<i>Prorocentrum spp.</i>	100		281	
		Myc 14-7	<i>Corynebacterium kutscheri</i>	100	2e-05	203
	<i>Mycobacterium spp.</i>		100	0,005	203	
	<i>Mycobacterium gordonae</i>		94	0.008	203	
	<i>Mycobacterium intracellulare</i>		100	6e-05	203	
	Myc16	<i>Mycoplasma agarizzi</i>	100	0.041	570	
	Hib	<i>Haemophilus influenzae</i>	100	1e-04	150, 510	
	BU5-Stln	<i>Streptococcus intermedius</i>	100	1e-04	270	

Mediante las alineaciones con BLASTn, se observó que los pares de oligonucleótidos amplificarían únicamente los productos esperados, a excepción de Myc14-7 y 28S, que además de amplificar las secuencias esperadas, amplificarían otros organismos filogenéticamente relacionados. Los pares de oligonucleótidos Myc14-7 amplificarían a *Corynebacterium kutscheri*, además de varias especies de mycobacterias; mientras que el juego de oligonucleótidos 28S no solo amplificaría a

un gran número de géneros de hongos (*Aspergillus niger*, *Cryptococcus* spp., *Penicillium* spp., *Candida glabrata*, entre otros), sino también a algunos metazoarios (i.e. el gusano poliqueto: *Capitella capitata*) y dinoflagelados marinos (*Prorocentrum* spp. y *Gymnodium* spp.) (Ver tabla 8).

Por otro lado, para algunos de los pares de oligonucleótidos se observó que, si bien amplificaban a los microorganismos esperados, los fragmentos amplificados serían de tamaños distintos a los reportados. Tal fue el caso para los pares de oligonucleótidos StPn, 28S, PT8-9 y Hib (Ver tablas 7 y 8).

Mediante las alineaciones en BLASTn, no se encontró evidencia de que el ar de oligonucleótidos 28S utilizados en el PCR múltiple “Whale Path 3” para detectar hongos pudieran amplificar el producto de 158 pb reportado por Sandhu *et al.* (1995); por lo que se deduce que los fragmentos de este tamaño corresponderían probablemente a productos inespecíficos provocados por una baja temperatura de alineación. Sin embargo, las bandas de aproximadamente 350 pb que se observaron en algunas de las muestras amplificadas con este programa (“Whale Path 3”), sí podrían corresponder a productos de hongos, ya que los oligonucleótidos 28S alinean sin ambigüedad con el gen ribosomal 28S de varias especies de *Penicillium* (~357 pb), y de *Cryptococcus* (~330 pb) (Tabla 8).

No se encontraron más productos que pudieran corresponder a las bandas de tamaño no esperado, por lo que es altamente probable que éstas se debieran a alineaciones entre los pares de oligonucleótidos de distintos juegos amplificando productos no específicos. Se podría haber revisado esto mediante alineaciones con BLASTn realizando todas las combinaciones posibles entre los oligonucleótidos de distinto par, sin embargo hubiera tomado demasiado tiempo revisar un número tan grande de combinaciones; por lo que resultó más práctico confirmarlo por medio de PCR individuales.

VI.2.3. PCRs INDIVIDUALES DE BACTERIAS RESPIRATORIAS Y DE HONGOS

Ninguna muestra amplificó productos esperados para *Mycobacterium* spp. con los oligonucleótidos PT8-9 y Myc 14-7, ni para *Haemophilus influenzae*, con los oligonucleótidos Hib (f y r) y Bex (f y r). Esto confirmó que las bandas observadas como “positivas” a ambas bacterias en los PCRs múltiples correspondieron a productos inespecíficos. Estos podrían haber sido ocasionados por alineaciones no esperadas de diferentes pares de oligonucleótidos dentro de la reacción múltiple o por una temperatura de alineación demasiado baja.

Streptococcus β -hemolíticos

Se amplificaron productos esperados para *Streptococcus* β -hemolíticos, utilizando los oligonucleótidos DSF2-1, en 11 muestras de ballena gris (25.6 %) y en 7 muestras de ballena azul (33.3 %) (Figs. 13 y 14). Ninguna muestra ambiental amplificó productos esperados para este grupo bacteriano. Al realizar el análisis con BLASTn, se pudo comprobar que los oligonucleótidos DSF2-1 alinean con 100 % de similitud con el genoma varias especies de *Streptococcus* β -hemolíticos, tales como: *Streptococcus agalactiae* (E = 0.08), *S. phocae* (E = 1e-07), *S. difficilis* (E = 0.041), *S. porcinus* (E = 0.041) y *S. pseudoporcinus* (E = 0.041) (Ver tabla 8). En la tabla 9, más adelante, se indican las frecuencias de este grupo bacteriano en las muestras de sople de cada especie y en las muestras ambientales.

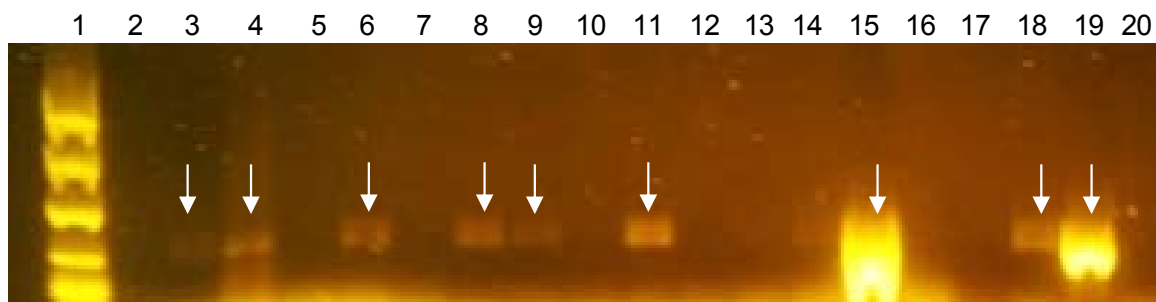


Fig. 13. Fotografía de uno de los geles de agarosa en donde se observan algunas de las bandas fluorescentes de aproximadamente 253 pb con productos esperados para *Streptococcus* β -hemolíticos (oligonucleótidos DSF2-1), en algunas muestras de soplos de ballena gris (carriles 2-14) y de ballena azul (carriles 15-20). El primer carril corresponde al marcador molecular (50 pb: 100, 250, 500, 1000 y 2000 pb).

No se encontraron diferencias significativas entre las proporciones de ballenas grises y ballenas azules infectadas con *Streptococcus* β -hemolíticos ($\chi^2 = 0.419$, $p = 0.5172$) (Fig. 14).

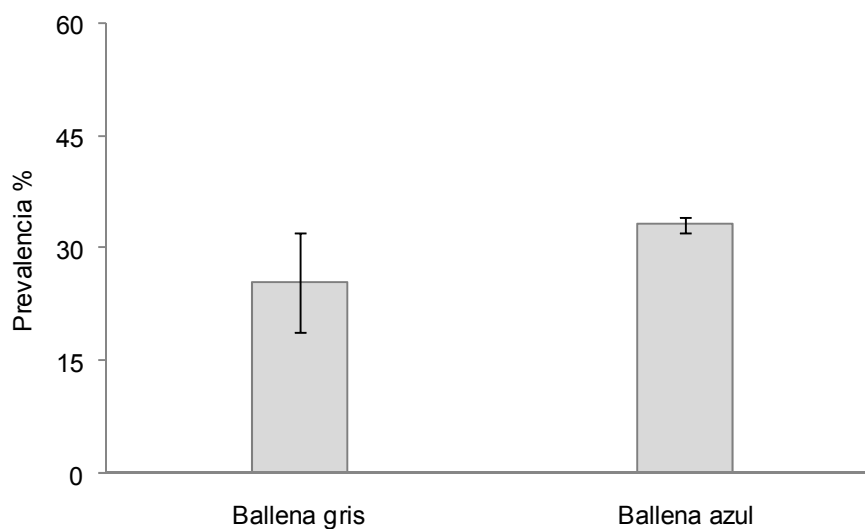


Fig. 14. Prevalencia de muestras con *Streptococcus* β -hemolíticos en ballena gris y ballena azul. Las barras de error muestran ± 1 de E.E.

Streptococcus intermedius

De las muestras de soplo de ballena gris, cinco (11.6 %) amplificaron productos esperados para *Streptococcus intermedius*, mientras que ninguna muestra

de ballena azul y ninguna muestra ambiental mostró evidencia molecular de este microorganismo (Figs. 15 y 16). En la tabla 9 se indican las frecuencias de esta bacteria en las muestras de soplo de cada especie y en las muestras ambientales.

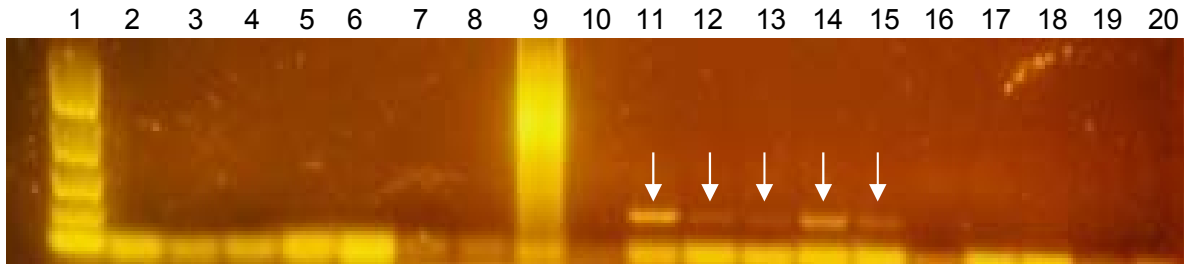


Fig. 15. Fotografía del gel de agarosa donde se observan las cinco bandas fluorescentes de aproximadamente 270 pb. de productos amplificados de *Streptococcus intermedius* en soplos de ballena gris (carriles: 2-16 de los cuales, positivos: 11-15). Las muestras de ballena azul (carriles: 17-20) no amplificaron producto. El primer carril corresponde al marcador molecular (50 pb: 100, 250, 500, 1000 y 2000 pb).

Se encontraron diferencias significativas entre las proporciones de ballenas grises y ballenas azules con *Streptococcus intermedius* ($\chi^2 = 4.1811$, $p = 0.0408$) (Fig. 16).

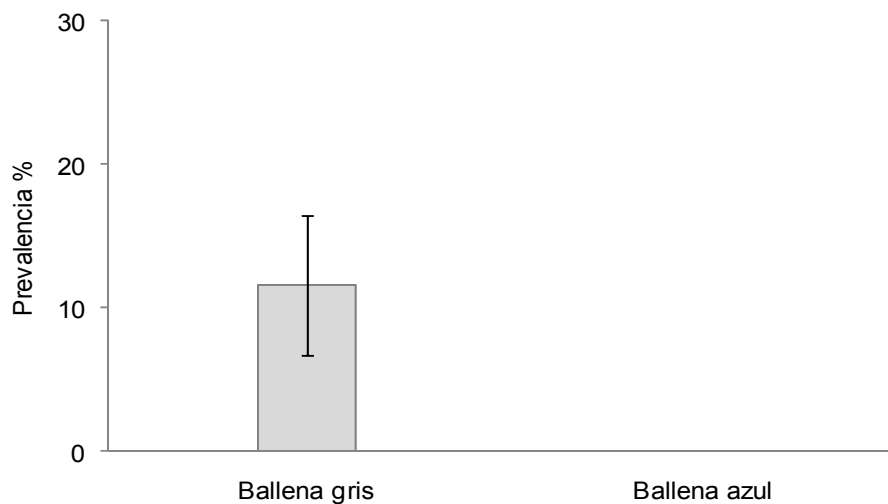


Fig. 16. Prevalencia de muestras con *Streptococcus intermedius* en ballena gris y ballena azul. Las barras de error muestran ± 1 de E.

Prevalencia de bacterias en las muestras de soplo y en las muestras ambientales

Los análisis moleculares indicaron que de las 43 muestras de soplo de ballenas grises, 14 (32.6 %) presentaron de una a dos de las bacterias respiratorias buscadas (diferentes especies de *Streptococcus* β -hemolíticos y *Streptococcus intermedius*) mientras que 17 muestras (39.5 %) presentaron ADN eubacteriano que no correspondió a ninguna de las bacterias seleccionadas para este estudio y 12 (27.9 %) no presentaron evidencia de ADN eubacteriano (Fig. 17).

De las 21 muestras de soplo de ballenas azules, siete (33.3 %) amplificaron una o dos de las bacterias buscadas (diferentes especies de *Streptococcus* B-hemolíticos) mientras que dos (9.5 %) presentaron ADN de bacterias pero éstas no pudieron ser identificadas. Doce muestras (57.1 %) no presentaron evidencia de ADN eubacteriano (Fig. 17).

De las 36 muestras ambientales recolectadas, 25 (69.4 %) amplificaron ADN eubacteriano. Sin embargo, en ninguna de ellas se encontraron las bacterias respiratorias encontradas en las muestras de soplo de ballena (Fig. 17). En la tabla 9 se muestran las frecuencias de bacterias respiratorias presentes en las muestras de soplo de cada especie y en las muestras ambientales.

Tabla 9. Muestras de soplo y ambientales con bacterias respiratorias y bacterias no identificadas. Se muestra el número de muestras y la frecuencia entre paréntesis.

	Ballena gris (n=43)	Ballena azul (n=21)	Ambientales (n=36)
<i>Streptococcus</i> β -hemolíticos	11 (0.26)	7 (0.33)	0
<i>Streptococcus intermedius</i>	5 (0.12)	0	0
Bacterias respiratorias	14 (0.33)	7 (0.33)	0
Bacterias no identificadas	17 (0.4)	2 (0.09)	25 (0.69)

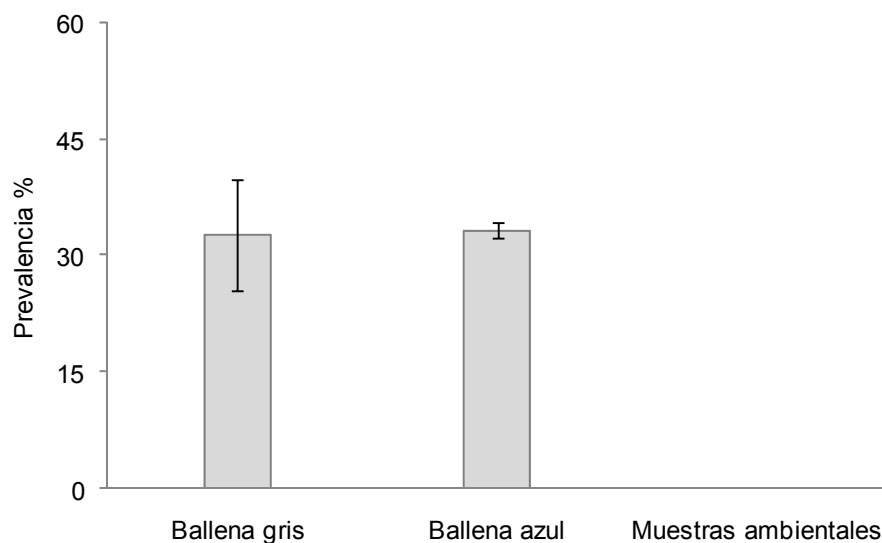


Fig. 17. Prevalencia de muestras de soplo de ballena gris, ballena azul y muestras ambientales con presencia de una o más bacterias respiratorias (detectadas con las PCR individuales). Las barras de error muestran ± 1 de E.E.

Las prevalencias de bacterias respiratorias en ballena azul y ballena gris fueron casi iguales ($\sim 33\%$) y no se encontraron diferencias significativas entre ambas proporciones ($\chi^2 = 0.2217$, $p = 0.6303$). Se encontraron, sin embargo, diferencias significativas entre las muestras de ballena gris y las muestras ambientales ($\chi^2 = 25.882$, $p = 0$); así como entre las muestras de ballena azul y las muestras ambientales $\chi^2 = 18.101$, $p = 0$).

Hongos

Se detectó la presencia de hongos en poco menos de la mitad de las muestras de soplo (45 %) utilizadas en los análisis (Ver sección V.2.6., p. 41). Doce de las muestras de ballena gris (38.7 %) y seis de ballena azul (66.6 %) fueron positivas a hongos (Fig. 18). Ninguna de las 36 muestras ambientales amplificó el producto esperado para hongos con estos oligonucleótidos (Fig. 19). Las frecuencias de hongos no identificados en las muestras de soplo de ballena gris y ballena azul, así como en las muestras ambientales, se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Número de muestras de soplo y ambientales con hongos no identificados. Se muestra el número de muestras y la frecuencia entre paréntesis.

	Ballena gris (n=31)	Ballena azul (n=9)	Ambientales (n=36)
Hongos no identificados	12 (0.38)	6 (0.66)	0

Se encontraron diferencias significativas altas en las prevalencias de hongos entre ballena gris y ballena azul ($\chi^2 = 23.424$, $p = 0$), ballena gris y muestras ambientales ($\chi^2 = 32.492$, $p = 0$), así como entre ballena azul y muestras ambientales ($\chi^2 = 23.424$, $p = 0$) (Figs. 18 y 19).

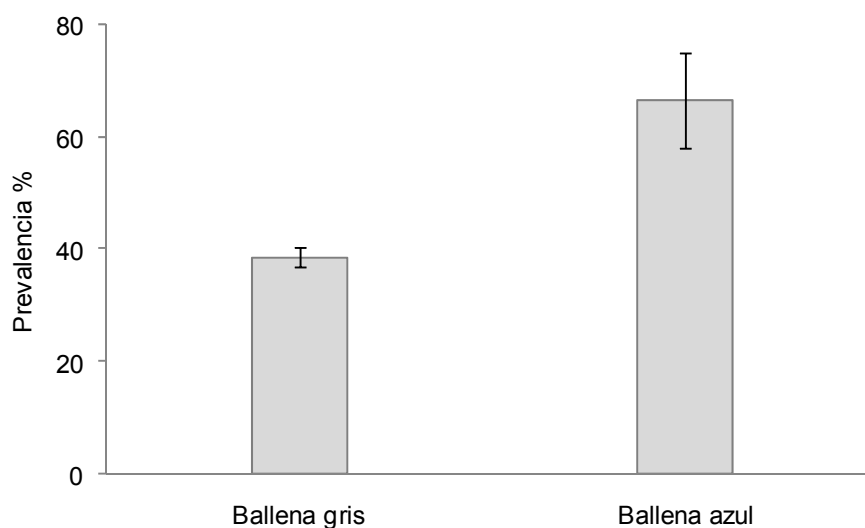


Fig. 18. Prevalencia de hongos en las muestras de ballena gris y ballena azul (oligonucleótidos 28S). Las barras de error muestran ± 1 de E.E.

Se encontraron diferencias significativas en las prevalencias de hongos entre las muestras de soplo y las muestras ambientales ($\chi^2= 29.754$, $p = 0$) (Fig. 19).

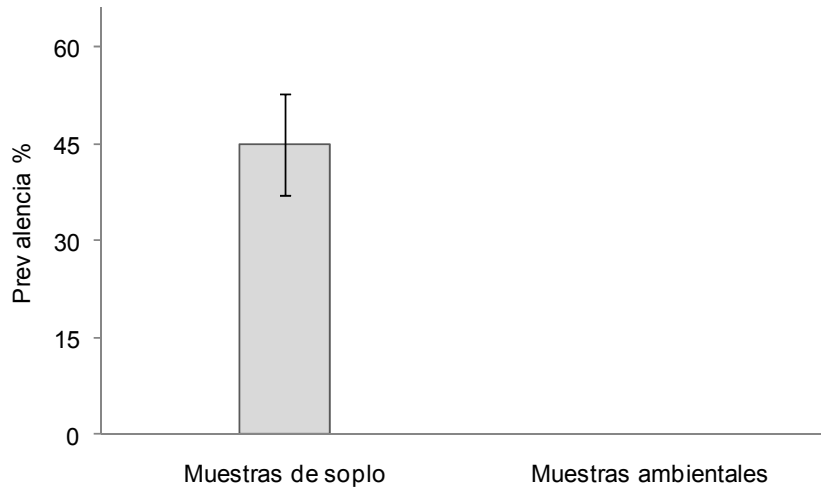


Fig. 19. Prevalencia de hongos en las muestras de soplo de ambas especies y las muestras ambientales. Las barras de error muestran ± 1 de E.E.

Las reacciones amplificaron más de una banda, con distintos tamaños (Ver fig. 20) y al hacer el análisis de similitud con BLASTn se comprobó que los oligonucleótidos ‘universales’ 28S amplificarían diversas especies de hongos, aunque algunos de los productos esperados no variarían en tamaño de manera que pudieran ser diferenciados en geles de agarosa (Ver tabla 8). Por ejemplo, los productos amplificados de *Aspergillus niger* (257 pb) y *Candida glabrata* (268 pb) evidenciarían bandas difíciles de diferenciar entre sí; así como *Cryptococcus neoformans* (283 pb), que a pesar de tener una diferencia de 20 pb con respecto al producto de *C. glabrata*, es tan pequeña que no se rebasaría la resolución de la matriz de agarosa. Por otro lado, se confirmó que el juego de oligonucleótidos 28S también amplificarían algunas especies de metazoarios y dinoflagelados, dando productos esperados de ~ 281- 283 pb, por lo que si también estuvieran presentes, no habría forma de diferenciarlos de *C. glabrata* o *A. niger*, y mucho menos de *Cryptococcus neoformans*, ya que darían productos del mismo tamaño. Es decir, que si todos estos microorganismos estuvieran presentes en la misma muestra, probablemente se verían como una sola banda. Los productos amplificados de

Cryptococcus spp. (330 pb) evidenciarían, sin embargo, un producto mucho más grande que los demás, con una diferencia de 50 pares de bases en comparación con *Cryptococcus neoformans* (283 pb) y de ~ 70-80 pb con los otros dos géneros de hongos (Tabla 8). En este caso si se podrían diferenciar los productos amplificados de estos hongos, del resto, en caso de estar presentes en una misma muestra (Fig. 20).

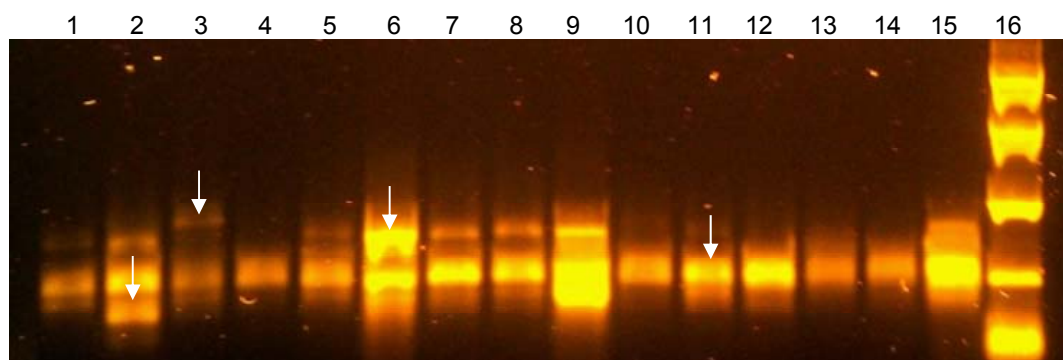


Fig. 20. Fotografía de un gel de agarosa donde se observan productos de hongos de cuatro tamaños distintos usando los oligonucleótidos 28S (bandas desde 170 a 330 pb aproximadamente), en muestras de ballena gris (carriles: 1-9) y ballena azul (carriles: 10-15). El carril 16 corresponde al marcador de peso molecular (50 pb: 100, 250, 500, 1000 y 2000).

VI.2.4. ANÁLISIS DE SECUENCIA DE UN PRODUCTO CLONADO DE LA PCR DE HONGOS

Al realizar el análisis de secuencias con BLASTn, las tres secuencias mostraron alta similitud con distintas especies de hongos. En particular, una de las secuencias mostró un 83 % de similitud con *Cryptococcus neoformans* con valores de probabilidad muy bajos ($E = 4e-67$) y solamente un 8 % de huecos en la secuencia, lo cual sugiere que la secuencia clonada corresponde a este hongo. La secuencia se presenta en la figura 21. Las otras dos secuencias se alinearon con *Fusarium* sp. (89 % de similitud, $E = 6e-89$, 2 % de huecos) y con hongos no cultivados (75 %, $E = 2e-16$, 5 % de huecos) (Figs. 22 y 23).

S08BM-HoF	1	GTGAAATTGTTGAAAGGGAACGATTGAAGTCAGTCGCGTCCGCCGGGACTCAGCCTTGC
<i>C. neoformans</i>	412	GTGAAATTGTTGAAAGGGAACGATTGAAGTCAGTCGTGTCT ATTGGG - TTCAGCC- - - A
S08BM-HoF	61	GTTCTCGCTCGGTGACTT - TCTGGTGGACGGGCCAGCATCAATTTGATC-GTCGGA-A
<i>C. neoformans</i>	468	GTTCT -GCT -GGTGTA - TTCCCT - TTAGACGGGTCAACATCAGTTCTGATCGGT -GGATA
S08BM-HoF	118	AAGGATCGG- GGAAATGTGGCACCT-TTCGGGGTGTGTTATAGTCTCCGGTCCGATACGA
<i>C. neoformans</i>	523	AGGGCT -GGAGG-AATGTGGCA - CTCTTCGGGGTGTGTTATAGCCTCCTGTGCATAC -A
S08BM-HoF	176	C - GGTTGGGATTGAGGAACT- CAGCAT- GCCTTTACGGTCGGGGTTCCGCCACGTTT-AT
<i>C. neoformans</i>	579	CTGGTTGGGACTGAGGAA - TGCAGC - TCGCCTTTATGGCCGGGGTTCCGCCACGTTCGA -
S08BM-HoF	232	GCTTAGGATGCTGGCGTAATGGCTTTAAACGACCCGTCTTGAACACGGACCAAGGAGTC
<i>C. neoformans</i>	636	GCTTAGGATGTTG ACAAA ATGGCTTTAAACGACCCGTCTTGAACACGGACCAAGGAGTC

Fig. 21. Secuencia S08BM-HoF y secuencia de *Cryptococcus neoformans*, gen 25S (291 pb.). En negritas se muestran las bases que no fueron iguales y las rayas corresponden a los huecos. Ambas secuencias van en la dirección 5' - 3'.

S08BM- HoC	1	GTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGTGACCAGACTTGGGCCCGTTAATCATCCAGCG
<i>Fusarium</i> spp.	320	GTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGTGACCAGACTTGGG CTTGGTTGATCATCCAGGG
S08BM- HoC	61	TTCTCGCTGGTGCAC T - TGGCCGGCCCAGGCCAGCATCAGTTCGGTGTGGGGGATAAAGG
<i>Fusarium</i> spp.	380	TTCT CC TGGTGCAC TCTT -CCGGCCCAGGCCAGCATCAGTTCG CCCCGGGGGAAAAAGG
S08BM- HoC	120	CGGCGGAATGTGGCTC-CTCCGGG - AGTGTATAGCCCACCGTGAATACCCTGTG- CT
<i>Fusarium</i> spp.	439	CTTCGGGAATGTGGCTCTCTCCGGGGAGT GTTATAGCCC GTTGCGTAATACCCTGTGGC -
S08BM- HoC	177	GGACTGAGGTTCCGCGCATTGCAAGGGTGCTGGCGTAATGGCCATTAGCGACCCGTCTTG
<i>Fusarium</i> spp.	498	GGACTGAGGTTCCGCGCATTGCAAGGATGCTGGCGTAATGG TCATCAGT GACCCGTCTTG
S08BM- HoC	237	AAACACGGACCAAGGAGTC
<i>Fusarium</i> spp.	558	AAACACGGACCAAGGAGTC

Fig. 22. Secuencia S08BM-HoC y secuencia de *Fusarium* spp., gen 28 S (255 pb.). En negritas se muestran las bases que no fueron iguales y las rayas corresponden a los huecos. Ambas secuencias van en la dirección 5' - 3'.

S08BM-HoD	2	TGAAATTGTTGAAAGGGAACCGATGTGAGGTAGTGTGTTTGTATCATTTCGTG – ATGCA
Hongo no cult.	323	TGAAATTG CT GAAATGGAACCGATGGGAGGCAGTG- TCGGCTGGTGGTACTT GTAT- CA
S08BM-HoD	61	-- GA -CAAGTAAAGCTTTCTTAAGTGCCTGAGAGAGG -TACGTAAACCTGTATGGG- TTG
Hongo no cult.	381	TTTAGCAAGTCAGGCTTTCTTAATTATGTGGGAAAGGCTTC –TAGACCAGTTTGGGCTAG
S08BM-HoD	116	CGATGTCCGTCACGCGTTTAAGAGACTTTGACAAAATGCCTTTTATCATCCCGTCTTGAA
Hongo no cult.	440	TTTTG –CTGTCATGTG ATTG AGAGACT CTGACG AAATGCCT CTTATCA ACCCGTCTTGAA
S08BM-HoD	176	ACACGGACCAAGGAGTC
Hongo no cult.	4499	ACACGGACCAAGGAGTC

Fig. 23. Secuencia S08BM-HoD y secuencia de un hongo no cultivado: gen 28S (192 pb.). En negritas se muestran las bases que no fueron iguales y las rayas corresponden a los huecos. Ambas secuencias van en la dirección 5' - 3'.

VI. 3. CULTIVOS MICROBIOLÓGICOS

De los seis cultivos realizados a partir de muestras de soplo de ballena gris, dos de ellos presentaron crecimiento bacteriano.

VI.3.1. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS CEPAS

En ambos cultivos se identificaron colonias de *Streptococcus intermedius* y de *Streptococcus sanguinis* de acuerdo a la descripción morfológica de las colonias y pruebas bioquímicas (Fig. 24). Ambas especies pertenecen al mismo grupo de *Streptococcus* denominado Viridians.

Del cultivo de soplo de ballena azul, se aislaron dos colonias que se identificaron como *Staphylococcus capitis* y *Staphylococcus pasteurii* (Fig. 24).

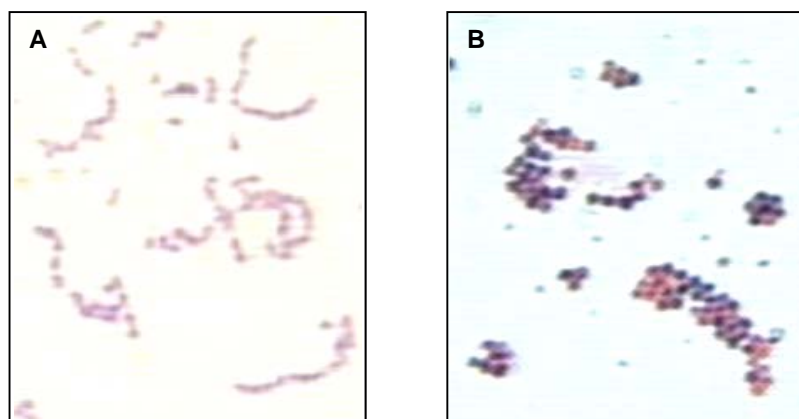


Fig. 24. Fotografías de las colonias bacterianas aisladas a partir de muestras de soplo y teñidas con la técnica de Gram. A) Colonias de *Streptococcus* spp. proveniente de una muestra de soplo de ballena gris. B) Colonias de *Staphylococcus* spp. proveniente de una muestra de soplo de ballena azul.

VI.3.2. ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS BIOMASAS CULTIVADAS

Al no contar con oligonucleótidos específicos para *Streptococcus sanguinis*, los extractos de las cepas detectadas como *Streptococcus sanguinis* y *S. intermedius* se analizaron con el juego de oligonucleótidos para *S. intermedius* (BU5-f y StIn-r), ya que ambas especies bacterianas pertenecen al mismo grupo de *Streptococcus* (Viridians). Contrariamente a lo esperado, las muestras no amplificaron productos esperados con estos oligonucleótidos. Así mismo, las muestras de soplo correspondientes a estos dos cultivos tampoco amplificaron productos esperados con este par de oligonucleótidos. Esto podría deberse a una identificación taxonómica aproximada, ya que las pruebas bioquímicas no suelen ser tan exactas, y posiblemente la identificación haya sido únicamente a nivel del grupo de *Streptococcus*. Cabe resaltar que el juego de oligonucleótidos BU5-f y StIn-r es específico para *Streptococcus intermedius* (Ver tabla 10), así que las cepas aisladas podrían corresponder a otras especies de *Streptococcus* dentro del grupo Viridians.

Las cepas identificadas como *Staphylococcus capitis* y *S. pasteurii* no se pudieron confirmar por medio de métodos moleculares porque no se contó con oligonucleótidos específicos para estas bacterias.

VI.4. ANÁLISIS COPROPARASITOSCÓPICOS

VI.4.1. ANÁLISIS MACROSCÓPICO

Se detectaron acantocéfalos en cinco muestras fecales de ballena azul (representando el 21.7 %) y en dos muestras de ballena de aleta (representando el 28.6 %) (Fig. 25). En todas las muestras positivas se encontró un solo acantocéfalo, mientras que en una muestra de ballena de aleta se contaron 10 especímenes. No se encontraron diferencias significativas en el número de acantocéfalos encontrados entre las dos especies de misticetos ($\chi^2 = 0.14$, $p = 0.70821$).

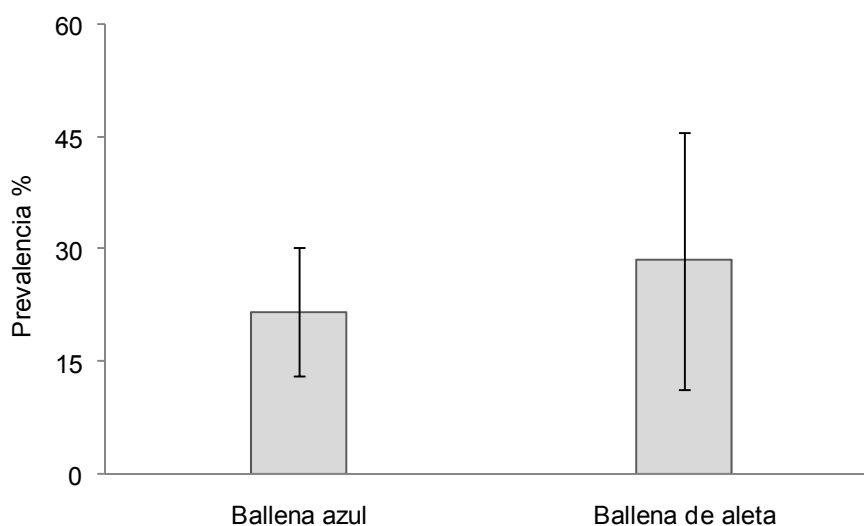


Fig. 25. Prevalencia de acantocéfalos detectados en las heces de ballena azul y ballena de aleta. Las barras de error muestran ± 1 de E.E.

Los helmintos encontrados se observaron deformados y contraídos y morfológicamente similares entre sí. El cuerpo era tubular alargado, de color blanco-rosáceo, ausente de segmentos, con una probóscide en el extremo anterior y más ancho del cuerpo que se encontraba invaginada por la contracción (Fig. 26 - A, D y E). Se pudieron observar diminutas espinas en la probóscide (Fig. 26 - E), por lo que fueron identificados como acantocéfalos (clase Acantocephala, o gusanos con cabeza espinosa) pertenecientes a la familia *Polymorphiidae* (Bush *et al.*, 2001). La

longitud total del cuerpo fue de 9.0 a 17.1 mm, y el extremo anterior midió de 0.9 a 1.9 mm de ancho. Solo se pudo medir la probóscide de un espécimen, la cual no se encontraba completamente invaginada y que midió aproximadamente 0.45 mm de largo por 0.4 mm de ancho (Fig. 26 - E).

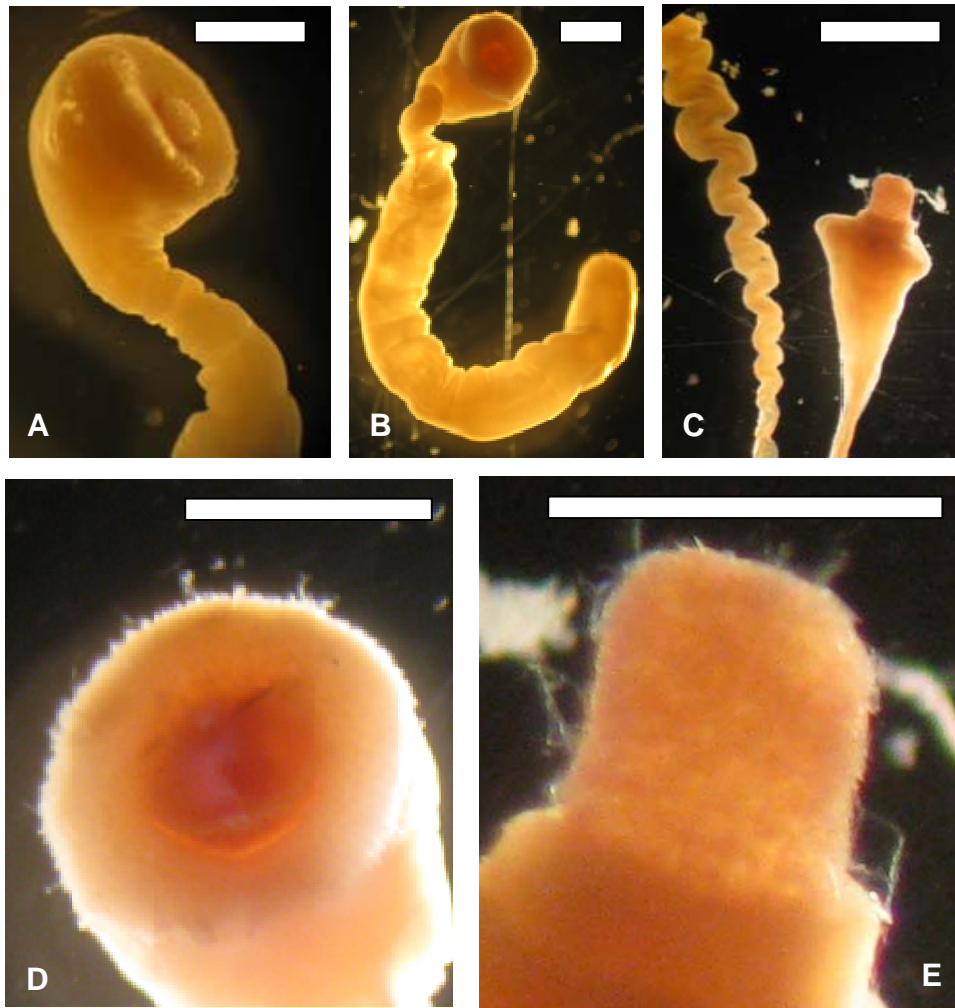


Fig. 26. Fotografías de los acantocéfalos encontrados en heces de ballena azul y ballena de aleta. **A, D y E:** Probóscides. **B y C:** Vista completa del cuerpo. Escala: A, B, C y D ~ 1 mm; E ~ 0.5 mm.

VI. 4.2. ANÁLISIS MICROSCÓPICO

No se encontraron huevos de helminto en ninguna de las 14 muestras analizadas con la técnica de Ritchie convencional, a excepción de una muestra de ballena azul, en la cual se detectó un huevo descrito para este estudio como tipo A (Ver tabla 11 y fig. 27).

Al volver a analizar todas las muestras con la técnica estandarizada, excepto aquella que había resultado positiva con el método convencional, doce muestras (10 de ballena azul y dos de ballena de aleta) evidenciaron al menos un tipo de huevo de helminto (Tabla 11). Por lo tanto, del total de 30 muestras analizadas se detectaron huevos de helmintos en 13 muestras de ballena azul (n=23) y dos de ballena de aleta (n=7) (Ver tabla 11 y fig. 27).

No se encontraron diferencias significativas en la prevalencia de huevos de helmintos entre las dos especies ($\chi^2 = 1.677$, $p = 0.1953$).

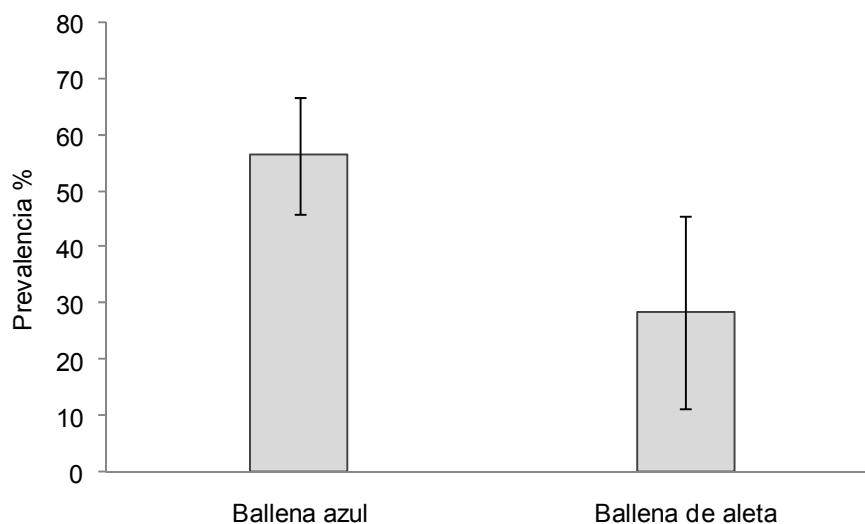


Fig. 27. Prevalencia de huevos de helmintos en las muestras de heces de ballena azul y ballena de aleta examinadas con la técnica de Ritchie modificada para ballenas. Las prevalencias corresponden a ~57 % para ballena azul y ~29 % para ballena de aleta (Ver tabla 11). Las barras de error muestran ± 1 de E.E.

Eficacia del método estandarizado

Se observó una mayor proporción de muestras de heces positivas utilizando la técnica de Ritchie modificada para ballenas, que con la técnica convencional (48 % vs 7 % de muestras positivas, ver tabla 11). Cinco de 13 muestras (38 %) que habían resultado negativas con la técnica convencional, resultaron positivas con la técnica estandarizada.

Tabla 11. Proporción de muestras de heces positivas a huevos de helmintos en relación a las muestras analizadas con la técnica de Ritchie convencional y estandarizada. Se indican los porcentajes respectivos.

Técnica	Convencional	Estandarizada	Total positivas
Ballena azul	1 / 12 (8 %)	12 / 22 (55 %)	13 / 23 (56 %)
Ballena de aleta	0 / 2 (0 %)	2 / 7 (29 %)	2 / 7 (29 %)
Total ambas especies	1 / 14 (7 %)	14 / 29 (48 %)	15 / 30 (50 %)

Con base en la observación de los resultados, la filtración de la sub-muestra con etanol (en vez de decantarla y lavarla con solución salina antes de filtrarla), así como la filtración de un mayor volumen de muestra con un tamiz de nylon de 100 micras, el incremento en el tiempo y velocidad de centrifugaciones, resultaron modificaciones eficaces a la técnica convencional (Ver sección V.4.2).

Tipos de huevos detectados

Se encontraron distintos tamaños y morfologías de huevos de helmintos en las heces de ambas especies de ballenas, los cuales se clasificaron y agruparon por intervalos de medidas y morfología general (i.e. ovalados o redondos, con membrana lisa o rugosa, presencia de opérculo y/o espina). Los huevos fueron traslúcidos, de color dorado claro a café, con material granulado abundante y repartido dentro de

todo el huevo. A partir de las características generales de clasificación y con base en los grupos de helmintos parásitos reportados para mamíferos marinos, se pudieron identificar huevos pertenecientes a la superfamilia *Ascarioidea* (Clase: *Nematoda* o lombrices cilíndricas) y a la familia *Diphyllobothriidae* (Clase: *Cestoda* o platelmintos), según lo descrito para otras especies (Anderson, 2000; Dailey, 2001; Méndez, 2002). Dentro de la superfamilia *Ascarioidea* se pudieron identificar huevos similares a aquellos de la familia *Anisakidae*, género *Anisakis* spp., por el tamaño (en promedio: 40 x 50-55 μm), la forma redonda a ovalada y una cáscara gruesa y lisa (Anderson, 2000; Dailey, 2001; Méndez, 2002) (Fig. 28). Dentro de la familia *Diphyllobothriidae*, se detectaron huevos con características similares al género *Diphyllobothrium* spp., como lo son la forma estrictamente ovalada, las medidas de 32-35 x 45-58 μm , y la presencia de un opérculo aplanado en uno de los polos y una pequeña espina o saliente en el otro (Dailey, 2001; Méndez, 2002) (Fig. 25).

Los huevos de helmintos gastrointestinales detectados en las muestras de heces de ballena azul y ballena de aleta se clasificaron como A, B, C y D, de acuerdo a características distintivas. Los huevos tipo A presentaron características típicas de los nemátodos de la familia *Anisakidae* (Anderson, 2000; Dailey, 2001) (Fig. 28-A). Los huevos tipo B fueron similares a aquellos descritos para los céstodos de la familia *Diphyllobothriidae* (Dailey, 2001, Méndez, 2002) (Fig. 28-B), aunque en algunos casos la espina no fue muy visible. Los huevos tipo C fueron redondos, midieron 20-25 X 30 μm , presentaron una cutícula lisa y gruesa y no presentaron características similares a ningún huevo descrito (Fig. 28-C). Los huevos tipo D fueron muy pequeños (12-14 X 14-16 μm), redondos y con una cutícula gruesa y rugosa (con bordes aserrados) y tampoco se pudieron identificar taxonómicamente (Fig. 28-D).

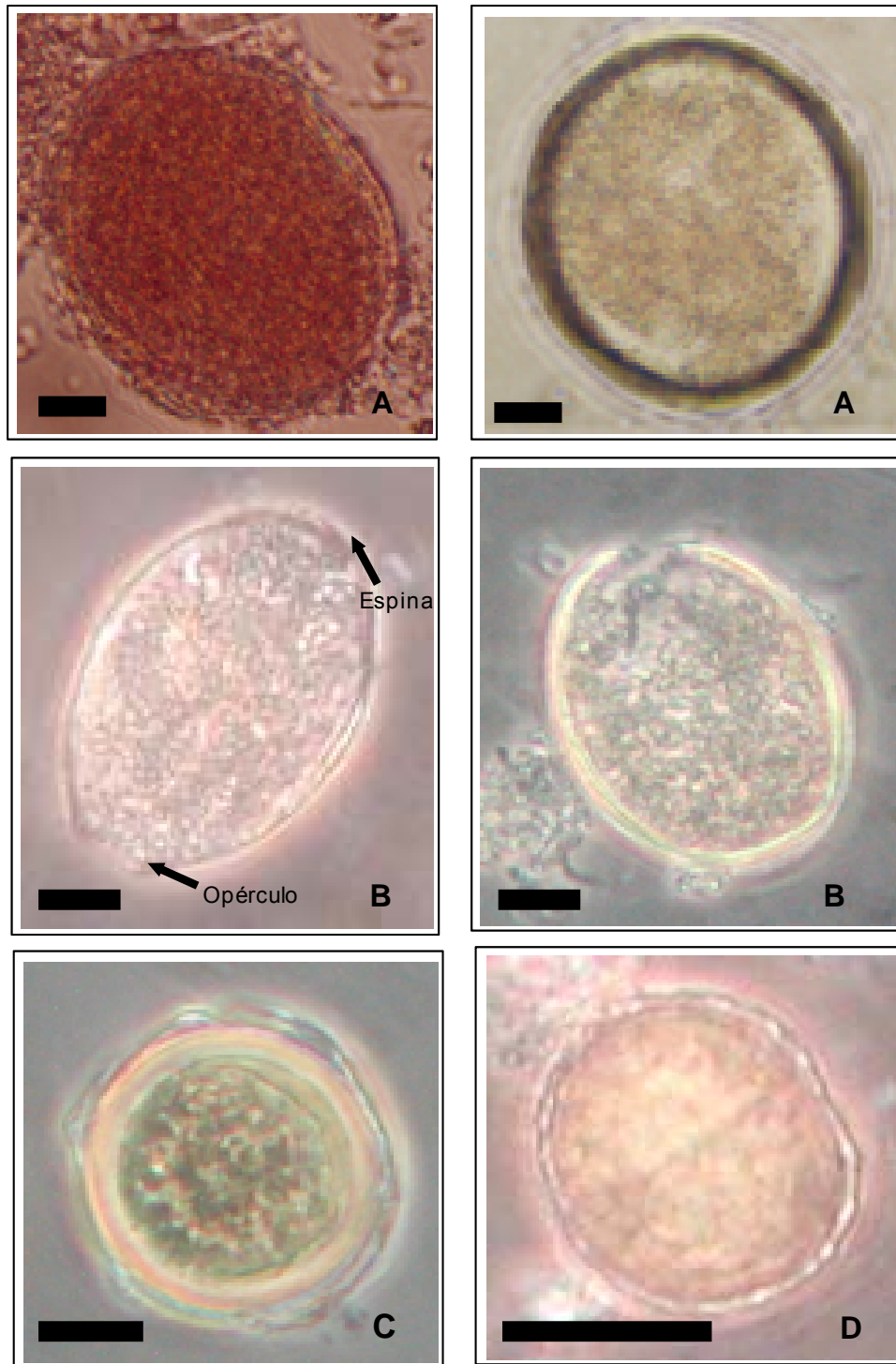


Fig. 28. Fotografías de los tipos de huevo de helmintos encontrados en heces de ballena azul y ballena de aleta con la técnica de Ritchie estandarizada: tipos A (*Anisakidae*), B (*Diphyllobothriidae*), C y D (no identificados) descritos en el párrafo anterior. Para los tipos A y B se muestran dos fotografías. (Escala = 10 μ m).

En la ballena azul, los huevos tipo A fueron los más comúnmente encontrados mostrando un 26 % de prevalencia, seguidos por los huevos tipo C (22 %), y los tipo B y D que mostraron la misma prevalencia (13 %). En las muestras de ballena de aleta se presentaron únicamente huevos tipo B, con (29 %). (Fig. 29).

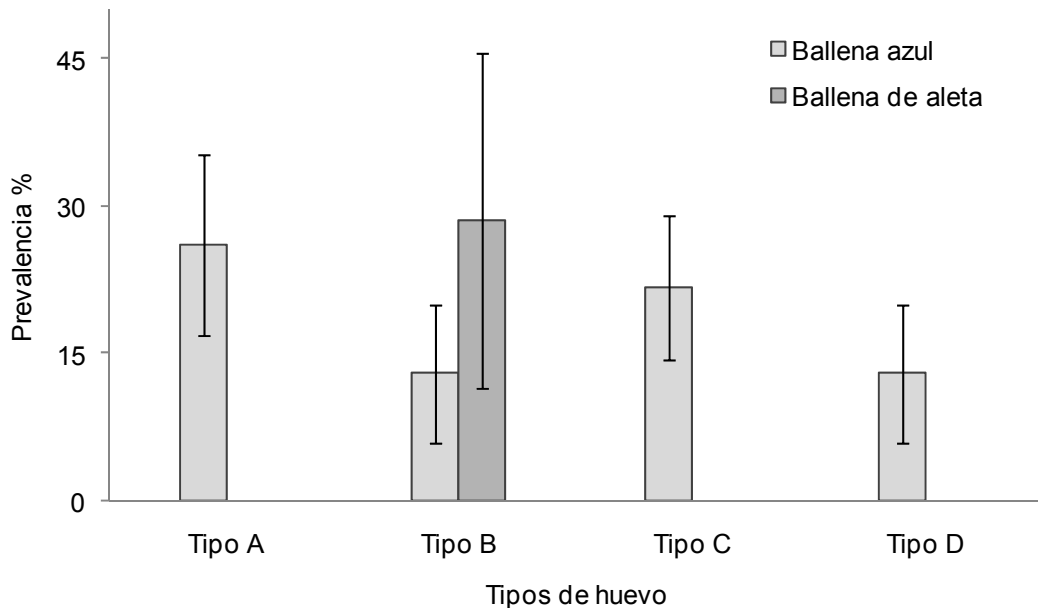


Fig. 29. Prevalencias de cada uno de los tipos de huevos de helmintos presentes en las muestras de heces de ballena azul y ballena de aleta. Las barras de error muestran ± 1 de E.E.

En total, se encontraron 14 muestras de ballena azul (61 %) con alguno de los helmintos detectados, ya sea acantocéfalo, nemátodo, céstodo o huevo no identificado (“tipo C o D”), solos o en combinación con otro; mientras que las dos únicas muestras positivas de ballena de aleta (29 %) presentaron acantocéfalos y céstodos de manera simultánea (Fig. 30). No se encontraron diferencias significativas en la prevalencia de helmintos detectados entre ballenas azules y ballenas de aleta ($\chi^2 = 2.249$, $p = 0.1301$).

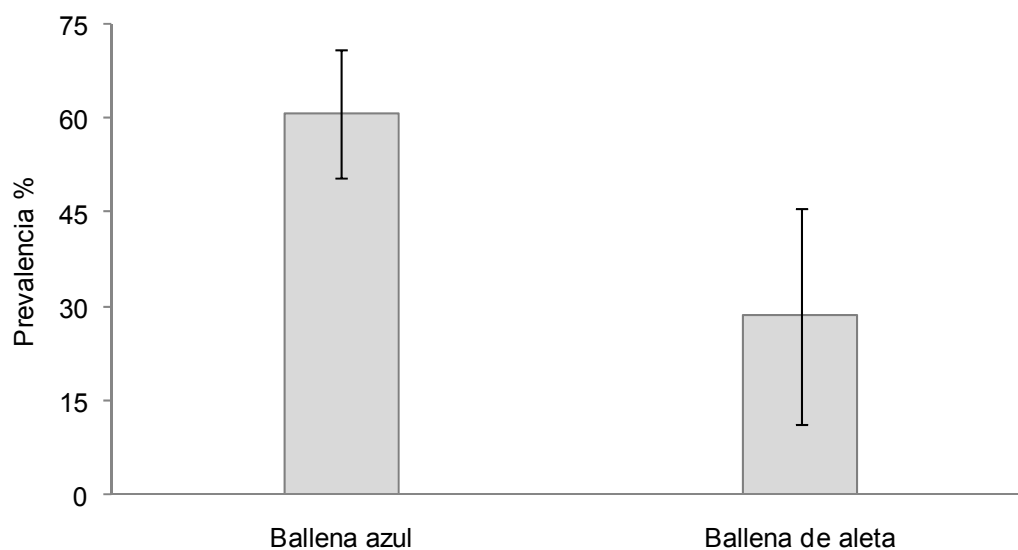


Fig. 30. Prevalencia total de helmintos en muestras de heces de ballena azul y ballena de aleta. Las barras de error muestran ± 1 de E.E.

En un 30 % de las ballenas azules se detectó un solo tipo de helminto (ya sea acantocéfalo adulto, huevo de nemátodo, de céstodo o huevo no identificado), mientras que el porcentaje de individuos multiparasitados, es decir con más de un tipo de helminto, fue similar en ballenas azules (26 %) que en ballenas de aleta (29 %) (Fig. 31). Se encontraron diferencias significativas en la proporción de muestras con un solo tipo de helminto entre ambas especies ($\chi^2= 4.412$, $p= 0.0356$), pero no en la proporción de individuos multiparasitados ($\chi^2= 0.017$, $p= 0.8964$).

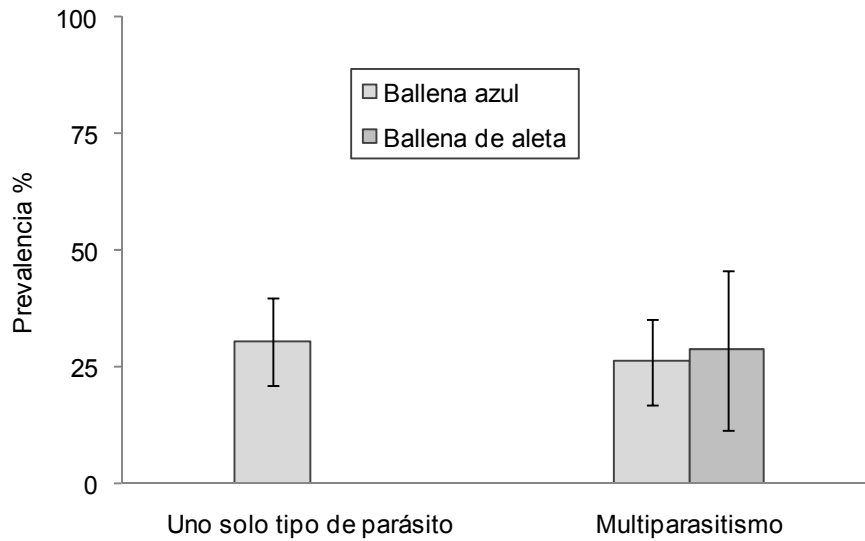


Fig. 31. Porcentaje de ballenas azules y de aleta con un solo tipo de helminto (huevo o adulto) e individuos multiparasitados, es decir con más de un solo tipo de helminto, detectados a partir de muestras de heces. Las barras de error muestran ± 1 de E.E.

Prevalencia de las tres familias de helmintos identificadas

Las muestras fecales de ballena de aleta mostraron una mayor prevalencia de helmintos de las familias *Polymorphiidae* (29 %) y *Diphyllbothriidae* (29 %) que las muestras de ballena azul (22 y 13 %, respectivamente). Las muestras de ballena azul mostraron una prevalencia de 26 % de helmintos de la familia *Anisakidae*, en contraste con las muestras de ballena de aleta, las cuales no presentaron a estos nemátodos (Ver Fig. 32).

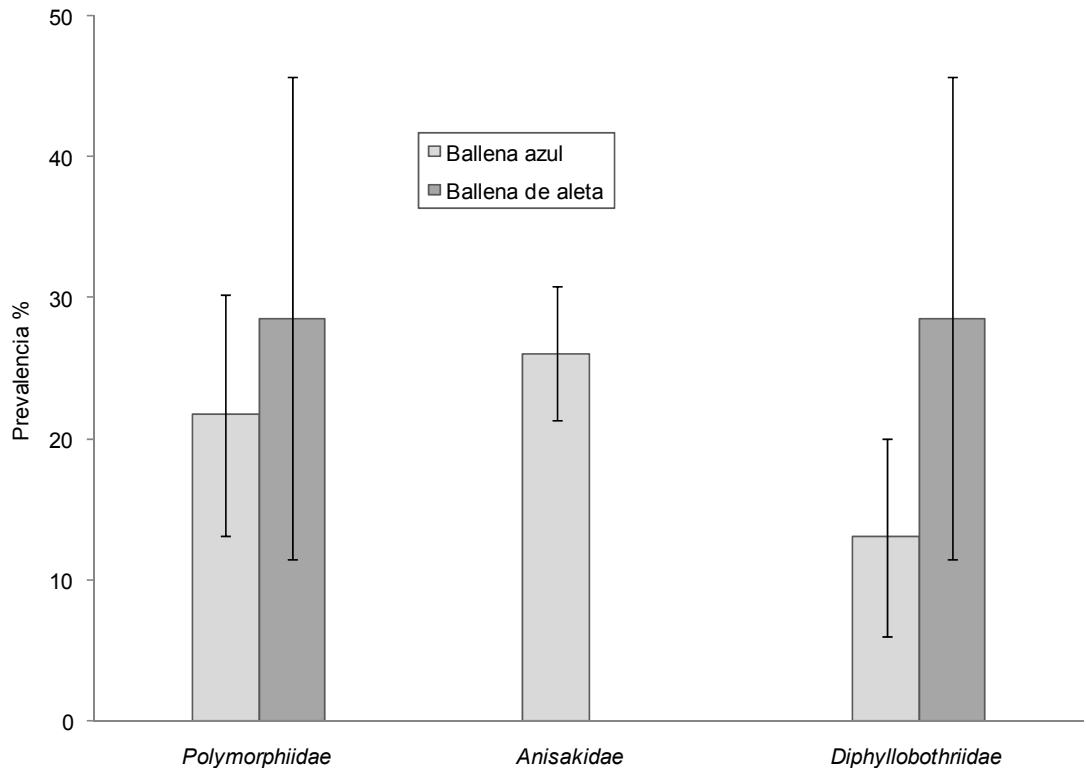


Fig. 32. Prevalencias de las tres familias de helmintos en ballena azul y ballena de aleta, identificadas morfológicamente a partir de muestras de heces. Las barras de error muestran ± 1 de E.E.

Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en las proporciones entre ballenas azules y de aleta, para ninguna de las familias de helmintos encontrados: *Polymorphiidae* ($\chi^2 = 0.14$, $p = 0.7082$), *Diphyllbothriidae* ($\chi^2 = 0.932$, $p = 0.3344$) y *Anisakidae* ($\chi^2 = 3.683$, $p = 0.0549$) (Fig.32).

VII. DISCUSIÓN

VII.1. TÉCNICAS DE MUESTREO NO-INVASIVAS PARA LA DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS Y PARÁSITOS DE CETÁCEOS

En la revisión bibliográfica, no se encontraron estudios que describieran el uso de técnicas no-invasivas para recolectar muestras de la exhalación de cetáceos en vida libre con la finalidad de analizar su carga microbiana (Ver sección II.3). Los únicos estudios que han intentado caracterizar la flora microbiana o estado de salud de cetáceos en vida libre han utilizado técnicas invasivas, como la captura y contención de los animales, y se realizaron únicamente con pequeños odontocetos (Buck *et al.*, 2006; Hall *et al.*, 2007), ya que es poco factible la manipulación de animales de mayor tamaño. De igual manera, aunque desde hace más de veinte años se ha analizado la carga parasitaria de mysticetos a partir de necropsias en animales capturados (Dailey & Vogelbein, 1991, Aznar *et al.*, 1995; Umehara *et al.*, 2006; Marigo *et al.*, 2002; Fernández *et al.*, 2003) o varados (Dailey & Walker, 1978; Van Waerebeek *et al.*, 1993), este es el primer estudio que implementa una nueva metodología para analizar heces recolectadas de manera no-invasiva de mysticetos en vida libre .

Los resultados de esta tesis demostraron la utilidad de los dos métodos no-invasivos implementados por primera vez para la recolección de soplos de grandes cetáceos, y resaltaron algunas diferencias en sus aplicaciones. El panel extensible demostró ser el método más fácil de usar para el muestreo de soplos a cortas distancias y fue más práctico y económico que el helicóptero (Ver tabla 8, sección VI.1.), ya que tuvo un diseño sencillo y se logró construir manualmente con herramientas y materiales accesibles (Ver sección V.1.2). El helicóptero, por su lado, requería ser piloteado por personal capacitado, lo cual redujo su utilización para este estudio. No obstante, esta técnica aérea mostró ser el método más eficaz para muestrear soplos de ballenas a grandes distancias, ya que de las seis muestras

colectadas durante una sola salida de campo, se tomaron cuatro con el helicóptero (ver tabla 1, sección V.1.4.).

Ambos métodos de muestreo demostraron su utilidad para la detección de microorganismos del tracto respiratorio de los cetáceos, tanto por medio de cultivo y aislamiento microbiológico, como por el uso de técnicas moleculares, incluso bajo condiciones difíciles de muestreo. Por ejemplo, la mayoría de las muestras que amplificaron ADN de patógenos respiratorios fueron recolectadas con el panel varios segundos después de la exhalación del cetáceo, de manera que el soplo en ocasiones había sido parcialmente evaporado debido a la acción del viento y la temperatura ambiental. Lo anterior sugiere que la superficie de adhesión del panel (tanto la de acrílico como aquella elaborada con hojas de plástico) sirvió para fijar a los microorganismos que estuvieran presentes en el soplo, incluso cuando éste se encontrara parcialmente evaporado; por lo que se observó que no es necesario recolectar las muestras en el momento preciso de la exhalación para obtener resultados por medio de esta técnica. Por otro lado, de las seis muestras recolectadas con el helicóptero, una de ellas amplificó ADN de *Streptococcus intermedius*, por lo que se consideró que este método fue útil para recolectar soplos de grandes cetáceos y obtener ADN de microorganismos respiratorios. Para establecer la eficiencia del método de recolecta a control remoto y compararla con la del panel, se deberá, sin embargo, recolectar un mayor número de muestras con el helicóptero.

VII.2. CARGA MICROBIANA EN SOPLOS, POTENCIAL PATÓGENO Y ZONÓTICO

Bacterias patógenas y comensales

El análisis molecular indicó la presencia de ADN de *Streptococcus* β -hemolíticos en 33 % de las ballenas azules y 26 % de las ballenas grises muestreadas en el Golfo de California y Bahía Magdalena (Ver fig. 14, sección

VI.2.3). Este grupo bacteriano incluye a varias especies de *Streptococcus* patógenos que infectan el tracto respiratorio de mamíferos, y que tienen una importancia clínica en muchas especies domésticas y en el humano, en quien son la causa principal de neumonía, septicemia y meningitis de recién nacidos (Pritzlaff *et al.*, 2001). Su alta virulencia se debe a la acción de potentes exotoxinas proteicas que contribuyen a producir la β -hemólisis (Nizet, 2002). En los últimos años se han reportado bacterias pertenecientes a este grupo en otros mamíferos marinos, tales como marsopas de puerto (*Phocoena phocoena*), varias especies de delfines, focas de puerto (*Phoca vitulina*) y focas grises (*Halichoerus grypus*) (Swenshon *et al.*, 1998; Han Goh *et al.*, 1998; Akineden *et al.*, 2005; Akineden *et al.*, 2007). En el caso de los fócidos, especies como *Streptococcus phocae*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* y *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, fueron detectadas en asociación con otras bacterias patógenas y con el virus de moquillo (Morbillivirus) durante las epizootias de 1980-1990 y 2002, en el Mediterráneo y Atlántico Norte (Akineden *et al.*, 2005; Akineden *et al.*, 2007). En todos los casos se reportaron lesiones graves por bronconeumonía, abscesos, meningitis supurativa y septicemia (Swenshon *et al.*, 1998; Akineden *et al.*, 2005; Akineden *et al.*, 2007). En este sentido, es interesante haber detectado *Streptococcus* β -hemolíticos en las ballenas azules y ballenas grises en el Pacífico y Golfo de California, ya que aunque no existen reportes de la infección en mysticetos, los cuadros patológicos descritos anteriormente para otros mamíferos marinos sugieren que existe un riesgo potencial para las poblaciones de mysticetos, sobre todo si se llegara a presentar algún brote epizootico como el de Morbillivirus. Por otro lado, se han reportado cuatro especies de *Streptococcus* β -hemolíticos que parecen tener a los mamíferos marinos como hospedadores únicos o principales: *Streptococcus phocae*, *S. halichoeri*, *S. marimammalium*, en fócidos (Alber *et al.*, 2004; Lawson *et al.*, 2005); y *S. iniae* en delfines de agua dulce. Este último patógeno se ha asociado con infecciones cutáneas y celulitis de curso grave en personas que tuvieron contacto con los delfines portadores (Han Goh *et al.*, 1998). Todo lo anterior permite formular la hipótesis de que pudiera haber un riesgo zoonótico potencial de los *Streptococcus* β -hemolíticos encontrados en el tracto respiratorio de las ballenas azules y grises. Para determinar dicho riesgo habría, sin

embargo, que detectar las especies de *Streptococcus* involucradas en las infecciones de ballenas azules y grises, para saber si son las mismas que se han reportado para otros mamíferos, o si son otras.

Los resultados moleculares también evidenciaron la presencia de la bacteria *Streptococcus intermedius* en los soplos de aproximadamente 12 % de las ballenas grises, mientras que estuvo ausente en las ballenas azules (Ver fig. 16, sección VI.2.3). Se decidió investigar la presencia de esta bacteria con métodos moleculares en todas las muestras, posteriormente a la identificación fenotípica de algunos de los cultivos realizados (Ver VI.3.1), ya que no se esperaba detectar este patógeno en los cetáceos. Esto fue debido a que en la revisión bibliográfica no se encontraron reportes de infección por *Streptococcus intermedius* en ningún mamífero marino. Por ésta razón podría pensarse que dicha bacteria es zoonótica y que las diferencias significativas en la prevalencia de esta bacteria entre los dos mysticetos (Ver sección VI.2.3) podrían deberse a la diferencia que hay en la actividad de observación de ballenas, ya que la ballena gris permite un contacto mucho más cercano y constante con los humanos (Rice, 1971; Lou Jones & Schwartz, 2000) que las ballenas azules. En este sentido, las ballenas grises estarían más expuestas a patógenos provenientes de humanos y podrían potencialmente transmitir microorganismos respiratorios a través del soplo a los humanos.

Streptococcus intermedius es un patógeno oportunista de humanos, perteneciente al grupo Viridians, el cual contiene en su mayoría a *Streptococcus* comensales, es decir aquellos que forman parte de la flora bacteriana común del tracto digestivo, genital y vías respiratorias altas. Sin embargo, al infectar otros órganos normalmente estériles, pueden ocasionar enfermedades de curso grave e incluso la muerte. Algunos ejemplos de esto son la endocarditis séptica y los abscesos en el cerebro, articulaciones e hígado (Coykendall, 1989) que afectan principalmente a personas inmunosuprimidas (Chen *et al.*, 2005; Konno *et al.*, 2006). Es posible que la ausencia de reportes de este patógeno en mamíferos marinos se deba a la falta de estudios orientados a la detección de esta bacteria, y que no

represente un riesgo real de zoonosis. Finalmente, su presencia en las muestras de ballenas grises podría también deberse a la contaminación involuntaria con partículas de saliva humana, en las cuales podrían estar presentes algunas especies de *Streptococcus* del grupo Viridians. Sin embargo, esto es poco probable, ya que la recolecta y manipulación de las muestras se realizó siempre ejerciendo medidas para evitar dicha contaminación. Además de esto, todas las muestras ambientales y las de ballena azul fueron negativas a estos patógenos, así como los controles-negativos de agua estéril de las PCR, por lo que la contaminación humana en el campo y dentro del laboratorio se puede descartar.

Fue interesante notar que la detección molecular y la identificación taxonómica por medio de cultivos no dieron resultados equivalentes. Mientras que se identificaron fenotípicamente a dos *Streptococcus* del grupo Viridians, *S. intermedius* y *S. sanguis*, a partir de dos cultivos de soplo de ballena gris (Ver sección VI.3.1.), los análisis moleculares específicos para detectar *Streptococcus intermedius* a partir de los extractos de dichas biomasas no evidenciaron el producto esperado (Ver sección VI.3.2). Por lo anterior, se concluyó que la identificación taxonómica de las cepas fue equivocada, debido probablemente a una baja sensibilidad de las pruebas comerciales que no permitió detectar diferencias bioquímicas mínimas entre especies de *Streptococcus*. Algunos estudios sobre este género bacteriano indican que se pueden presentar interacciones leves durante la realización de las pruebas bioquímicas, las cuales pueden generar resultados falsos positivos; y que incluso la misma cepa puede presentar variabilidad bioquímica. Por lo que las técnicas de rutina basadas en pruebas fenotípicas no permiten la identificación inequívoca de ciertas especies de *Streptococcus*, en particular aquellas que pertenecen al grupo Viridians (Poyart *et al.*, 1998). Por otro lado, la bacteria *Streptococcus iniae*, aislada a partir de mamíferos marinos y perteneciente al grupo B de los *Streptococcus* β -hemolíticos, tiene características fenotípicas altamente similares a varias especies de *Streptococcus* del grupo Viridians, por lo que puede ser fácilmente confundida con éstas en las pruebas de identificación bioquímica (Han Goh *et al.*, 1998). En este sentido, cabe la posibilidad de que las bacterias identificadas bioquímicamente como

Streptococcus intermedius, sean en realidad especies de *Streptococcus* β -hemolíticos, tales como *S. iniae*, ya que la diferenciación taxonómica puede resultar problemática entre estas especies (Poyart *et al.*, 1998; Han Goh *et al.*, 1998).

Hongos

Se detectó ADN de hongos en el 67 % de las muestras de soplo de ballenas azules y en el 39 % de las de ballena gris (Ver fig. 19, sección VI.2.3), pero no se lograron identificar las especies por falta de tiempo. Al realizar el análisis de especificidad de los oligonucleótidos para confirmar qué tipos de hongos amplificarían con mayor probabilidad, se encontró que no solamente amplificarían a varias especies de hongos (i.e. *Aspergillus niger*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus* spp.), sino también a algunos dinoflagelados marinos tales como *Gymnodium* spp. y *Prorocentrum* spp. (Ver tabla 8, sección VI.2.2.) Con base en esto, es factible que algunas de las muestras que amplificaron el producto esperado para hongos hayan tenido contaminación ambiental marina proveniente de la brisa o del propio espiráculo de los cetáceos; ya que al emerger, en la cuenca del espiráculo queda atrapada agua, la cual es expelida junto con el soplo al momento de la exhalación. En este sentido, sería esperado que las muestras ambientales amplificasen los productos esperados para los oligonucleótidos de hongos. Sin embargo, no fue así; lo cual sugiere que probablemente las muestras de soplo efectivamente contuvieran ADN de hongos y no de dinoflagelados marinos.

Para confirmar si las muestras de soplo amplificaron efectivamente algún hongo patógeno respiratorio u organismos marinos ambientales, sería necesario utilizar oligonucleótidos específicos, por ejemplo para *Cryptococcus neoformans* o *Aspergillus* spp.; pero también para las especies de dinoflagelados mencionados en la tabla 8 (Ver sección VI.2.2.). Otra forma sería clonar, secuenciar y alinear los productos amplificados para saber a qué organismo corresponden, lo cual se realizó para una de las muestras de ballena azul (Ver secciones V.2.7. y V.2.8.). Una de las secuencias obtenidas a partir de dicha clonación se alineó con un alto porcentaje de

homología y valores E muy bajos con la región genética reportada para los genes 5S, 5.8S, 18S, y 25S de *C. neoformans* (Ver tabla 11, sección VI.2.4.). No se pudo, sin embargo, confirmar la presencia de este hongo en todas las muestras positivas a los oligonucleótidos, ya que el procedimiento es tardado y costoso. Los resultados son, por lo tanto, parciales y requieren de confirmación por medio de PCRs específicos para la detección de *C. neoformans* en todas las muestras de soplo y muestras ambientales recolectadas.

Cryptococcus neoformans es un patógeno que no forma parte de la flora respiratoria normal. Este hongo se ha detectado en humanos y varias especies de mamíferos, incluyendo los marinos, en los cuales provoca padecimientos de agudos a crónicos que incluyen cuadros de bronconeumonía, hemorragia, embolia pulmonar, meningoencefalitis e incluso la muerte en individuos inmunosuprimidos (Citron, 1975; Reidarson *et al.*, 2001). En los humanos, la criptococcosis se asocia con cuadros severos de inmunosupresión tales como el SIDA (Sandhu *et al.*, 1995). De confirmarse, su presencia en el tracto respiratorio de la ballena azul y la ballena gris podría sugerir que algunos individuos están actuando como reservorios, y que si llegaran a estar inmunosuprimidos por otros factores, tales como contaminación, degradación de su hábitat e incluso otras infecciones, representaría un riesgo patogénico real para la salud de las poblaciones naturales de misticetos. Por estas razones, *C. neoformans* podría ser utilizado como un indicador indirecto del estado inmunológico de las poblaciones naturales de las especies de misticetos estudiados.

Muestras ambientales

El propósito de recolectar muestras ambientales fue por un lado, descartar la contaminación de las muestras de soplo con microorganismos provenientes de las personas que realizaban el muestreo. Por otro lado, se pretendía diferenciar entre las bacterias ambientales marinas que con alta probabilidad podrían contaminar las muestras, ya que en el mar pueden encontrarse un gran número de géneros bacterianos como *Vibrio* spp. (Austin, 1988). En este sentido, haber detectado ADN

eubacteriano en más de la mitad de las muestras ambientales era esperado (Ver sección VI.2.1). Sin embargo, los resultados de los PCR individuales evidenció que las muestras ambientales no contenían ADN de bacterias respiratorias patógenas, como *Streptococcus* β -hemolíticos o *Streptococcus intermedius*. Lo anterior indica que los resultados moleculares son confiables y que las bacterias detectadas en las ballenas correspondieron a la carga presente en los soplos y no a contaminación ambiental.

VII.3. CARGA PARASITARIA EN HECES, POTENCIAL PATÓGENO Y ZONÓTICO

Las heces de ballena azul y ballena de aleta muestreadas en el Golfo de California revelaron una carga helmíntica digestiva variada, encontrándose acantocéfalos, céstodos y nemátodos (Ver fig. 29, sección VI.4.2.). Se detectó la presencia de acantocéfalos adultos de la familia *Polymorphidae* en ambas especies de mysticetos, los cuales seguramente pertenecen a uno de los dos únicos géneros reportados para mamíferos marinos: *Bolbosoma* spp., un parásito típico de cetáceos; o *Corynosoma* spp., que ocurre más comúnmente en pinnípedos (Dailey & Vogelbein, 1991; Mignucci-Giannoni, 1998; Bush *et al.*, 2001). El género *Bolbosoma* agrupa a nueve especies que parasitan comúnmente los intestinos y estómago de odontocetos y mysticetos, incluyendo a la ballena azul, en la cual se ha reportado principalmente a *Bolbosoma nipponicum* (Dailey & Vogelbein, 1991). Aunque estos helmintos no son considerados un problema grave de salud para los cetáceos a nivel poblacional, se han asociado a la presencia de abscesos en las paredes intestinales de ballenas grises (Dailey, 2001), y han provocado parasitosis masivas que han conducido a la muerte. Por ejemplo, en una ballena Minke (*Balaenoptera acutorostrata*) muerta, se contaron más de 100 especímenes de *Bolbosoma* sp. por cada centímetro de intestino (Bush *et al.*, 2001).

A pesar de que en otros mamíferos la presencia de fases adultas en las heces indique una alta parasitosis (Alba, 1994), es difícil afirmar lo mismo en el caso de los

acantocéfalos adultos encontrados en este estudio, ya que no existen investigaciones en cetáceos que mencionen esta relación y en general, los mamíferos marinos presentan cargas parasitarias elevadas (Raga *et al.*, 2002; Dailey, 2001) Por otro lado, la presencia de acantocéfalos adultos en las heces supondría también la presencia de huevos, ya que los helmintos adultos se reproducen en el intestino y liberan ahí sus huevos para ser arrojados en las heces al defecar (Alba, 1994; Bush *et al.*, 2001). Sin embargo, en este estudio, si bien se encontraron parásitos adultos, no se detectaron huevos de acantocéfalos. Esto pudo deberse a problemas inherentes a la técnica modificada de Ritchie, la cual es usada rutinariamente para detectar huevos de nemátodos, tremátodos y algunos quistes de protozoarios, pero no para acantocéfalos, ni céstodos (Alba, 1994; Méndez, 2002).. Debido a las características morfológicas típicas de los huevos de éstas especies de acantocéfalos (de 32.8 - 83.2 μm por 12.4 - 32.8 μm , fusiformes y alargados con terminaciones cóncavas y una gruesa cutícula compuesta por varias capas (Noble & Noble, 1982; Méndez, 2002), es poco probable que estos se hayan confundido con los de los nemátodos o céstodos encontrados (Ver sección VI.4.2). Por otro lado, es posible que de aumentar el volumen de heces a analizar se incrementase el poder de detección (Ver sección V.4.2.).

Los huevos de helmintos gastrointestinales que se clasificaron como tipo A en este estudio y que se detectaron en heces de ballena azul fueron identificados morfológicamente como huevos de nemátodos de la familia *Anisakidae* (superfamilia *Ascarioidea*) ya que los rangos de medidas (~ 40 X 50 μm de diámetro), la forma redonda a ovalada, una cutícula delgada y su presencia en heces, corresponden a lo descrito anteriormente, y los nemátodos de esta familia utilizan exclusivamente a los mamíferos marinos como hospedadores definitivos (Mignucci-Gianonni *et al.*, 1998; Anderson, 2000; Raga *et al.*, 2002; Nadler *et al.*, 2005; Azusa *et al.*, 2006) (Ver secciones II.3.4 y VI.4.2). Lo más probable es que correspondan a huevos de *Anisakis simplex*, ya que es la especie de anisákido más común en todo el mundo y reportada con mayor frecuencia en odontocetos y misticetos (en más de 35 especies), tales como la ballena azul, el rorcual de Sei, la ballena Minke, la ballena

jobada, la beluga y el cachalote pigmeo, entre otros; aunque *Anisakis physisteridae* es más común en los cachalotes (Dailey & Otto, 1982; Dailey & Vogelbein, 1991; McAlpine *et al.*, 1997; Anderson, 2000; Baker *et al.*, 2001; Raga *et al.*, 2002; González-Solís *et al.*, 2006).

Los resultados obtenidos con la técnica de Ritchie mostraron la ocurrencia de anisákidos en 26 % de las heces de ballena azul, mientras que las muestras de ballena de aleta no los presentaron (Ver sección VI.4.2). La ausencia de estos nemátodos en las muestras analizadas de ballena de aleta podría deberse al bajo número de muestras analizadas en comparación con la ballena azul (23 de ballena azul y siete de ballena de aleta), por lo que la resolución estadística pudo haber sido limitada. En el mar, los huevos de anisákidos eclosionan liberando la larva que es a su vez ingerida por crustáceos del zooplancton, principalmente eufáusidos, como hospedadores intermediarios primarios (Smith, 1971), y después por misticetos zooplanctívoros (hospedadores definitivos); pero también por peces o cefalópodos (hospedadores intermediarios paraténicos) para después ser transmitida a pinnípedos y cetáceos ictiófagos o teutófagos (hospedadores definitivos) (Anderson, 2000; Raga *et al.*, 2002). Se sabe que la infección por *A. simplex* está presente en el Golfo de California, ya que ha sido reportada en lobos marinos de California (*Zalophus californianus*) (Méndez, 2002) y sus fases larvarias se han detectado dentro del hospedador primario intermediario – el eufáusido dominante del océano Pacífico nororiental, *Nictiphanes simplex* (Gómez-Gutiérrez *et al.*, en prensa, 2009) – del cual se alimentan tanto la ballena azul como la ballena de aleta durante el invierno (Del Ángel, 1997; Gendron *et al.*, 2001; Jaume-Shinckel, 2003; Mejía-Acosta, 2003). Ya que todas las muestras examinadas fueron recolectadas durante los meses de invierno a primavera, se esperaría que la prevalencia de *Anisakis* spp. fuera igual entre las especies de misticeto estudiadas. Por lo tanto, aunque se incrementara el número de muestras de ballena de aleta recolectadas durante el invierno, es probable que no se encontraran diferencias significativas entre ballena azul y ballena de aleta.

Las infecciones de *Anisakis* spp. en los mamíferos marinos ocasionan trastornos gastroentéricos como diarrea, ulceraciones y gastritis, que pueden tener consecuencias graves en la salud en caso de existir una alta carga parasitaria (Dailey, 2001). Por otro lado, *Anisakis* spp. es un nemátodo de mamíferos marinos, de importancia zoonótica, que se transmite al humano de forma accidental (hospedador accidental) a través de la ingesta de carne de pescado o calamar cruda infectada con la larva. Esta parasitosis es una zoonosis importante para los humanos que acostumbran comer pescado o calamar crudo, y ocasiona dolor abdominal agudo (por el efecto de las larvas al penetrar la mucosa gástrica) cefalea, diarrea, náuseas, vómito y en ocasiones, cuadros alérgicos localizados (Dailey, 2001; Cowan *et al.*, 2001; Quijada *et al.*, 2005). Por lo tanto, se puede inferir que dada la presencia de huevos de este nemátodo zoonótico en las heces de ballena azul en el Golfo de California, se infiere que algunas especies de peces zooplanctívoros de ésta área geográfica estarían parasitados. Algunos peces identificados como transmisores de esta ictiozoonosis son: el arenque (*Clupea arengus*), la anchoa (*Pomatomus saltarix*), el jurel (*Trachurus murphyi*), el pargo (*Pagrus pagrus*) y la merluza (*Merluccius hubbsi*), entre otros (Quijada *et al.*, 2005). Si estos peces hospedadores son consumidos crudos por las personas del área (i.e. en forma de ceviche o ahumados) representarán un riesgo de salud pública, ya que es en la carne del pescado donde se alojan las larvas infectantes enquistadas, y es la única forma en la que el humano puede adquirir esta parasitosis en la que los mamíferos marinos son los hospedadores definitivos.

Por último, los huevos detectados en las muestras de heces de ballena azul y ballena de aleta clasificados como tipo B en este estudio, presentaron características morfológicas similares a huevos de céstodos de la familia *Diphyllbothriidae* (superfamilia *Pseudophyllidea*), especialmente al género *Diphyllbothrium*, mismos que parasitan comúnmente el intestino delgado de los cetáceos. Los huevos son característicamente de forma ovalada, miden 45–58 X 32– 48 μm , y presentan un opérculo en forma de tapa ovalada en uno de sus polos así como una pequeña saliente en forma de espina en el otro extremo (Ver sección VI.4.2) (Dailey, 2001;

Méndez, 2002). Los resultados de este estudio mostraron una mayor prevalencia de céstodos del género *Diphyllobotridium* en la ballena de aleta (29 %) que en la ballena azul (13 %). Además, este tipo de huevo fue el único que se detectó en la ballena de aleta (Ver sección VI.4.2). Esto podría deberse al ciclo y tipos de hospedadores intermediarios que presentan las dos familias de céstodos, lo cual se explica a continuación.

Dentro de la familia *Tetrabothriidae*, únicamente los géneros *Priapocephalus* y *Tetrabothrius* se han reportado en misticetos; y de la familia *Diphyllobothriidae*, se han reportado dos géneros para cetáceos: *Diphyllobothrium*, que es mucho más común en odontocetos que en misticetos y *Diplogonoporus*, presente solo en misticetos (*Diplogonoporus balaenopterae*) y en el cachalote (Raga *et al.*, 2002). Los céstodos que infectan a animales homeotermos marinos utilizan generalmente a los crustáceos planctónicos como hospedadores intermediarios primarios. Por ejemplo, para algunas especies de la familia *Tetrabothriidae*, los eufáusidos son los hospedadores intermediarios y los peces o calamares son hospedadores transportadores (Baker *et al.*, 2001; Raga *et al.*, 2002). En contraste, los ciclos descritos para los miembros de la familia *Diphyllobothriidae* incluyen a copépodos y peces como hospedadores intermediarios (Raga *et al.*, 2002). Debido a los hábitos alimentarios de los hospedadores definitivos, los céstodos pertenecientes a esta última familia son más comunes en los mamíferos marinos piscívoros o teutófagos, como los pinnípedos y algunos odontocetos, como el cachalote (Dailey & Vogelbein, 1991) y varias especies de delfínidos (Mignucci-Gianonni *et al.*, 1998). Existen además, reportes de la infección por *Diphyllobothrium* spp. en lobos marinos de California (*Zalophus californianus*) en la zona de estudio (Golfo de California) (Méndez, 2002). Con base en lo anteriormente discutido y considerando el tipo de dieta de cada especie (Ver sección II.1), sería probable que los huevos detectados en las heces de la ballena de aleta pertenecieran a la familia *Diphyllobothriidae*, mientras que aquellos presentes en la ballena azul pertenecieran a la familia *Tetrabothriidae*. Incluso, considerando que la ballena de aleta se puede alimentar de varios hospedadores intermediarios (zooplancton y peces) (Ver sección II.1), se

podría decir que puede ser parasitada tanto por especies de la familia *Diphyllobothriidae*, como *Tetrabothriidae*; y que por eso presentó una mayor prevalencia de estos céstodos. Sin embargo, la diferenciación morfológica para determinar género y especie fue difícil de realizar, ya que las características de los huevos pertenecientes a esta familia y detectados en ambas especies de misticetos no permitieron su diferenciación (Ver Fig. 28, sección VI.4.2). Por lo tanto, sería necesario confirmar los resultados con análisis moleculares de las heces.

Es muy probable que los céstodos detectados no representen un riesgo patogénico importante para los cetáceos ya que no se han encontrado lesiones graves asociadas a la infección y no representan un riesgo de zoonosis (Tryland, 2000; Cowan *et al.*, 2001; Dailey, 2001).

VII. 4. IMPLICACIONES Y TRABAJO A FUTURO

Los resultados arrojaron evidencias reales de una carga patógena zoonótica potencial en el tracto respiratorio y digestivo de los misticetos estudiados. La carga microbiana en soplos fue similar en ballenas grises y azules, con la excepción de *Streptococcus intermedius*, patógeno oportunista de humanos, el cual estuvo presente solamente en algunas ballenas grises. Esto indica que las ballenas grises estén probablemente más expuestas a infecciones zoonóticas que las ballenas azules, por lo que sería necesario continuar con estudios para detectar la presencia de estos y otros posibles microorganismos en las exhalaciones de los cetáceos que mantienen un contacto más cercano con los humanos. Es probable que *S. intermedius* no represente por sí solo un riesgo importante para la salud de las ballenas grises ni para los turistas que entren en contacto con ellas, pero debería considerarse el riesgo de transmisión de otros patógenos zoonóticos con implicaciones más graves, tales como el virus de Influenza o la leptospirosis, en estos cetáceos (Dunn *et al.*, 2001; Gulland & Hall, 2005; Trevejo *et al.*, 2005). Además, es posible que este patógeno oportunista pueda servir como un bioindicador del estado de la población de los cetáceos.

Por otro lado, la presencia de *Streptococcus* β -hemolíticos en la exhalación de ambas especies de ballena demostró que sí existe un riesgo patogénico para ambas poblaciones en el Golfo de California. Sin embargo, será necesario identificar las especies de *Streptococcus* para poder detectar diferencias en la carga patógena de ambas especies, y conocer si existen especies diferentes a las reportadas para otros mamíferos marinos (Alber *et al.*, 2004; Akineden *et al.*, 2005). Asimismo, las muestras que contuvieron ADN de hongos deberán ser analizadas más adelante por medio de PCR individuales para investigar la presencia de especies patógenas de hongos como *Aspergillus* spp., y *C. neoformans* y para descartar la contaminación ambiental y la posible presencia de dinoflagelados. En el caso de que se confirme la presencia de *C. neoformans*, éste representaría un riesgo a la salud de las poblaciones de cetáceos en el Golfo de California, no solo por la virulencia del patógeno, sino porque que podría indicar un cuadro severo de inmunosupresión en los individuos (Sandhu *et al.* 1995; Reidarson *et al.*, 2001). Por lo mismo, *C. neoformans* podría servir como indicador del estado de salud de las poblaciones naturales.

En cuanto a la carga parasitaria digestiva, los resultados obtenidos con la técnica de Ritchie modificada para este estudio indicaron que se pueden analizar muestras de heces de cetáceos en vida libre y así detectar la presencia de huevos de helmintos en una primera fase del análisis. Sin embargo, el estudio también evidenció que es necesario confirmar los resultados por medio de análisis moleculares, ya que debido a limitantes intrínsecas a la técnica, únicamente se logró una identificación taxonómica a nivel de familia. Estos análisis más específicos permitirán detectar diferencias intra- e inter-específicas en cuanto a la carga parasitaria de cada individuo. Dicha información sería de utilidad para determinar cuáles son las concentraciones normales de helmintos en los cetáceos, y tal vez, se podrían identificar riesgos a la salud de las poblaciones por altas cargas parasitarias patógenas. La inmunosupresión puede predisponer a infecciones parasitarias severas, lo cual a su vez puede favorecer infecciones secundarias por microparásitos oportunistas e, incluso, conducir a la muerte. Por otro lado, tomando en cuenta la

diferenciación en los hábitos alimenticios entre subespecies oceánicas y costeras (Dailey & Otto, 1982; Dailey & Vogelbein, 1991), la caracterización parasitaria a mayor escala podría ser de utilidad para identificar sub-poblaciones y determinar diferencias alimentarias de los cetáceos en áreas geográficas determinadas.

Se demostró que es posible y necesario realizar un monitoreo rutinario del estado de salud de los cetáceos del Golfo de California y costa Pacífico Norte. La recolecta de muestras para este tipo de estudios se puede realizar a la par de otros muestreos de mamíferos marinos, como se hizo para este estudio, tales como la foto-identificación y la toma de biopsias; igualmente, el tipo de preservación que requieren los análisis moleculares y parasitarios, permite que tanto muestras de soplos como de heces puedan ser almacenadas por años para su posterior análisis.

De continuar con este monitoreo, resultará necesario realizar estudios interdisciplinarios para identificar e investigar los factores de riesgo ambientales y antropogénicos que afectan a las poblaciones naturales de cetáceos, tales como la creciente contaminación, la destrucción del hábitat y el cambio climático, ya que el estrés crónico en los individuos provoca que el sistema inmune se debilite, y por lo tanto, que la respuesta a las infecciones sea menor (Gulland & Hall, 2005). Al utilizar a los mamíferos como bioindicadores se podrían aplicar planes de vigilancia y de manejo que promuevan el mantenimiento de la biodiversidad y la salud del ecosistema. Esto cobra mayor importancia debido a la creciente incidencia de enfermedades emergentes en el medio terrestre y marino durante las últimas décadas, las cuales han ocasionado mortalidades masivas que han diezmado e impactado de distintas formas a las poblaciones naturales de muchas especies, incluyendo a los mamíferos marinos (Dybas, 2001; Gulland & Hall, 2005). Si las poblaciones de cetáceos son vulneradas y reducidas debido a factores antropogénicos, ambientales o a factores intrínsecos como una baja heterocigocidad, como es el caso de especies endémicas geográficamente aisladas, como la vaquita marina (*Phocoena sinus*) (Munguía-Vega, 2002), las enfermedades infecciosas pueden reducir aún más el número de individuos e incluso conducir a la extinción.

VIII. CONCLUSIONES

Este estudio representa el primer esfuerzo de estudiar la carga microbiana y parasitaria de misticetos en vida libre y ha innovado en la implementación de técnicas de muestreo no-invasivas de soplos de cetáceos.

La presencia de *Streptococcus* β -hemolíticos en los soplos de ballenas grises y azules representa un riesgo patogénico potencial para las poblaciones naturales, ya que este grupo de bacterias respiratorias ocasionan septicemia y se han relacionado con epizootias virales en otros cetáceos.

La presencia de *Streptococcus intermedius* en los soplos de ballenas grises sugiere la posibilidad de transmisión de agentes zoonóticos por medio del soplo.

La similitud de una de las secuencias clonadas a partir del soplo de una ballena azul con el hongo *Cryptococcus neoformans*, sugiere inmunosupresión. Debido a que representa un riesgo patogénico potencial para los cetáceos, su presencia deberá ser confirmada para todos los individuos estudiados.

Los resultados de los exámenes de heces de ballenas azules y de aleta sugieren la presencia de helmintos de las familias *Polimorphidae*, *Diphyllobotriidae* y *Anisakidae*, los cuales son comunes en cetáceos y pueden ser virulentos cuando se encuentran con tasas altas de infección.

BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo-Whitehouse, K.; Spraker, T. R.; Lyons, E.; Melin, S. R.; Gulland, F.; DeLong, R. & Amos, W. 2006. Contrasting effects of heterozygosity on survival and hookworm resistance in California sea lion pups. *Mol. Ecol.* 15: 1973-1982.
- Ahmet, Z.; Stanier, P.; Harvey, D.; Holt, D. 1999. New PCR primers for the sensitive detection and specific identification of Group B β -hemolytic streptococci in cerebrospinal fluid. 1999. *Molec. & Cell. Probes.* 13 : 349-357.
- Akineden, O.; Alber, J.; Lammler, C., Weiss, R.; Siebert, U.; Foster, G.; Tougaard, S.; Brasseur, S.M.J.M.; Reijnders, P.J.H. 2007. Relatedness of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* strains isolated from harbour seals (*Phoca vitulina*) and grey seals (*Halichoerus grypus*) of various origins of the North Sea during 1988-2005. *Vet. Microb.* 121: 158-162.
- Akineden, O.; Hassan, A. A.; Alber, J.; El-Sayed, A.; Estoepangestie, A.T.S.; Lammler, C.; Weiss, R.; Siebert, U. 2005. Phenotypic and genotypic properties of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* isolated from harbour seals (*Phoca vitulina*) from the German North Sea during the phocine distemper outbreak in 2002. *Vet. Microb.* 110: 147-152.
- Alba, H. F. 1994. Manual de laboratorio de parasitología. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, división de ciencias biológicas, sección de ciencias de la salud animal. Universidad Nacional Autónoma de México. 181 p.
- Alber, J.; El-Sayed, A.; Lämmler, C.; Hassan, A.A.; Vossen, A.; Siebert, U. 2004. Determination of species-specific sequences of superoxide dismutase A encoding gene *cpn60* for identification and phylogenetic analysis of *Streptococcus phocae*. *Vet., Microbiol.* 101: 117-122.
- Anderson, R. C. 2000. Nematode parasites of vertebrates. Their development and transmission. 2nd edition. CABI Publishing. E.E.U.U.
- Anderson, R. M. & May, R. M. 1979. Population biology of infectious diseases: Part I. *Nature.* 280 (2): 361-460.
- Anderson, R. M. & May, R. M. 1991. Infectious diseases in humans. Dynamics and control. Oxford University Press.

- Austin, B. 1988. Marine microbiology. Cambridge University Press. 221 pp.
- Aznar, F.J.; Raga, J.A.; Corcuera, J.; Monzón, F. 1995. Helminths as biological tags for Franciscana (*Pontoporia blainvillei*) (Cetacea, Pontoporiidae) in Argentinian and Uruguay waters. *Mammalia*. 59 (3): 427-435.
- Azpiri, G. S.; Maldonado, F. G.; González, G. C. 2000. La importancia del estudio de las enfermedades en la conservación de la fauna silvestre. *Vet. Mex.* 31(3): 223-230.
- Azusa, U.; Kawakami, Y.; Matsui, T.; Araki, J.; Uchida, A. 2006. Molecular identification of *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) from fish and cetacean in Japanese waters. *Parasitol. Intern.* 55: 267-271.
- Baillie, J.E.M.; Hilton-Taylor, C.; Stuart, S.N. (Editors). 2004. 2004. Red List of Threatened Species. A Global Species Assessment. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, U.K. (<http://www.iucnredlist.org>).
- Baker, N. A.; Duignan, J.; Norman, R. J. B. 2001. A juvenile Hector's beaked whale, *Mesoplodon hectori* (Gray, 1871), without functional throat grooves, plus notes on endoparasites (Cetacea: Ziphiidae). *Mar. Mamm. Sci.* 17 (1): 171-175.
- Birkun, A. Jr., 2002. Natural mortality factors affecting cetaceans in the Black Sea. En: G. Notarbartolo di Sciara (Ed.), *Cetaceans of the Mediterranean and Black Seas: state of knowledge and conservation strategies*. A report to the ACCOBAMS Secretariat, Monaco, February, 2002. Section 16, 13p.
- Bracht, A.J.; Brudek, R.L.; Ewing, R.Y.; Manire, C.A.; Burek, K. A.; Rosa, C.; Beckmen, K.B.; Maruniak, J. E.; Romero, C.H. 2006. Genetic identification of novel poxvirus of cetaceans and pinnipeds. *Arch. Virol.* 151: 423-438.
- Broad, J. 1983. Cattle Plague in Eighteenth-Century England. *Agricultural History Review* 32(2): 104–115.
- Brooks, D. R.; McLennan, D. A.; León-Regagnon, V., & Hoberg, E. 2006. Phylogeny, ecological fitting and lung flukes: helping solve the problem of emerging infectious diseases. *Rev. Mex. Biodiv.* 77: 225-233.
- Brown, T. A. (Ed). 2006. Gene cloning & DNA analysis. An introduction. 5th edition. Blackwell Publishing. U.K.
- Brownell, L. R. Jr. 1986. Distribution of the vaquita (*Phocoena sinus*). *Mar. Mamm. Science.* 2(4): 299-304.

- Buck, D. J.; Spotte, S. 1986. The occurrence of potentially pathogenic vibrios in marine mammals. *Mar. Mamm. Science*. 2(4):319-324.
- Buck, D. J.; Wells, S. R.; Rhinehart, L. H.; Hansen, J. L. 2006. Aerobic microorganisms associated with free-ranging bottlenose dolphins in coastal Gulf of Mexico and Atlantic Ocean waters. *J. Wildlife Dis.* 42 (3): 536-544.
- Burek, K.A.; Beckmen, K.; Gelatt, T.; Fraser, W.; Bracht, A.J.; Smolarek, A.K.; Romero, C.H. 2005. Poxvirus infection of Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*). *J. Wildl. Dis.* 41(4): 745-752.
- Bush, O. A.; Fernández, C. T.; Esch, W. G.; Seed, R. J. 2001. Parasitism. The diversity and ecology of animal parasites. Cambridge University. 576 pp.
- Castinel, A.; Duignan, P.J.; Pomroy, W.E.; Lyons, E.T.; Nadler, S.A.; Dailey, M.D.; Wilkinson, I.S.; Chilvers, B.L. 2006. First report and characterization of adult *Uncinaria* spp. in new Zealand Sea Lion (*Phocartos hookeri*) pups from the Auckland islands, New Zealand. *Parasitol. Res.* 98: 304-309.
- Chen, C. C., Teng, L. J., Kaiung, S., Chang, T. C. 2005. Identification of clinically relevant Viridians Streptococci by an Oligonucleotide Array. *J. Clin. Micr.* 43 (4): 1515-1521.
- Citron, M. K. 1975. Respiratory fungus allergy and infection. *Sect. of Clin. Immun. & Allergy.* 68: 587-591.
- Cloeckaert, A.; Grayon, M.; Grépinet, O. & Boudemine, K. S. 2003. Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals by infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification tests. *Microbes and Infection.* 5: 593-602.
- Cowan, D. F.; House, C. & House, J. A. 2001. Public health. In: Dierauf, L. A.; Gulland, D. M. (Eds) CRC Handbook of marine mammal medicine. 2nd edition. CRC Press. 1063 p.
- Coykendall, A.L. 1989. Classification and identification of the Viridians Streptococci. *Clin. Micr. Rev.* 2 (3): 315-328.
- Cunningham, A. A. 1996. Disease risks of wildlife translocations. *Conserv. Biol.* 10 (2): 349-353.
- Cunningham, A. A.; Daszak, P. 1998. Extinction of a species of land snail due to infection with a microsporidian parasite. *Conserv. Biol.* 12: 1139-1141.

- Cunningham, A. A.; Garner, T. W. J.; Aguilar-Sánchez, V.; Banks, B.; Foster, J.; Sainsbury, A. W.; Perkins, M.; Walker, S. F.; Hyatt, A. D.; Fisher, M. C. 2005. Emergence of amphibian chytridiomycosis in Britain. *Vet. Rec.* 157: 386-387.
- Dailey, D. M.; Otto, A. K. 1982. Parasites as biological indicators of the distributions and diets of marine mammals common to the Eastern Pacific. Administrative report. Southwest Fisheries Center. NOAA. 44 pp.
- Dailey, D. M.; Vogelbein, K.W. 1991. Parasite fauna of three species of Antarctic whales with reference to their use as potential stock indicators. *Fish. Bull.* 89 (3): 355-365.
- Dailey, D.M.; Walker, A.W. 1978. Parasitism as a factor (?) in single strandings of Southern California cetaceans. *J. Parasitol.* 64 (4): 593-596.
- Dailey, M. D. 2001. Parasitic diseases. En: Dierauf, L. A.; Gulland, D. M. (Eds). CRCR Handbook of marine mammal medicine. 2nd edition. CRC Press. 357-374.
- Daszak, P.; Cunningham, A. A. & Hyatt, A. D. 2001. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Tropica.* 78: 103-116.
- Daszak, P.; Cunningham, A. A. 1999. Extinction by infection. *Tree.* 14 (7): 279.
- Daszak, P.; Cunningham, A. A.; Hyatt, A. D. 2000 Emerging infectious diseases of wildlife-threats to biodiversity and human health. *Science.* 287: 443-449.
- Debeaumont, C.; Falconnet, A. P.; Maurin, M. 2005. Real-time PCR for detection of *Brucella* spp. in human serum samples. *Eur. J. of Clin. Microb. & Infec. Dis.* 24 (12): 842-845.
- Del Ángel, R., J., A. 1997. Hábitos alimentarios y distribución espacio temporal de los rorcuales común (*Balaenoptera physalus*) y azul (*Balaenoptera musculus*) en la Bahía de la Paz, B.C.S., México. Tesis de Maestría. CICIMAR. 68 pp.
- Dubey, J. P.; Fair, A. P.; Bossart, D. G.; Hill, D.; Fayer, R.; Sreekumar; Kwok, O.C.H.; Thulliez, P. 2005. A comparison of several serologic tests to detect antibodies to *Toxoplasma gondii* in naturally exposed bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *J. Parasitol.* 91(5): 1074-1081.
- Duignan, J. P.; Geraci, R. J.; Raga, J.A.; Calzada, N. 1992. Pathology of Morbillivirus infection in Striped Dolphins (*Stenella coeruleolaba*) from Valencia and murcia, Spain. *C. J. Vet. Res.* 56: 242-248.
- Duignan, J. P.; House, C.; Geraci, R. J.; Early, G.; Copland, G. H.; Walsh, T. M.; Bossart, D. G.; Cray, C.; Sadove, S.; St aubin, J. D.; Moore, M. 1995. Morbillivirus infection in two

- species of pilot whales (*Globicephala sp.*) from the western Atlantic. *Mar. Mamm. Science*. 11(2): 150-162.
- Dunn, C. B., 2006. Viruses as pathogens of marine organisms - from bacteria to whales. *J. Mar. Biol. Ass. Review*.
- Dunn, L. J.; Buck, J. D.; Robeck, T. R. 2001. Bacterial diseases of cetaceans and pinnipeds. In: Dierauf, L. A., Gulland, D. M. (Eds) CRC Handbook of marine mammal medicine. 2nd edition. CRC Press. 309- 328 pp.
- Dybas, C. L. 2001. Sea sickness. *Wildlife Conservation*. 104 (6). 8-10.
- Fernández, M.; Berón-Vera, B.; Raga, J.A.; Crespo, A. E. 2003. Food and parasites from two Hourglass dolphins (*Lagenorhynchus cruciger*) (Quoy and Gaimard, 1824), from Patagonian waters. *Mar. Mamm. Science*. 19 (4): 832-836.
- Foster, G.; MacMillan, A. P.; Godfroid, J.; Howied, F.; Ross, H. M.; A. Cloeckert, E. A.; Reida, R. J.; Brew, S. B.; Patterson, A. I. P. 2002. A review of *Brucella sp.* Infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. *Vet. Microb.* 90: 563-580.
- Gargas, A. & DePriest, P. T. 1996: A nomenclature for fungal PCR primers with examples from intron-containing SSU rDNA. *Mycologia* 88: 745-748.
- Garner, J. W. T.; Perkins, W. M.; Govindarajulu, P.; Seglie, D.; Walker, S.; Cunningham, A. A.; Fisher, C. M. 2006. The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biol. Lett.* 2: 455-459.
- Gaskin, D.E. 1976. The evolution, zoogeography and ecology of cetacean. *Oceanogr. and Mar. Biol. Ann. Rev.* 14: 247-346.
- Gaydos, J. K.; Conrad, P. A.; Gilardi, K. V. K.; Blundell, G. M. & Merav, B-D. 2007. Does human proximity affect antibody prevalence in marine-foraging river otters (*Londra canadensis*)? *J. Wildlife Dis.* 43 (1): 116-123.
- Gendron L. D. 1990. Relación entre la abundancia de eufáusidos y de ballenas azules (*Balaenoptera musculus*) en el Golfo de California. Tesis de Maestría. CICIMAR. 64 pp.

- Gendron L. D. 1993. Índice de avistamientos y distribución del género *Balaenoptera* en el Golfo de California, México, durante febrero, marzo y abril 1988. *Revista Investigaciones Científicas* Vol. I (No. Esp. SOMEMMA 1), U.A.B.C.S. 21-30.
- Gendron, D., Aguñiga, S.; Carriquiry, J.D. 2001. $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ in skin biopsy samples: a note on their applicability for examining the relative trophic level in three rorqual species. *J. Cetacean Res. Manage.* 3(1):41-44.
- Gendron, L. D. 2002. Ecología poblacional de la Ballena azul (*Balaenoptera musculus*) de la península de Baja California. Tesis de Doctorado. CICESE, Ensenada, B.C. 112p.
- Geraci, J. R.; Harwood, J. & Lounsbury, V. J. 1999. Marine mammal die-offs. En: J. R. Twiss & R. R. Reeves (Eds). *Conservation and management of marine mammals*. 367-395.
- Geraci, J. R.; Ridgway, S. H. 1991. On disease transmission between cetaceans and humans. *Mar. Mamm. Sc.* 7(2): 191-194.
- Goddard, D. P.; Rugh, J. D. 1998. A group of right whales seen in the Bering Sea in July 1996. *Mar. Mamm. Science.* 14(2): 344-349.
- Godfroid, J., Clockaert, A., Liautard, J-P., Kohler, S., fretin, D., Walravens, K., Garin-Bastuji, B., Letesson, J-J. 2005. From the discovery of the Malta's fever agent to the discovery of a marine reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet. Res.* 36: 313-326.
- Gómez-Gutiérrez, J.; Robinson, J. C.; Kawaguchi, S.; Nicol, S. 2009. Comparison of the parasite diversity assemblages of two numerically dominant euphausiids along the Northwestern coast of Mexico (en prensa).
- González -Solís, D., Vidal-Martínez, V.M., Antochiw-Alonso, D.M., Ortega-Argueta, A. 2006. Anisakid nematodes from stranded pygmy sperm whales, *Kogia breviceps* (*Kogiidae*), in three localities of the Yucatan Peninsula, Mexico. *J. Parasit.* 92 (5): 1120-1122.
- Guardo, G. D.; Marruchella, G.; Agrimi, U.; Kennedy, S. 2005. Morbillivirus infections in aquatic mammals: a brief overview. *J. Vet. Med. A* (52): 88-93.
- Gulland, F. M.; Hall, A. J. 2005. The role of infectious diseases in influencing status and trends. En: Reynolds, J. E.; Perrin, W. F.; Reeves, R. R.; Montgomery, S.; Ragen, T, J. (Eds): *Marine Mammal Research. Conservation beyond crisis*. The Johns Hopkins University Press. U.S.

- Hall, J.A.; Wells, S.R.; Sweeney, C.J.; Townsend, I.F.; Balmer, C.B.; Hohn, A.A.; Rhinehart, L.H. 2007. Annual, seasonal and individual variation in hematology and clinical blood chemistry profiles in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from Sarasota Bay, Florida. *Comp. Biochem. & Physiol. Part A* (148): 266-277.
- Han Goh, S.; Drieger, D.; Gillet, S.; Low, E. D.; Hemmingsen, M. S.; Amos, M.; Chan, D.; Lovegren, M.; Willey, M. B.; Shaw, C.; Smith, A. J. 1998. *Streptococcus iniae*, a human and animal pathogen: Specific identification by the chaperonin 60 gene identification model. *J. Clin. Microb.* 36 (7): 2164-2166.
- Harding, K. C.; Haerkoenen, T & Caswell, H. 2002. The 2002 European seal plague: epidemiology and population consequences. *Ecol. Lett.* 5 (6): 727-732.
- Harvell, C. D.; Mitchell, C. E.; Ward, J. R.; Altizer, S.; Dobson, A.P.; Ostfeld, R. S.; Samuel, M. D. 2002. Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science*. 296: 2158-2162.
- Harwood, J. 2000. Mass die-offs. En: F. W., Perrin; Wursig, B. & Thewissen, J. G. M. *Encyclopedia of marine mammals*. Academic Press. 724-726.
- Hernández-Castro, R.; Martínez-Chavarría L.; Díaz-Avelar, A.; Romero-Osorio, A.; Godínez-Reyes, C; Zavala-González, A.; Verdugo-Rodríguez, A.2004. Aerobic bacterial flora of the nasal cavity of Gulf of California sea lion (*Zalophus californianus*) pups. *The Veterinary Journal* 170: 359-363.
- Hudson, J. P.; Rizzoli, A.; Grenfell, T. B.; Heesterbeek, H.; Dobson, P. A. (Eds). 2002. *The ecology of wildlife diseases*. Oxford University Press. 218 pp.
- Hugh-Jones, H. M.; Hubbert, T. W.; Hagstad, V. H. 1995. *Zoonoses. Recognition, control and prevention*. First edition. Iowa State Press. US.
- Hykin, K.; Tobal, G.; McIntyre.; Matheson, H.M.; Towler, H. M.; Lightman, S. 1994. The diagnosis of delayed post-operative endophthalmitis by polymerase chain reaction of bacterial DNA in vitreous samples. *J. Med. Microbiol.* 40: 408-415.
- Jackson, C.J., Marcogliese, D.J., Burt, M.D.B. 1997. Role of hyperbenthic crustaceans in the transmission of marine helminth parasites. *Can. J. Fish. Aqu. Sci.* 54 (4): 815-820.
- Jaume-Shinckel. M. S. 2003. Hábitos alimentarios del rorcual común *Balaenoptera physalus* en el Golfo de California mediante el uso de isótopos estables de nitrógeno y

carbono. Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. IPN. La Paz, B.C.S. México.

- Kannan, K.; Tanabe, S.; Borrell, A.; Aguilar, A.; Focardi, S.; Tatsukawa, R. 1993. Isomer-specific analysis and toxic evaluation of polychlorinated biphenyls in striped dolphins affected by an epizootic in the western Mediterranean sea. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 25: 227-233.
- Kelly, T.R.; Graig, D.; Colegrove, K.M.; Lowenstine, I.J.; Dailey, M.; Gulland, F.M.; Haulena, M. 2005. Metastrongyloid nematode (*Otostrongylus circumlitus*) infection in a stranded California Sea Lion (*Zalophus californianus*)- a new host-parasite association.
- Kennedy-Stoskopf, S. 2001. Viral diseases. En: Dierauf, L. A.; Gulland, D. M. (Eds). CRCR Handbook of marine mammal medicine. 2nd edition. CRC Press. 285-303.
- Keymer, A. E.; Read, A. F. 1990. The evolutionary biology of parasitism. *Parasitology today.* 6 (1): 2-3.
- Konno ,M.; Shunkichi, B., Mikawa, H., Hara, K., Matsumoto, F., Kaga, K., Nishimura, T., Kobayashi, T., Furuya, N., Moriyama, H., Okamoto, Y., Furukawa, M., Yamanaka, N., Matsushima, T., Yoshizawa, Y., Kohno, S., Kobayashi, K., Morikawa, A., Koizumi, S., Sunakawa, K., Inoue, M., Ubukata, K. 2006. Study of upper respiratory tract bacterial flora: first report. Variations in upper respiratory tract bacterial flora in patients with acute upper respiratory tract infection and healthy subjects and variations by subject age. *J. Infect. Chemother.* 12:83-96.
- Kouyos, D. R.; Salathé, M.; Bonhoeffer, S. 2007. The Red Queen and the persistence of linkage-disequilibrium oscillations in finite and infinite populations. *BMC Evolutionary biology.* 7: 211.
- KuKanich, B.; Papich, M.; Huff, D. & Stoskopf, M. 2004 Comparison of amikacin pharmacokinetics in a killer whale (*Orcinus orca*) and a beluga whale (*Delphinapterus leucas*). *J. Zoo Wildl. Med.* 35: 179-184.
- Kutz, S. J.; Hoberg, E. P.; Polley, L. & Jenkins, E. 2005. Global warming is changing the dynamics of Arctic host-parasite systems. *Proceed. Roy. Soc. B.* 272: 2571-2576.
- Lafferty, K. D. & Gerber, L. H. 2002. Good medicine for conservation biology: the intersection of epidemiology and conservation theory. *Conserv. Biol.* 16 (3): 593-604.

- Lawson, A. P.; Foster, G.; Falsen, E.; Collins, M. D. 2005. *Streptococcus marinammalium* sp. Nov. isolated from seals. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* 55: 271-274.
- Lee Miller, D.; Ewing, R. E.; & Bossart, G. D. 2000. Emerging and resurging diseases. En: Dierauf, L. A., Gulland, D. M. (Eds) CRC Handbook of marine mammal medicine. 2nd edition. CRC Press. 1063 p.
- Lou Jones, M.; Schwartz, L. S. 2000. Gray whale. En: Perrin, F. W.; Wursig, B.; Thewissen, M. G. J. Encyclopedia of marine mammals. Academic Press. 1414 pp.
- Madden, T. 2003. The BLAST Sequence Analysis Tool. The NCBI Handbook (en línea). (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).
- Marigo, J.; Rosas, C.W.F.; Andrade, V.A.L.; Oliveira, R.M.; Dias, A.R.; Catão-Dias, J.L. 2002. Parasites of Franciscana (*Pontoporia blainvillei*) from São Paulo and Paraná States, Brazil. *LAJAM*. 1(1): 115-122.
- Martínez, S. I. 2005. Patrón de asociaciones entre individuos de ballena azul (*Balaenoptera musculus*) en el suroeste del Golfo de California, México. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN.
- McAlpine, F. D.; Murison, D. L.; Hoberg, p. E. 1997. New records for the pigmy sperm whale, *Kogia breviceps* (*Physiteridae*) from Atlantic Canada with notes on diet and parasites. *Mar. Mamm. Sci.* 13 (4): 701-704.
- McCallum, H., Dobson, A. 1995. Detecting disease and parasite threats to endangered species and ecosystems. *Tree*. 10:5. 190-193.
- McCallum, H; Harvell, D.; Dobson, A. 2003. Rates of spread of marine pathogens. *Ecology Letters*. 6: 1062-1067.
- Mejía-Acosta, S. J. 2003. Dieta de la ballena azul *Balaenoptera musculus* (Cetacea: *Balaenopteridae*) en aguas adyacentes a la península de Baja California, con base en el análisis de contenido fecal. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas. Ensenada, B.C., México.
- Méndez, O. 2002. Helmintos gastrointestinales del lobo marino de California *Zalophus californianus* (Lesson, 1828, Allen, 1880), en los Islotes, Bahía de La Paz, B.C.S., México. Tesis de Licenciatura. UABCS. México. 78 pp.

- Mignucci-Gianonni, A. A.; Hoberg, P. E.; Siegel-Causey, D.; Williams, H. E. Jr. 1998. Metazoan parasites and other symbionts of cetaceans in the Caribbean. *J. Parasitol.* 84 (5): 939-946.
- Mullis K.; Faloona F.; Scharf S.; Saiki R.; Horn G. & Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51(1): 263-273.
- Munguía-Vega, A. 2002. Estudio del complejo principal de histocompatibilidad en la historia evolutiva y demográfica de la vaquita (*Phocoena sinus*). Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, Baja California Sur., México. 133 pp.
- Nadler, S.A.; D'Amelio, S.; Dailey, M.; Paggi, L.; Siu, S.; Sakanari, J. A. 2005. Molecular phylogenetics and diagnosis of *Anisakis*, *Pseudoterranova* and *Contyrracaecum* from Northern Pacific Marine Mammals. *Journal of Parasitology.* 91(6): 1413-1429.
- Navone., T. G.; Gamboa, I. M.; Kozubsky, E. L.; Costas, E. M.; Cardozo, S. M.; Sisliauskas, N. M.; González, M. 2005. Estudio comparativo de recuperación de formas parasitarias por tres diferentes métodos de enriquecimiento coproparasitológico *Parasitol. Latinoam.* 60: 178-181.
- Neale, J. C. C.; Gulland F. M. D.; Schmelzer K. R.; Harvey J. T.; Berg E. A.; Allen S. G.; Greig D. J.; Grigg E. K. & Tjeerdema R. S. 2005. Contaminant loads and hematological correlates in the harbor seal (*Phoca vitulina*) of San Francisco Bay, California. *J. Toxic. Environm. Health A* (68): 617-633.
- Nizet, V. 2002. Streptococcal β -hemolysins: genetics and role in disease pathogenesis. *Trends in Microbiol.* 10 (12): 575-579.
- Noble, R. E.; Noble, A. G. 1982. Parasitology. The biology of animal parasites. 5th edition. Lea & Febiger. Philadelphia. 522 pp.
- O'Leary, W. 1990. Practical handbook of Microbiology. CRC Press.
- Pelczar, M.J.Jr.; Reid, R.D.; Chan, E.C.S. 1977. Microbiology. 4th edition. McGraw-Hill Book Company.
- Poyart, C.; Quesne, G.; Coulon, S.; Berche, P.; Trieu-Cuot, P. 1998. Identification of Streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide-dismutase. *J. Clin. Microbiol.* 36 (1): 41-47.

- Pritzlaff, A. C.; Chang, C.W.J.; Kuo, S.P.; Tamura, S.G.; Rubens, E.C.; Nizet, V. 2001. Genetic basis for the β -haemolytic/citolytic activity of group B *Streptococcus*. *Molec. Microbiol.* 39 (2): 236-247.
- Quijada, J.; Lima dos Santos, C.; Avdalov, N. 2005. Enfermedades parasitarias por consumo de pescado. *Inc. Am. Latina.* 24:1-10.
- Raga, J.A.; Aznar, F, J.; Balbuena, J. A.; Fernandez, M. 2002. Parasites. En: Perrin, F. W.; Wursig, B.; Thewissen, M. G. J. Encyclopedia of marine mammals. Academic Press. 1414 pp.
- Real, L. A. 1996. Sustainability and the ecology of infectious disease. *BioScience.* 46(2): 88-97.
- Reddy M. L.; Dierauf L. A. & Gulland F. M. D. 2001. Marine mammals as sentinels of ocean health. En: CRC Handbook of Marine Mammal Medicine. Dierauf, L., Gulland F. (eds.) 2nd edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 1063 p.
- Reidarson, T. H.; McBain, J. F.; Dalton, L. M. & Rinaldi, M. G. 2001. Mycotic diseases. En: CRC Handbook of Marine Mammal Medicine. Dierauf, L., Gulland F. (eds.) 2nd edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 357-374.
- Rice, D.; Wolman, A.A. 1971. Life History and Ecology of the Gray Whale (*Eschrichtius robustus*). American Society of Mammalogy. Special publication No. 3. 142 pp.
- Rocha, G. A. 2005. Las enfermedades transmisibles entre los mamíferos marinos y los humanos (Zoonosis). Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. U.N.A.M. 247 pp.
- Russell, D. G.; McGregor, W. M.; Zarnke, L. R.; Olsen, W. C. 1998. Serologic evidence of influenza virus infection in a ringed seal (*Phoca hispida*) from Alaska. *Mar. Mamm. Science.* 14(2): 380-383.
- Saliki, J. T.; Cooper, E. J.; Gustavson, J. P.; 2002. Emerging Morbillivirus infections of marine mammals. Development of two diagnostic approaches. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 969: 51-59
- Sambrook, J. E. F.; Fritsch, T. & Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.

- Sambrook, J.; Russell, W. D. 2001. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sandhu, S. G.; Kline, C. B.; Stockman, L.; Roberts, G. 1995. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J. Clin. Microbiol.* 33 (11): 2913-1919.
- Scammon, C.M. 1869. On the cetaceans of the Western United States of North America. *Proceeding of the Academy natural Science of Philadelphia*. 13-62.
- Scott, M. E. 1988. The impact of infection and disease on animal populations: Implications for conservation biology. *Conserv. Biol.* 2:1. 40-55.
- Simmonds, M. P. & Isaac, S. J. 2007. The impacts of climate change on marine mammals: early signs of significant problems. *Oryx*. 41(1): 19-26.
- Smith, J.W. 1971. *Thysanoessa inermis* and *T. longicaudata* (Euphausiidae) as first intermediate hosts of *Anisakis* sp. (Nematoda: Ascaridata) in the northern North Sea, to the north of Scotland and at Faroe. *Nature*. 234 (5330) 478.
- Smith, K. F.; Acevedo-Whitehouse, K.; & Pedersen, A. B. 2009. The role of infectious diseases in biological conservation. *Animal Conservation*. 12: 1-12.
- Smith, W., Vedros, A. N., Akers, G., Gilmartin, W. G. 1978. Hazards of disease transfer from marine mammals to land mammals: Review and recent findings. *JAVMA*. 173 (9): 1131-1133.
- Swenshon, M.; Lammler, C. & Siebert, U. 1998. Identification and molecular characterization of Beta- Haemolytic Streptococci isolated from Harbour Porpoises (*Phocoena phocoena*) of the North and Baltic Seas. *J. of Clin. Microb.* 36 (7): 1902-1906.
- Trejejo, R. T., Barr, M. C., Robinson, R. A. 2005. Important emerging bacterial zoonotic infections affecting the immunocompromised. *Vet. Res.* 36: 493-506.
- Tryland, M. 2000. Zoonoses of arctic marine mammals. *Infect. Dis. Rev.* 2 (2): 55-64.
- Turner, P. C. ; Mc Lennan, A. G. ; Bates, A. D. ; White, M. R. 2000. *Molecular Biology. DNA cloning*. BIOS Scientific Publishers.
- Tzanakaki, G. ; Tsopanomichalou, M. ; Kesanopoulos, K. ; Matzourani, R. ; Sioumala, M. ; Tabaki, A. ; Kremastinou, J. 2005. Simultaneous single-tube PCR assay for the detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae*. *Clin. Microbiol. Infect.* 11 : 386-390.

- Umehara, A. ; Kawakami, Y. ; Matsui, T. ; Araki, J. ; Uchida, A. 2006. Molecular identification of *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii* (Nematoda : Anisakidae) from fish and cetacean in Japanese waters. *Parasitol. Int.* 55 : 267-271.
- Urbán, R. J. 2000. Familia *Eschrichtidae.*, *Eschrichtius robustus* (Lilljeborg). En: S. T., Alvarez-Castañeda y L. J., Patton, Mamíferos del Noroeste de México. Centro de Investigaciones del Noroeste. 655-658.
- Van Bressem, M-F; Jepson, P; Barrett, T. 1998. Further insight on the epidemiology of cetacean morbillivirus in the northeastern Atlantic. *Mar. Mamm. Sci.* 14(3): 605-613 p.
- Van Waerebeek, K.; Reyes, C. J.; Alfaro, J. 1993. Helminth parasites and phoronts of dusky dolphins *Lagenorhynchus obscurus* (Gray, 1928) from Peru. *Aqu. Mamm.* 19 (3): 159-169.
- Van Valen, L. 1973. A new evolutionary law. *Evol. Theory.* 1: 1-30.
- Venn-Watson, S.; Rivera, R.; Smith, R. C.; Saliki,, T. J.; Caseltine, S.; St. Leger, J.; Yochem, P.; Wells, S. R.; Nollens, H. 2008. Exposure to Novel Parainfluenza Virus and clinical relevance in 2 bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) populations. *Emerg. Infect. Dis.* (serial on the internet). 14 (3): 397-405.
- Wolfe, N. D.; Daszak, P.; Marm K. A. & Burke, D. S. 2005. Bushmeat hunting, deforestation and prediction of zoonotic disease emergence. *Emerg. Infect. Dis.* www.cdc.gov/eid. 11(12): 1822-1827.
- Woolhouse, M. E, J.; Haydon, D. T.; Antia, R. 2002. Emerging pathogens: the epidemiology and evolution of species jumps. *Trends in Ecol. & Evol.* 20 (5): 238-244.
- Woolhouse, M. E. J.; Gowtage-Sequeira, S. 2005. Host range and emerging and re-emerging pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 11(12): 1842-1847.
- Young, M. N.; Shapiro, L. S. 2000. U.S. Federal Legislation Governing Marine Mammals. En : En: CRC Handbook of Marine Mammal Medicine. Dierauf, L., Gulland F. (eds.) 2nd edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 741-749.
- Zar, J. H. 1996. Biostatistical anaysis. 3rd edition. Prentice Hall, New Jersey.