

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

UTILIZACIÓN DE RT-PCR, ELISA Y CULTIVO
CELULAR PARA DETECTAR LA PRESENCIA DEL
VIRUS DE DISTEMPER EN LOBOS MARINOS DE
CALIFORNIA, EN SONORA.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

ELSA MARÍA CORIA GALINDO

Asesores:
MVZ Dr. en B. Antonio Verdugo Rodríguez
BIOL PhD Juan Pablo Gallo Reynoso

México D. F.

2005



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo estuvo financiado por los siguientes proyectos:

PAPIIT - IN205701 "Patogénesis molecular de la brucelosis: enfoque biotecnológico" del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

CONACYT - 400310-5-27669-B "Desarrollo de herramientas moleculares para el control de la salmonelosis aviar" del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

CIAD- MIRT (International Research Training Program), University of California Santa Cruz.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

**“Utilización de RT-PCR, Elisa y cultivo celular
para detectar la presencia del virus de distemper
en lobos marinos de California, en Sonora”**

T E S I S

que para obtener el título de:

Médica Veterinaria Zootecnista

Presenta

Elsa María Coria Galindo



Asesores:

MVZ PhD Antonio Verdugo Rodríguez
BIOL PhD Juan Pablo Gallo Reynoso

México, D.F., 2005

Dedico este trabajo...

A mis Padres, con mucho cariño, por ser un ejemplo a seguir y por creer siempre en mi.

A Janitzio con todo mi amor, eres un ser maravilloso.

A mi sobrina María Angélica.

A ellos... que me motivan a superarme cada día.

Agradecimientos

Agradezco infinitamente a mis Padres por brindarme parte de sus vidas, por darme todo lo que una hija necesita y por depositar su confianza en mi.

Gracias a ti, Janitzio, por tu enorme apoyo para realizar este trabajo, por todo tu amor, comprensión y tu enorme paciencia.

Agradezco a mis hermanas: Nany, Lara y Angélica, porque cada una me apoyo en su momento.

Agradezco a toda la Familia Egido Villarreal por estar siempre conmigo.

A Antonio Verdugo por abrirme las puertas del laboratorio para poder realizar mi tesis.

A Daniel Martínez que además de ser un gran amigo fue un pilar importante en este trabajo.

A Juan Pablo Gallo que además de mi asesor es un buen amigo, gracias por toda tu ayuda en el trabajo de campo.

Gracias Xóchitl por tu apoyo, tu amistad y comentarios a este trabajo.

Al Dr. Raymundo Iturbe por la ayuda y todas las facilidades brindadas en el Laboratorio de Virología.

Gracias Elvia Lazo, por tu ayuda y apoyo como Técnico Académico del laboratorio, por ser mi amiga y escucharme y animarme cuando lo necesitaba.

A la Sra. Francis que siempre me procuró y me apoyo con todo el material.

También quiero agradecer a mis compañeros del Laboratorio de Microbiología molecular: Alfredo por tu amistad y tus observaciones, Emma y A. Zarco por sus críticas, Marce por estar al pendiente, Osvaldo por su compañerismo, Héctor por tu ayuda en los cálculos. A Adolfo, Ilane, Adriana, Alma, Emilio, Julio, Alfonso por su amistad.

Agradezco a los miembros de mi jurado: Dra. Laura Patricia Noé Martínez, Dr. Francisco Basurto Alcántara, Dr. José Angel Gutiérrez Pabello y el Dr. Francisco Galindo Maldonado, por sus valiosas aportaciones a este trabajo.

Agradezco a Malena, por toda su ayuda en el trabajo de laboratorio y por ser una amiga.

También agradezco a Mirna Vicencio y Grisel Anaya por su ayuda en la elaboración del suero.

De igual manera, agradezco a las secretarias del Departamento: Rosalba, Lupita y en su momento la Sra. María Luisa, que me apoyaron cuando lo necesité.

Gracias a ellos, porque por ellos estoy donde estoy.

Por último agradezco a las personas interesadas en este trabajo, espero que sea de utilidad.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MATERIAL Y MÉTODOS	42
RESULTADOS	64
DISCUSIÓN	75
CONCLUSIONES	83
LITERATURA CITADA	84
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS.	
CUADRO 1	27
FIGURA 1-2	17-18
FIGURA 3	31
FIGURA 4-5	38-39
FIGURA 6	56
FIGURA 7	58
FIGURA 8	60
FIGURA 9	65
FIGURA 10	67
FIGURA 11-12	69-70
FIGURA 13-14	72-73

RESUMEN

CORIA GALINDO ELSA MARÍA. Utilización de RT-PCR, ELISA y cultivo celular para detectar la presencia del virus de Distemper en lobos marinos de California, en Sonora. (Bajo la dirección de: Dr. Antonio Verdugo Rodríguez y Dr. Juan Pablo Gallo Reynoso).

El virus de Distemper afecta a especies de las familias Canidae, Mustelidae, Procyonidae, Felidae y recientemente Phocidae. Se han reconocido dos nuevos Morbillivirus que afectan a mamíferos marinos, el virus de Distemper de fócidos y el Morbillivirus de cetáceos. El virus de Distemper de fócidos presenta reactividad cruzada con el virus de Distemper canino ya que están relacionados filogenéticamente. Se realizó un estudio preliminar para detectarlo en crías neonatos y hasta 5 meses de edad de lobo marino de California de vida libre. Se estandarizó una prueba serológica mediante un Inmunoensayo enzimático [*Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*] usando como antígeno de captura el virus de Distemper canino. Mediante esta prueba se analizaron 35 muestras de suero sanguíneo de crías de lobo marino y no se encontró evidencia de exposición al virus. Se colectaron 35 muestras anales y 35 muestras nasales de las cuales se obtuvo el ARN y se analizaron mediante la técnica de Transcripción reversa/reacción en cadena de la polimerasa [*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*] para identificar el material genético tanto del virus de Distemper canino como el de fócidos. No se obtuvo una amplificación evidente de las muestras, sin embargo, a partir de algunas hubo amplificación inespecífica, por lo que estas muestras se inocularon en cultivo celular para realizar el aislamiento. Después de realizar cuatro pases en células Vero se realizó la RT-PCR del monoestrato sin obtener amplificación alguna. Los resultados obtenidos mediante estas tres técnicas no evidenciaron la presencia del virus de Distemper en los lobos marinos.

1. Introducción

1.1 Distemper de focidos.

Los estudios sobre *Morbillivirus* en mamíferos marinos tuvieron un gran auge a partir de 1988, debido a una gran mortalidad de focas comunes (*Phoca vitulina*) en Europa, donde murieron cerca de 18,000 animales (aproximadamente el 60% de la población) y en menor proporción afectó también a las focas grises (*Halichoerus grypus*). Sin embargo, aunque inicialmente se aislaron *Herpesvirus* y *Picornavirus*, se determinó que éstos no fueron la causa principal de las muertes.

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9

Osterhaus, *et al.* detectaron anticuerpos contra el virus de Distemper canino [*Canine Distemper Virus (CDV)*] o un virus antigénicamente parecido, en muestras de focas de Holanda, Dinamarca, Alemania, Suecia y el Reino Unido. Estos investigadores analizaron muestras de focas tomadas en marzo de 1988 en Holanda, que resultaron negativas a CDV. Sin embargo, dos meses después las crías comenzaron a presentar signos clínicos semejantes a los producidos por CDV en perros, detectándoles anticuerpos neutralizantes contra este virus. La signología indicaba la afección del sistema respiratorio, gastrointestinal, nervioso y cutáneo. Así mismo, los hallazgos patológicos observados también eran similares a los producidos por CDV en perros, indicando la participación de este agente infeccioso o un *Morbillivirus* antigénicamente parecido. ¹

El aislamiento del virus se realizó inoculando suspensiones de bazo, pulmón y nódulos linfáticos intestinales en perros libres de patógenos específicos (SPF), los cuales desarrollaron signos clínicos como descarga nasal purulenta, fiebre y disnea a partir del día 8 postinoculación.^{2, 5} Se observaron efectos citopatogénicos característicos de Morbillivirus tanto en células mononucleares de sangre periférica de estos perros como en células renales de focas y por inmunofluorescencia indirecta fueron positivos a CDV.^{2, 3, 5} Finalmente, se confirmó la presencia de un Morbillivirus por la observación de nucleocápsides características por medio de microscopía electrónica.^{2, 5}

Los signos clínicos que presentaron las focas fueron similares a los producidos por el CDV tales como depresión, disnea, tos, secreción mucopurulenta ocular y nasal, temblores, abortos y congestión conjuntival, entre otras.^{6, 7} Por otro lado, los hallazgos a la necropsia como neumonía severa, encefalitis, uveitis, edema, enfisema interlobular y subpleural, linfonodos pulmonares aumentados de tamaño, hidropericardio, hidrotórax y queratitis, principalmente^{3, 6, 7, 10} y las lesiones histopatológicas como cuerpos de inclusión acidofílicos intra citoplasmáticos e intra nucleares en neuronas, astrocitos, células de la mucosa gástrica y del epitelio de transición de la vejiga, neumonía broncointersticial difusa, proliferación de neumocitos tipo II, formación de sincitios (células gigantes multinucleadas) en lumen alveolar, exudado serofibrinoso alveolar, encefalitis no supurativa desmielinizante, depleción linfocitaria, necrosis de bazo e infiltrado

mononuclear en lámina propia del intestino delgado, dermis y subcutis también fueron compatibles con los de una infección por CDV.^{3, 6, 7, 8, 10}

Posteriormente, se realizaron varios estudios antigénicos y bioquímicos para caracterizar a este virus; por hibridación se observó que compartía secuencias de los genes de la proteína de fusión (F) y de la fosfoproteína (P) de CDV, así como de la nucleoproteína (N) del virus de la peste de los pequeños rumiantes (PPRV) y del virus *rinderpest* (RV).^{11, 12, 13}

Se realizaron también inmunoprecipitaciones con proteínas de una gran variedad de Morbillivirus y con anticuerpos monoclonales, con lo cual se concluyó que este virus presentaba una mayor relación antigénica con el CDV que con el resto de los virus del género, pero con suficientes diferencias como para caracterizarlo como una nueva especie dentro del género Morbillivirus, por lo que Cosby propuso el nombre de virus de Distemper de focidos (*Phocine Distemper Virus*, PDV).^{11, 14}

Una de las pruebas que llevaron a cabo la mayoría de los investigadores que trabajaron con este virus fue la neutralización viral, utilizando en un inicio a CDV y posteriormente a PDV como antígeno. Esta prueba es muy utilizada en la caracterización viral y tiene algunas variantes como la neutralización directa con un anticuerpo unido a peroxidasa (NPLA).^{9, 14, 15, 16, 17, 18} Mediante esta técnica se analizaron sueros tanto de focas comunes como de focas grises, obteniendo

títulos elevados de anticuerpos neutralizantes contra ambos virus, sin embargo eran mayores los títulos contra PDV que contra CDV (títulos de 1280 y 50 respectivamente).^{15, 17}

Otra variante de neutralización la aplicaron Harder, *et al.* (1993), quienes utilizaron anticuerpos monoclonales ligados a peroxidasa que se unen al virus en células infectadas, identificando variaciones importantes entre CDV y PDV, suficientes para corroborar que se trataba de otra especie de virus.¹⁹

Mediante un inmunoensayo enzimático (ELISA) se determinó que la mayoría de los anticuerpos monoclonales contra las proteínas NP, P y F de CDV tienen reactividad cruzada contra PDV, debido a que comparten epítopes y secuencias de ácidos nucleicos.^{20, 21} Comparando las pruebas serológicas se demostró que ELISA es más sensible que la neutralización viral ya que el suero generalmente se usa a bajas diluciones, el suero a altas concentraciones puede ser citotóxico e inhibir la replicación celular obteniendo falsos positivos.^{6, 12}

En relación al análisis de las proteínas que componen a este virus, uno de los primeros estudios lo realizaron Rima, *et al.* en 1990, donde mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), demuestran que las proteínas de PDV son muy parecidas a las de CDV aunque difieren ligeramente en los pesos moleculares de las mismas, por ejemplo la proteína N es ligeramente más pesada que la de CDV y la del virus del

sarampión, y la fosfoproteína (P) tiene un peso molecular semejante a la del virus del sarampión, las cuales a su vez, son más ligeras que su homóloga de CDV.^{22, 23}

Al analizar más detalladamente las proteínas del virus PDV, se observó que una región del gen de la proteína H que posee un alto grado de similitud (69%) entre el virus del sarampión y el del rinderpest, también posee una alta similitud pero con la del virus de Distemper canino (72%).²⁴

Las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos varían ligeramente dependiendo del fragmento analizado, pero en general se informa que la similitud de la proteína H es de aproximadamente 70 % en aminoácidos, en la proteína N es de alrededor del 60 %, tanto que en la proteína P como en la M es del 78 %, mientras que en la F es de 72%.^{13, 23, 24, 25, 26, 27, 28}

Con base en toda esta información se determinó que no era una variante de Distemper canino y se clasificó como un nuevo miembro del género Morbillivirus, muy relacionado filogenéticamente con el CDV y se le dió el nombre de virus de Distemper de focidos (PDV), el cual fue rápidamente aceptado.^{13, 14, 23, 24, 28}

Osterhaus y Visser en los años de 1988 y 1989, respectivamente, inmunizaron a un grupo de focas comunes con una vacuna inactivada de Distemper canino, después de tres aplicaciones con intervalos de 7 días las desafiaron con el virus

del Distemper de fócidos, demostrando que la vacuna protegió al 100% de las focas.^{5, 29, 30, 31} Por esta razón Osterhaus, *et al.* (1992) evaluaron el potencial de esta vacuna, como un candidato para prevenir infecciones por Morbillivirus en la foca monje del Mediterráneo (*Monachus monachus*), la cual es una especie en peligro de extinción.²¹ También se intentó elaborar una vacuna oral por medio de un virus vector recombinante que expresaba la proteína F pero no se detectaron anticuerpos contra el virus, por lo que fue descartada como una posibilidad para proteger a la población de focas silvestres.³²

Hass, *et al.* (1991), detectaron el ácido ribonucleico (ARN) de este virus en muestras de tejido de las focas enfermas, por medio de transcripción reversa/reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) usando dos iniciadores específicos para el gen de la proteína P del virus del Distemper de fócidos, amplificando un fragmento de 245 pares de bases (pb). De igual manera Barrett y col. en 1992 amplificaron un fragmento de 600 pb del mismo gen con otro juego de iniciadores.^{13, 33} Estos fueron los primeros análisis moleculares realizados con este virus y dieron inicio a toda una gama de trabajos de esta índole.

Por otro lado, el brote de PDV que inició en Dinamarca en abril de 1988, se diseminó hacia el Mar del Norte y el Mar Báltico en los siguientes meses llegando hasta Noruega.^{34, 35} A pesar de lo anterior, se demostró que las focas arpa (*Phoca groenlandica*) del Mar de Barents y de la costa Oeste de Groenlandia tuvieron contacto con el PDV antes del brote de 1988, ya que presentaban

anticuerpos contra el virus, lo que explica la baja morbilidad en esta especie. Además, las focas arpa del Mar de Barents y West Ice migraron más al sur de lo normal en 1987 y 1988 hacia costas Danesas y de Noruega, teniendo contacto con la población de focas comunes con las cuales normalmente no existía.³⁶

En Canadá se analizaron sueros tanto de focas comunes y grises como de morsas (*Odobenus rosmarus*), encontrando altos títulos de anticuerpos neutralizantes contra PDV y en menor grado contra CDV.^{37, 38, 39} En esta zona coexisten diversas especies de focas como las arpa, comunes, grises y anilladas, lo cual podría significar un reservorio del virus en aguas canadienses, ya que se encontraron animales seropositivos a PDV en muestras tomadas entre 1973 y 1984 de focas de estas especies y se detectó particularmente una prevalencia elevada de anticuerpos neutralizantes en las focas arpa de esta zona.^{40, 41, 42}

En 1992 se encontraron focas comunes en Nueva York que presentaban signos respiratorios semejantes a los observados en las focas europeas en 1988. Las lesiones histopatológicas eran características de PDV y se encontraron anticuerpos contra el mismo.^{43, 44} Esto indica la tendencia del virus a dispersarse hacia el sur.⁴⁴

En Alemania se hicieron estudios sobre anticuerpos maternos en crías de foca común, encontrando una relación inversamente proporcional entre los títulos de anticuerpos y la edad de las crías, infiriendo una inmunidad humoral activa en las

madres que persistió incluso tres años después de la epizootia. ⁴⁵ De igual manera, en Holanda se detectaron anticuerpos en crías y juveniles de focas comunes y grises hasta 1992, lo cual sugiere que el virus se ha mantenido en las poblaciones de focas, transmitiéndose entre grupos vecinos por largos periodos y por el contrario, el virus prácticamente desapareció en el Reino Unido después del brote. ⁴⁶ De igual manera en Nueva Escocia, se encontraron anticuerpos contra PDV hasta 1993, con títulos más altos en las focas grises que en las focas comunes. Cabe hacer notar que en estas últimas no se detectaron anticuerpos contra las glicoproteínas de la envoltura del virus. ⁴⁷

Así mismo, en la Antártida en 1989, detectaron anticuerpos contra CDV en focas cangrejas (*Lobodon carcinophagus*) y focas leopardo (*Hydrurga leptonyx*) de la Península Antártica. Previamente se había registrado un brote de focas cangrejas en esta región, en 1955 las focas presentaron signos semejantes a los que se observaron en la epizootia de 1988 causada por PDV, las hembras abortaron y murieron cerca del 97 % de la población del lugar. Esto indica que una cepa de CDV o un virus muy cercano circula en el polo sur desde hace muchos años. ⁴⁸

Por otro lado, en el Océano Pacífico se analizaron muestras de focas comunes y nutrias marinas en las costas de E.U.A. en las cuales no se detectaron anticuerpos contra PDV ni CDV. ^{44, 49}

Casi paralelamente al brote de PDV en el Mar del Norte, en el Lago Baikal también se presentó una infección por Morbillivirus en focas siberianas (*Phoca sibirica*). En diciembre de 1987 murieron tres perros que presentaron signología característica de CDV, estos perros tuvieron contacto con las focas del Lago Baikal, días después se comenzaron a observar algunas focas con esta signología. Para octubre de 1988 ya habían muerto cientos de focas, de las cuales se obtuvo hibridación positiva con CDV y se encontraron anticuerpos contra este tanto por seroneutralización como por ELISA, al parecer toda la población de focas del Lago estuvo expuesta al virus y adquirieron inmunidad.^{50.}

⁵¹ Estudios serológicos y moleculares comparativos entre el PDV-1 (virus del Noroeste de Europa), el PDV-2 (virus del Lago Baikal) y CDV demostraron que el virus del Baikal era diferente al PDV y era muy parecido a CDV, además no se encontró una relación epidemiológica entre ésta y la de Europa, por lo que se concluyó que era una cepa de CDV.^{6, 52, 53, 54}

Se realizaron algunos ensayos en donde se inocularon focas comunes con una cepa patógena de CDV (Snyder-Hill), éstas desarrollaron la signología observada en las focas de Europa y de Siberia, presentaron anticuerpos neutralizantes contra CDV y también reactivos contra PDV pero en menor grado (títulos de 640 y 80 respectivamente), sorpresivamente no detectaron transmisión horizontal del virus por contacto entre focas infectadas y sanas, además la patogenicidad del virus no aumentó en un segundo pase *in vivo* en las focas.⁵⁵

Las poblaciones de focas en Europa siguen estando en contacto con el virus PDV, en el 2002 se presentó otra mortalidad del 58%, lo que indica que la infección es recurrente, por lo que resulta muy importante identificar los reservorios del virus.⁵⁶

1.2 Morbillivirus de cetáceos.

Entre los cetáceos también se han presentado infecciones por Morbillivirus. En 1988 se encontraron marsopas (*Phocoena phocoena*) varadas en Irlanda del Norte. En la necropsia también se observaron lesiones sugerentes a una infección por Morbillivirus, muy similares a las que se habían observado en las focas de Europa y Siberia.⁵⁷ Kennedy, *et al.* (1988) identificaron un Morbillivirus en encéfalo, epitelio bronquial y vejiga urinaria por medio de inmunohistoquímica, las lesiones macro y microscópicas eran casi idénticas a las encontradas por Distemper en focas y en muchos mamíferos terrestres. Mediante anticuerpos monoclonales elaborados contra CDV se determinó que este virus de las marsopas era diferente al de las focas, aunque compartía epítopes o secuencias de ácidos nucleicos o ambos con CDV y RV.^{6, 57, 58, 59}

En el Océano Atlántico, entre 1987 y 1988, se presentó una mortalidad de toninas (*Tursiops truncatus*) en las costas de Nueva Jersey, Virginia y Florida en EUA, sucumbiendo la mitad de la población. A la necropsia se observaron lesiones

características a las producidas por Morbillivirus. Este fue el primer reporte de la enfermedad en cetáceos del Continente Americano.⁶⁰

En 1990 quedaron varados cientos de delfines (*Stenella coeruleoalba*) en el Mar Mediterráneo Español, la epizootia se diseminó en todo el Mediterráneo. Estos delfines presentaban neumonía y encefalitis, las lesiones macro y microscópicas también eran sugerentes a Morbillivirus, se observaron sincitios y cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos e intranucleares en bronquios y cerebro, por microscopía electrónica se observaron partículas virales características.^{61, 62, 63, 64}

Se realizó el aislamiento de ambos virus (el de marsopas y el de delfines) y se sometieron a análisis moleculares, los cuales demostraron que genéticamente eran diferentes al PDV y que eran distintos uno del otro, lo mismo se determinó mediante anticuerpos monoclonales, por lo que se consideraron dos especies nuevas dentro del género Morbillivirus. Se les asignaron los nombres de Morbillivirus de marsopas (*Porpoise morbillivirus*, PMV) y Morbillivirus de delfines (*Dolphin morbillivirus*, DMV).^{65, 66, 67, 68, 69} Estos virus son más cercanos filogenéticamente a los Morbillivirus que afectan a rumiantes (RV y PPRV) que a CDV y PDV, pero cruzan antigénicamente con estos últimos aunque en menor grado (33% menos).^{65, 66, 67, 68, 69, 70}

También hay evidencia de infección por Morbillivirus en toninas del Golfo de México, en costas estadounidenses, ya que se han encontrado delfines con lesiones características de la enfermedad, de los cuales se ha amplificado un

fragmento del gen P del virus DMV por RT-PCR. Además, hay informes de delfines seropositivos a CDV desde 1986 en esta región y la seroprevalencia continuó elevada en delfines del Océano Atlántico y el Golfo de México varios años después de la mortalidad, lo que indica que uno o varios Morbillivirus circulan en las poblaciones de delfines de varias especies.^{71, 72, 73, 74}

Se ha demostrado la presencia continua de Morbillivirus en mamíferos marinos del Mar Mediterráneo, ya que se sigue detectando al virus en tejido nervioso de delfines analizados durante mortalidades esporádicas.⁷⁵ Esto coincide con la patogenia de CDV en perros. Además, en 1997 murieron cerca de la mitad de la población de focas monje de las costas del Sahara en África, las lesiones eran sugerentes a CDV y presentaban anticuerpos contra éste, se aislaron dos morbillivirus muy cercanos a los de delfines y marsopas, por lo que se ha supuesto la transmisión de cetáceos a pinnípedos.⁷⁶

Se ha propuesto que cetáceos como los calderones (*Globicephala* sp.) podrían ser reservorios o transmisores del virus en el Océano Atlántico, ya que la prevalencia de anticuerpos neutralizantes es muy elevada en estas poblaciones mediante seroneutralización y se ha demostrado la presencia del virus en tejidos de calderones que se mantuvieron con la infección por varios años.^{77, 78}

En el Pacífico Sur, en las costas de Perú, también se han encontrado pequeños cetáceos con anticuerpos contra DMV, tales como, delfín común (*Delphinus*

capensis), tonina, delfín oscuro (*Lagenorhynchus obscurus*) y marsopa espinosa (*Phocoena spinipinnis*).⁷⁹ Mientras que en el Pacífico Norte, en las costas del sur de California en 1988, se informó de unos delfines comunes seropositivos a DMV de los cuales se amplificó el ARN viral por RT-PCR.⁸⁰

Algunos autores comienzan a considerar al DMV y PMV como un solo agente, por lo que se le ha llamado Morbillivirus de cetáceos (*Cetacean morbillivirus*, CMV), debido a que la similitud entre sus proteínas y ácidos nucleicos es elevada (90 a 94%) y la diferencia no es tal como para clasificarlos como especies separadas, sino como dos diferentes cepas del mismo virus.^{66, 81, 82}

Se han detectado anticuerpos contra Morbillivirus o la presencia de éste en una gran variedad de mamíferos marinos tales como ballenas, delfines, focas, morsas, manatíes, nutrias y osos polares.^{82, 83, 84, 85}

Hasta ahora existe sólo un reporte confirmado de Distemper en un lobo marino, el cual fue capturado en América del Sur y se mantuvo por varios años en cautiverio en Inglaterra; en junio de 1994 presentó signos nerviosos, los cuales se exacerbaban dos meses después y en junio del año siguiente murió. Mediante histoquímica y RT-PCR se demostró la presencia del virus exclusivamente en el encéfalo, el cual resultó ser una cepa de Distemper canino.⁸⁶

En los meses de febrero-marzo de 1999, hubo una mortalidad de lobos marinos de California en la isla San Jorge dentro del Golfo de California, los animales

presentaban cuadros clínicos de afección pulmonar. Se informó que había evidencia sugerente de una infección por morbillivirus, además de un calicivirus muy patógeno, por lo que la muerte parece ser multicausal.ⁱ

1.3 Características del virus de Distemper.

La enfermedad causada por el virus del Distemper canino fue descrita en 1905 por Carré. El Distemper o moquillo canino es una enfermedad altamente contagiosa en perros y otros carnívoros silvestres, aunque afecta a miembros de las familias Canidae, Mustelidae, Procyonidae, Felidae y recientemente a algunos de la familia Phocidae.^{87, 88, 89, 90, 91}

Esta es una enfermedad muy antigua, su distribución es mundial y cuando se presenta un brote produce altas mortalidades. Afecta principalmente a cachorros y a perros viejos, aunque se ha visto que animales adultos que no tienen inmunidad contra el virus también pueden contraerla. En estos últimos la infección puede cursar de manera subclínica siendo muy difícil diagnosticarla, además de que pueden diseminar el virus durante largos periodos.^{87, 88, 90}

Se ha controlado mediante la vacunación pero no se ha logrado erradicar debido a que las especies silvestres siguen diseminando el virus continuamente y entran

ⁱ Juan Pablo Gallo, 1999. Comunicación personal.

en contacto con animales domésticos, por lo que el virus se ha mantenido entre los perros.^{87, 88}

El virus de moquillo canino se inactiva en el medio ambiente con el calor y la luz. La vida media del virus es de una hora a 37° C, mientras que puede durar viable varios días o incluso semanas a 4° C. El virus resiste un pH de 4.5 a 9 y por otro lado se inactiva con la mayoría de los desinfectantes tales como el fenol y el hipoclorito de sodio.^{87, 91}

Los Morbillivirus pertenecen a la familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Paramyxovirinae* y al género *Morbillivirus*. Su material genético está formado por una cadena negativa simple de ARN, la cual está anclada en la Nucleoproteína.

Son virus envueltos, de forma semiesférica con partículas filamentosas, de un tamaño aproximado de 120-400 nanómetros (nm) y a diferencia de otros Paramyxovirus carecen de actividad neuroaminidasa.^{82, 87, 90, 91} El virus de Distemper canino está compuesto por 6 proteínas estructurales y dos no estructurales (Figura 1).

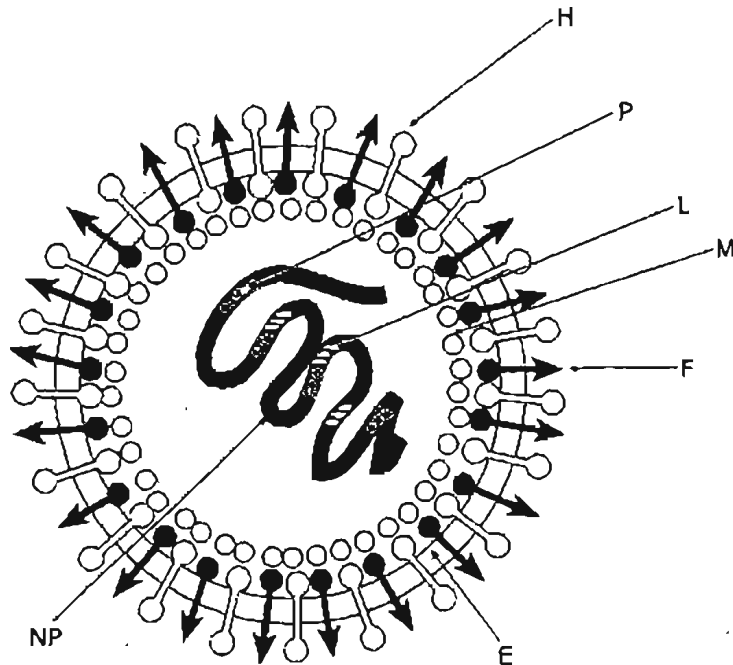


Figura 1. Estructura del virus de distemper canino donde se muestran las proteínas que lo conforman. (H, hemaglutinina; F, proteína de fusión; M, Proteína de matriz; E, envoltura; L, proteína grande; P, proteína polimerasa; NP, nucleocápside). Tomado y traducido de Greene CE. Infectious diseases of the Dog and Cat. 1998.

La nucleocápside tiene forma de helice, mide de 15 a 18 nm y está formada por tres proteínas que son la Nucleoproteína (NP), la Fosfoproteína (P) y la Polimerasa (L). La envoltura está formada a partir de la membrana de la célula huésped y contiene ancladas a dos proteínas virales, la proteína de Fusión (F) y la Hemaglutinina (H) que se encuentran en la superficie. La proteína de Matriz (M) interactúa con los dominios internos de las glicoproteínas de la envoltura y la nucleocápside manteniendo unidos todos los componentes dándole estructura y estabilidad a la partícula viral. ^{87, 89, 90, 91, 92, 93}

Las proteínas internas se acumulan formando los cuerpos de inclusión que se localizan en el núcleo, el citoplasma y productos procesados de la célula infectada, en cambio las proteínas externas o de la envoltura se localizan exclusivamente en el citoplasma. Es frecuente observar una acumulación perinuclear de proteína H. Se ha visto que la expresión de las proteínas internas es mayor que las externas.⁹³

La proteína F tiene un sitio de corte endoproteolítico que mediante la glicosilación se obtienen dos fragmentos, el F₁ y el F₂, lo cual es esencial para la activación.⁹⁴ También codifica para dos proteínas no estructurales, la C y la V, se producen en células infectadas y probablemente están involucradas en la regulación de la replicación viral.⁹²

Su genoma tiene un tamaño aproximado de 16 kilobases, está compuesto por seis genes los cuales tienen una secuencia definida de inicio y término entre cada uno (Figura 2).^{90, 92}

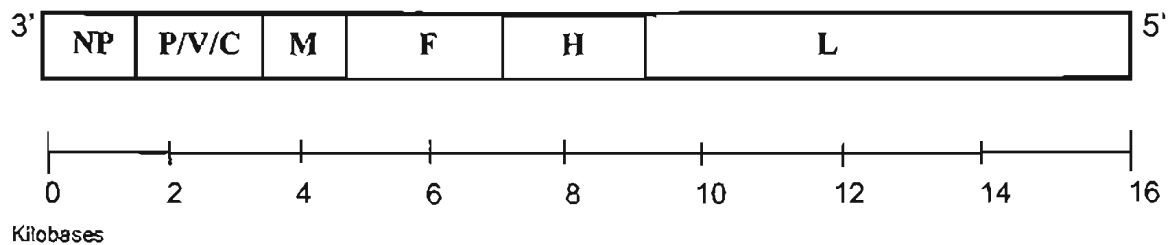


Figura 2. Distribución de los genes de los Morbillivirus.

El Gen N o NP es el más cercano al extremo 3' del genoma viral, codifica para una proteína de aproximadamente 60 kilodaltones (kDa), formada por 553 aminoácidos, la cual es multifuncional ya que la proteína N está involucrada en la replicación y en la protección del ARN viral formando una nucleocápside resistente a la acción de las RNasas. El extremo N-terminal es una secuencia muy conservada entre los virus de la familia *Paramyxoviridae* y es indispensable para el ensamblaje y encapsidación, por el contrario, el extremo C-terminal es hipervariable y contiene muchos sitios antigénicos.^{90, 95}

En los morbillivirus el gen N tiene una región extremadamente conservada a la mitad, una región medianamente conservada al inicio y como se mencionó antes, una muy poco conservada al final de la secuencia del gen.⁹⁶ La proteína N interactúa con el complejo de la polimerasa durante la replicación y con la proteína M en el ensamblaje viral. La transcripción y la replicación podrían estar mediados por la concentración de proteína N libre en el citoplasma.^{90,95}

El gen P es un ejemplo extraordinario de compactamiento de información genética dentro de un gen pequeño. Este gen codifica para varios polipéptidos usando marcos de lectura traslapados y lo que se conoce como edición del ARN, durante este proceso se insertan nucleótidos llevándose a cabo un cambio en el marco abierto de lectura (Open Reading Frames, ORF) y se genera uno alternativo, por lo tanto una nueva proteína es traducida. Tres diferentes ARN mensajeros (ARNm) se generan corriente abajo del sitio de edición, por lo que se traducen

tres diferentes proteínas con un segmento N-terminal común, la proteína P, proteína V y la C.^{95, 96}

La proteína C es traducida a partir de un ORF alternativo en el ARNm de la fosfoproteína comenzando en el segundo codón AUG. Por otro lado, la proteína V es traducida a partir de un ARNm que no es exactamente una copia de la secuencia del gen P sino de un ARNm editado que tiene un residuo G extra insertado en una secuencia conservada ubicada en la mitad del gen P, donde la polimerasa del virus "tartamudea o duda" y agrega la G extra. Este evento ocurre en el 30 a 50% de los ARNs mensajeros transcritos del gen P. La traducción de este ARNm produce una proteína quimérica ya que el extremo N-terminal de la proteína P tiene un nuevo extremo C-terminal rico en residuos de cisteínas, derivados de la secuencia en el tercer marco de lectura. La proteína P está formada por alrededor de 600 residuos de aminoácidos y tiene un peso aproximado de 73 kDa.^{90, 92, 96}

El gen M codifica para una proteína de 375 aminoácidos con un peso de 38 kDa aproximadamente. La proteína M es la más abundante en el virión y se detecta en la membrana de células infectadas.^{90, 95} A esta proteína se le considera la organizadora central de la morfogénesis viral, ya que interactúa con las proteínas integrales de la membrana, con la bicapa lipídica y con las nucleocápsides. Lleva a cabo un papel muy importante en la envoltura y el ensamblaje viral, en infecciones persistentes esta proteína está ausente ya que existe una falla en la

envoltura.^{90. 95. 96} Existe una secuencia del genoma entre la terminación del gen M y el inicio del gen F que se cree podría actuar como señal de control o como un estabilizador del ARN, pero en realidad su función es aún desconocida.⁹⁶

El gen F codifica para 540-580 residuos de aminoácidos aproximadamente los cuales tiene un peso de 62 kDa.⁹⁰ La proteína F es una proteína integral que atraviesa la envoltura, en su extremo N-terminal presenta una secuencia señal para la síntesis de la misma, mientras que en el extremo C-terminal presenta un dominio hidrofóbico que ancla a la proteína en la envoltura.^{90. 95} Además, el extremo N-terminal tiene una región de 25 residuos que es muy conservada (más del 90% de identidad) entre los virus de la subfamilia *Paramyxovirinae*, lo que nos indica la relación filogenética entre estos virus.⁹⁵ La función de esta proteína es mediar la penetración del virus fusionando la envoltura del virión con la membrana plasmática de la célula huésped para posteriormente liberar la nucleocápside al citoplasma.⁹⁵

La forma inactiva de la proteína se conoce como F₀, que mediante la acción de una endoproteasa se generan dos subunidades, la F₁ y la F₂, las cuales constituyen la forma biológicamente activa de la proteína.^{90. 95} En células infectadas, la proteína F se expresa en la membrana plasmática y lleva a cabo la fusión de las membranas de las células vecinas, formando así los sincitios o células gigantes característicos de CDV. Se cree que esto es un mecanismo de dispersión del virus.⁹⁵

La proteína H se une al receptor de la célula huésped por lo que tiene una actividad promotora de la fusión virus-célula y célula-célula ya que se requiere de la coexpresión de las proteínas F y H para que este fenómeno se presente.^{95, 96}

Esta proteína no tiene actividad de neuroaminidasa lo cual condujo a la identificación del receptor que usa el virus del sarampión, la molécula de superficie conocida como CD46, que es un cofactor del complemento.^{95, 96} Esta molécula evita la agregación viral durante el ensamblaje y mantiene libres a los virus de la superficie celular, algo similar realizan las neuroaminidasas en el resto de los virus de la familia *Paramyxoviridae*, ya que se encargan de destruir al receptor para evitar que las partículas virales se aglomeren en ellos. Hasta el momento no se ha definido con exactitud cual es el receptor que usa el virus del Distemper.⁹⁵ Sin embargo se ha identificado a la molécula de superficie SLAM (CD150) como uno de los receptores que usa el virus de distemper canino, de sarampión y del rinderpest,^{97, 98} aunque el virus del sarampión también puede usar la molécula CD46 como receptor.^{99, 100}

El gen L es el más cercano al extremo 5' y es el mayor promotor en el mapa transcripcional. El gen L es el más grande del virus (Figura 2), se cree que su gran tamaño se debe a la gran cantidad de funciones enzimáticas y de unión que lleva a cabo, por lo que se considera la polimerasa del virus. Está conformada por 2300 residuos de aminoácidos lo que le da un peso aproximado de 200 kDa.^{90, 95} Este gen tiene algunas regiones con una alta homología con virus de otras familias, estas regiones se localizan en la parte central del gen, se cree que estas

regiones representan remanentes estructurales de una polimerasa ancestral común.⁹⁵

Las proteínas L y P forman un complejo durante la replicación, se aglomeran entre 5 y 10 proteínas P por cada proteína L. Esta fosforila a las proteínas N y P, por lo que se ha sugerido que es la cinasa viral, aunque la fosforilación de estas proteínas parece ser una modificación sin una función obvia.⁹⁵

1.4 Patogenia.

La patogenia del moquillo canino varía dependiendo de la virulencia de la cepa y de la respuesta inmune desarrollada por el huésped¹⁰¹. (Cuadro 1)

En una infección natural, el virus de Distemper canino entra a mucosas por medio de aerosoles principalmente, el virus se replica en macrófagos del tracto respiratorio alto o de la conjuntiva, dentro de éstas células se disemina a tonsilas y nódulos linfáticos bronquiales¹⁰¹. Del día 2 al 4 el virus se replica en los nódulos linfáticos retrofaríngeos y bronquiales, así como en las tonsilas (Cuadro 1). Una semana después el virus se encuentra en los nódulos linfáticos mesentéricos, lámina propia del aparato digestivo, bazo y en las células de Kupffer del hígado. Se desarrolla una leucopenia ya que durante la dispersión del virus disminuyen los linfocitos T y B, ésta linfopenia se presenta acompañada de fiebre. Entre el día 8 y 9 se produce la viremia, diseminándose a otros tejidos, incluyendo tracto

respiratorio alto y bajo, mucosa gastrointestinal y cerebro. Esta diseminación dependerá, como se mencionó antes, de la condición del sistema inmune del hospedero. La liberación del virus sucede desde el momento que coloniza los epitelios (una semana después de la infección), por lo que el virus se encuentra en todas las secreciones corporales, aún en perros con enfermedad subclínica. De igual manera, en animales silvestres pueden no presentarse signos durante la liberación del virus. Entre el día 7 y 9 se inicia la respuesta inmune, si se desarrolla una producción elevada de anticuerpos neutralizantes y una inmunidad celular citotóxica, para el día 14 el virus se elimina de la mayoría de los tejidos y el animal no llega a desarrollar la signología de la enfermedad (Cuadro1).^{87, 90, 91, 101.}

102

Si la respuesta inmune celular y humoral no fue lo suficientemente adecuada entonces se desarrolla la enfermedad, los perros presentan signos como conjuntivitis serosa o mucopurulenta, disnea, tos, depresión, anorexia, vómito, diarrea, entre otros; alrededor de la 3ª semana se presenta una encefalomiелitis aguda, desarrollando signología nerviosa (convulsiones, ataxia, mioclonia, etc.), por lo que se puede presentar la muerte del animal durante esta etapa.¹⁰² Si se incrementa la respuesta inmune, el virus es eliminado de la mayoría de los órganos, con la posible excepción de los pulmones, piel, ojo y sistema nervioso central. La recuperación de la enfermedad se asocia a la adquisición de inmunidad a largo plazo y la ausencia de la liberación del virus, aunque en algunos casos se puede llegar a liberar el virus hasta por dos meses. Los perros

que se recuperan pueden quedar con secuelas de la infección, como algunos signos nerviosos e hiperqueratosis de los cojinetes plantares.^{87. 90. 91. 102}

En perros con una baja respuesta inmune, el virus se disemina y persiste en prácticamente todos los tejidos y órganos, en estos casos la enfermedad es severa y fatal. Las infecciones bacterianas secundarias en tracto respiratorio y digestivo juegan un papel importante en la severidad de los signos y por ende en la tasa de mortalidad de esta enfermedad¹⁰². En el caso de que la respuesta inmune sea mínima o no se produzcan anticuerpos el animal desarrolla una infección sistémica severa entre las semanas 2 y 3 después de la infección, terminando con la muerte entre la semana 3 y 4.

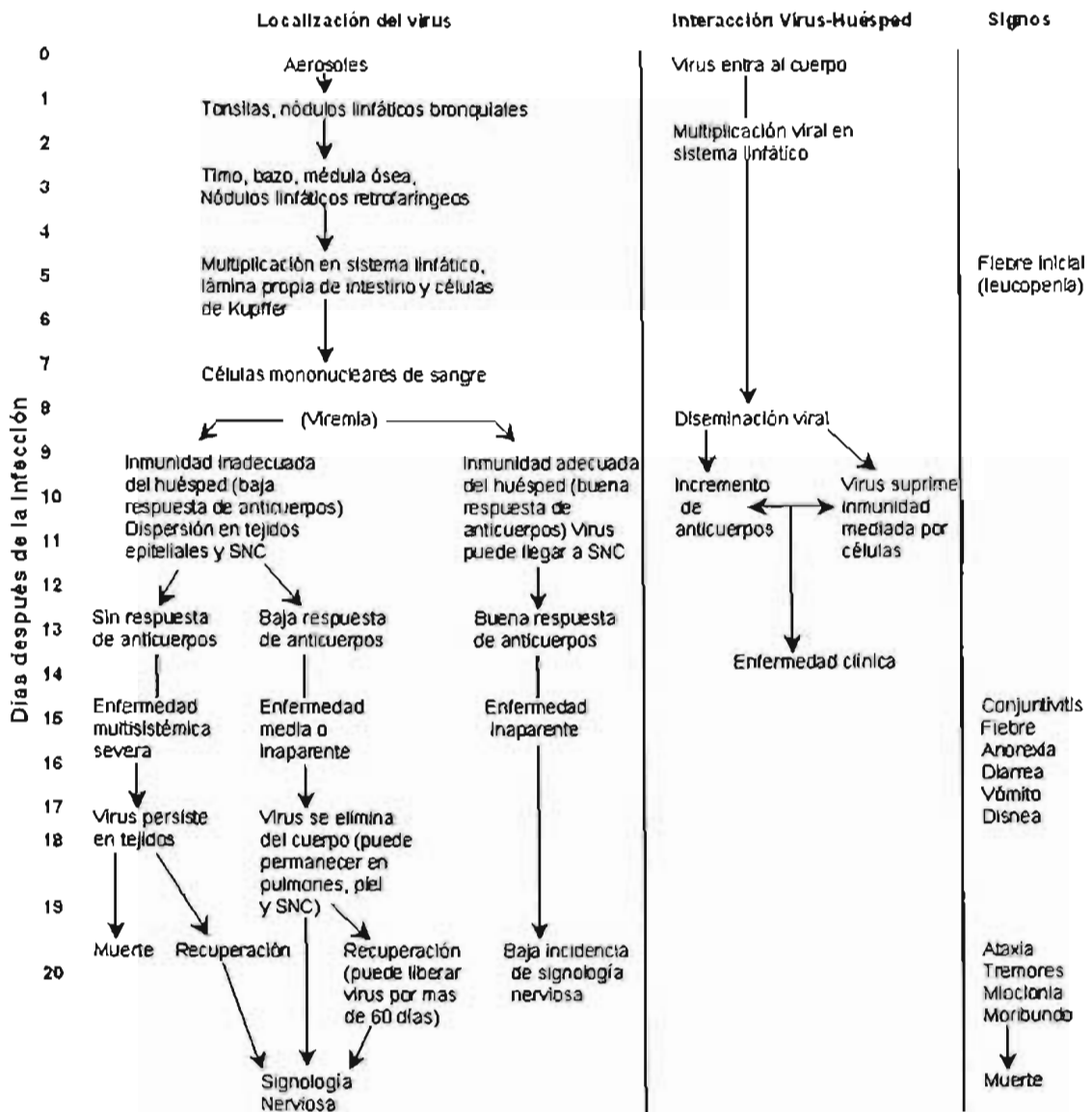
La diseminación del virus en el sistema nervioso central dependerá mucho de la respuesta inmune generada por el huésped. Es probable que el virus esté en sistema nervioso central de perros con o sin signología nerviosa. El virus infecta las células endoteliales de las meninges, el epitelio del plexo coroideo y las células endodiales. Se puede detectar en los endotelios y en los procesos astrocíticos perivasculares. El epitelio del plexo coroideo puede actuar como un reservorio del virus, ya que en ese lugar el virus se produce continuamente durante la enfermedad. A partir de este lugar se da la dispersión del agente en el sistema nervioso central, ya sea de forma libre o asociado a linfocitos. El virus rápidamente produce lesiones en la corteza cerebral, nervio óptico y médula espinal. El virus produce lesiones multifocales en la materia gris y blanca; las

lesiones en la materia gris resultan de la infección y necrosis de las neuronas, sin embargo esta infección se puede dar con un mínimo daño celular, las lesiones en la materia blanca se caracterizan por un daño en la mielina, debido a la replicación del virus en las células de la glia ¹⁰².

Normalmente, en el cerebro hay una baja expresión del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase II, las células de la microglia expresan ésta molécula cuando son activadas, probablemente por un incremento de interferón gama (IFN- γ). Se han detectado elevados niveles de INF- γ así como la sobreexpresión del MHC clase II en sistema nervioso durante infecciones virales desmielinizantes y en la esclerosis múltiple en humanos. ¹⁰²

Durante una encefalitis aguda, el virus se localiza en las lesiones multifocales o difusas, el MHC clase II se encuentra sobrerregulado por la materia blanca y los focos de infección del virus. Mientras que en una encefalitis crónica, el virus se encuentra restringido a unos cuantos astrocitos, ya que la expresión de MHC clase II es mucho mayor en todas las células de la microglia. La encefalitis crónica por CDV está asociada a elevadas concentraciones de anticuerpos contra la mielina, esto como una reacción secundaria al proceso inflamatorio. Además los anticuerpos contra el virus interactúan con los macrófagos infectados en las lesiones del sistema nervioso central, causando su activación y por ende daño tisular ¹⁰². La mayoría de los signos de la enfermedad se deben al efecto citopático producido por el virus en los tejidos. ^{82, 87, 90, 91}

La signología nerviosa se puede llegar a presentar hasta 6 ó 7 semanas después de la infección. El virus puede ser eliminado durante varios meses aunque puede persistir en encéfalo resultando en una presentación posterior de la enfermedad. La rápida presencia de anticuerpos circulantes es crucial para la recuperación y la prevención de la infección del sistema nervioso central. 82, 87, 90, 91, 102



Cuadro 1. Patogenia del virus de Distemper canino. Tomado y traducido de Greene CE. Infectious diseases of the Dog and Cat. 1998.

1.5 Diagnóstico.

Las pruebas utilizadas para detectar Distemper son diversas, se pueden clasificar en directas e indirectas. Las directas detectan el antígeno en una determinada muestra, como la microscopía electrónica, inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa, RT-PCR y aislamiento en cultivo celular. Las pruebas indirectas determinan si hubo exposición o no al agente biológico, como la detección de anticuerpos.¹⁰³

La observación de las partículas virales mediante microscopía electrónica es una prueba rápida y contundente de la presencia del agente. Mediante el uso de esta técnica se observan las nucleocápsides pleomórficas y partículas filamentosas características de morbillivirus. Esta prueba tuvo mucho auge debido a la alta resolución de las imágenes obtenidas, con las cuales fue posible analizar detalladamente la morfología y se pudieron reclasificar muchos virus.^{101, 103} Por otro lado, el procesamiento de las muestras es complejo, requiere el uso de reactivos a base de metales y la infraestructura es muy costosa.¹⁰³

La prueba de inmunofluorescencia se basa en una reacción antígeno-anticuerpo, para esto se purifican las inmunoglobulinas, las cuales se marcan con un fluorocromo el cual emite un haz de luz a cierta longitud de onda y se observa al microscopio como una señal fluorescente.^{101, 102, 103} Las muestras que se pueden analizar son variadas, como tejidos, células (impronta de córnea), secreciones, entre otras.¹⁰¹

Las pruebas de microscopía electrónica e inmunofluorescencia las debe realizar una persona capacitada y con experiencia, además se requiere equipo sofisticado y costoso.^{101, 103}

La prueba de inmunoperoxidasa se puede realizar en muestras tales como improntas y cortes histológicos. En esta prueba el tejido se incuba con un anticuerpo contra el virus, después se agrega un segundo anticuerpo unido a peroxidasa, se proporciona un sustrato y la lectura se hace en un microscopio de luz o incluso a simple vista, la reacción positiva se observa como una coloración café. La ventaja de esta prueba es que es permanente, por lo que las muestras se pueden conservar como registro, no se necesita un microscopio sofisticado y el conjugado es bastante estable. Las desventajas de esta prueba es que su sensibilidad y su especificidad no son muy altas.^{101, 103}

El aislamiento viral es la prueba más valiosa, ya que con ésta, es posible mantener activo al virus y estudiar sus características biológicas *in vitro*.¹⁰¹ Para esta prueba se requieren células propagadas y mantenidas con medios de cultivo específicos, el estrato celular se infecta con el inóculo de la muestra y se incuba a 37 °C hasta observar un efecto citopático, de no ser así se pueden realizar pases ciegos en los que se cosecha el cultivo infectado aún sin observar cambios y éste se usa como inóculo para infectar otro monoestrato celular. Esto se hace con la finalidad de incrementar las partículas virales que se hayan logrado adaptar a las células del cultivo, hasta que el virus es capaz de producir un efecto citopático

visible. En los cultivos se observa el efecto citopático sugerente a morbillivirus como células globosas, formación de sincitios y desprendimiento celular.¹⁰³ Este procedimiento es lento, caro y técnicamente demandante.¹⁰¹

La técnica de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) es una prueba muy sensible y rápida de realizar.¹⁰¹ La RT-PCR ha demostrado una gran utilidad en la rápida detección de ARN específico de virus además de que es una prueba invaluable para analizar muestras poco preservadas. Esta prueba ha sido muy útil en la identificación de los nuevos Morbillivirus encontrados en mamíferos marinos.^{103, 104} Brevemente, en un inicio el ARN debe ser transcrito en ADN complementario (ADNc) a la secuencia, esto se hace mediante una enzima llamada transcriptasa reversa, la cual sintetiza el ADNc en dirección 5' a 3' después de que los iniciadores (secuencias pequeñas de ADN que flanquean el segmento a amplificar) se alinean en su secuencia complementaria; ya formado el ADN de doble cadena se desnaturaliza a altas temperaturas (se separan las dos hebras de ADN), generalmente a 94° C. Posteriormente con la enzima ADN polimerasa termoestable obtenida de la bacteria *Thermus aquaticus* (*Taq* polimerasa) se generan copias del fragmento específico de acuerdo a los iniciadores diseñados con base en la secuencia del virus, esta segunda síntesis se lleva a cabo en dirección 3' a 5' con respecto a la secuencia original de ARN. Esta reacción se repite por varios ciclos ($\bar{X} = 30$), generando copias del fragmento específico ya que la amplificación es exponencial. El fragmento amplificado se visualiza mediante una separación

electroforética en un gel de agarosa y con un marcador de peso molecular se calcula el tamaño o peso aproximado para verificar que sea el fragmento buscado (Figura 3).^{101, 103, 104}

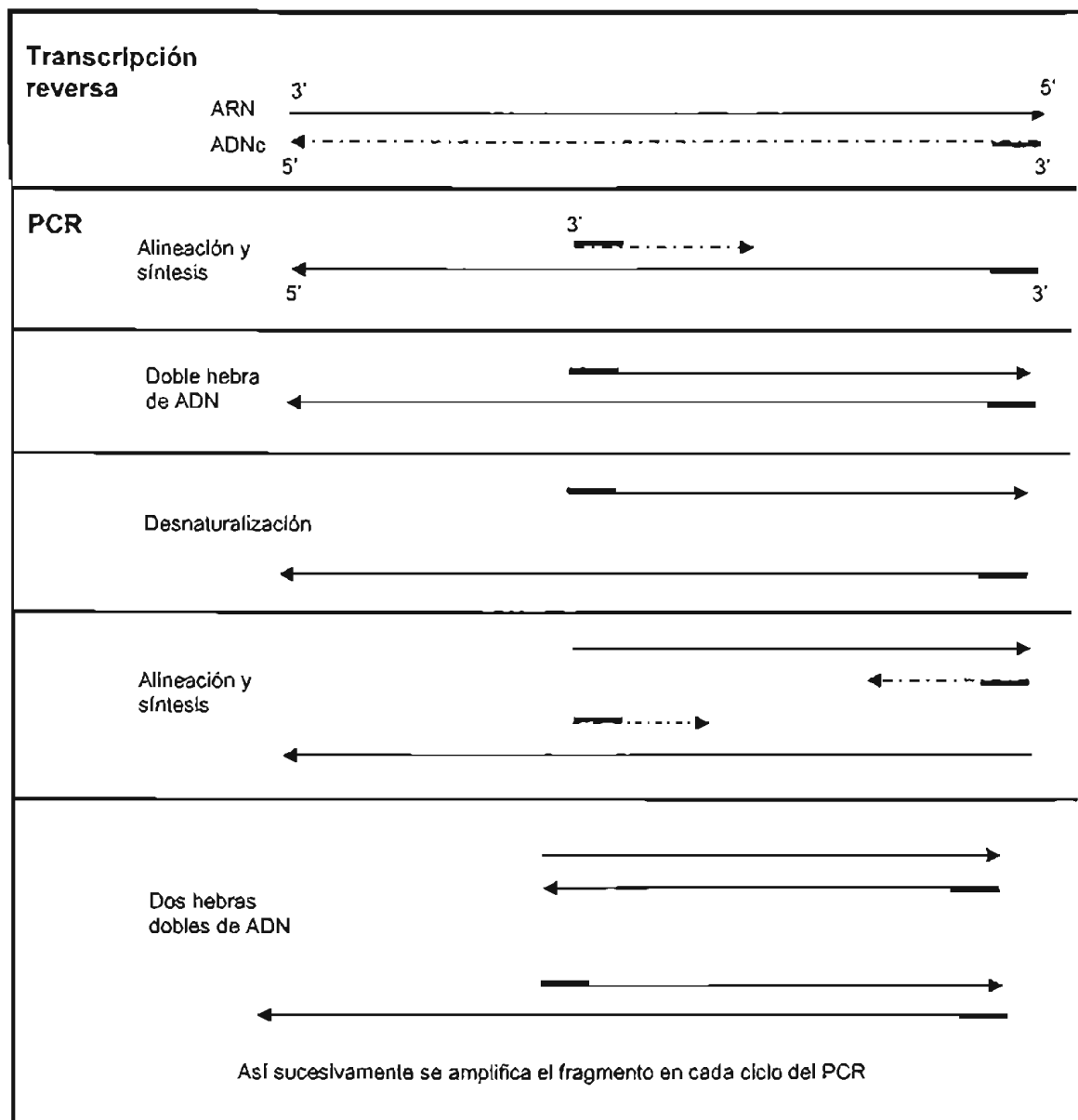


Figura 3. Diagrama de la Transcripción reversa- Reacción en cadena de la polimerasa.

Las pruebas serológicas, como su nombre lo indica, se basan en el uso de sueros, pueden ser muy versátiles por lo que existen muchas variantes. Cuando se detecta la presencia de un determinado agente utilizando sueros específicos, la prueba es directa. Por el contrario, si se detectan anticuerpos específicos contra un antígeno son indirectas, ya que se determina si hubo exposición o no a este. Algunos ejemplos de estas pruebas son la seroneutralización y el inmunoensayo enzimático indirecto (iELISA).^{101, 103}

La seroneutralización viral es la prueba serológica comúnmente utilizada para detectar anticuerpos contra Distemper.^{105, 106} En esta prueba se incubaba el suero problema junto con el virus de Distemper, si hay presencia de anticuerpos contra el virus lo neutralizan, después se agrega una suspensión de células y se incuban por varios días. La lectura se realiza detectando hasta que dilución de suero las células se replicaron sin efectos del virus, el título de anticuerpos neutralizantes se determina calculando la dosis de inhibición del 50% de la replicación viral o del efecto citopático.^{103, 104, 105} Esta prueba tiene varios inconvenientes ya que se requiere de cultivo celular lo cual es tardado y caro, la estandarización debe contemplar diluciones relativamente altas del suero a evaluar, ya que a bajas diluciones puede llegar a ser tóxico para las células y dar lecturas falsas.^{6, 12, 103,}

105

El inmunoensayo enzimático [Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)] tiene la característica de ser muy sensible, tener una gran especificidad, es rápido,

versátil y no es costoso. Por este método se pueden procesar una gran cantidad de muestras en corto plazo, además de que no requiere instalaciones ni equipos costosos. ¹⁰¹ El ELISA se basa en antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, resultando en conjugados que tienen actividad inmunológica y enzimática. ELISA es un sistema que se puede diseñar de varias formas, una de las más utilizadas es la indirecta, donde se detectan anticuerpos contra un agente, brevemente: primero se fija el antígeno a microplacas de 96 pozos comúnmente de poliestireno, éste se pone en contacto con el suero a analizar, si existen anticuerpos contra el antígeno éstos se unirán, el complejo antígeno-anticuerpo queda inmovilizado en el fondo del pozo, se agrega un segundo anticuerpo marcado con una enzima que se une al primer anticuerpo, al adicionar un sustrato específico, la enzima produce una coloración que se puede ver a simple vista y puede ser cuantificada en un espectrofotómetro. ^{103, 105, 107, 108}

1.6 Lobo marino de California.

El lobo marino de California, *Zalophus californianus* (Lesson, 1828) es un mamífero marino que se encuentra en el tope de la cadena alimenticia y se considera un indicador de la salud del ecosistema marino en el Golfo de California, por lo que resulta importante conocer su situación con respecto a estos virus. ¹⁰⁹

La clasificación zoológica del lobo marino de California según Rice, 1998 es la siguiente: ¹¹⁰

Reino	Animalia	Suborden	Caniformia
Phylum	Chordata	Superfamilia	Pinnipedia
Subphylum	Vertebrata	Familia	Otariidae
Clase	Mammalia	Género	<i>Zalophus</i>
Orden	Carnivora	Especie	<i>californianus</i>

Dentro del género *Zalophus* existen tres especies: la de California (*Z. californianus*), la especie de las Islas Galápagos (*Z. wolfebaeki*) y la de Japón (*Z. japonicus*) que actualmente se cree extinta. ¹¹⁰

Este pinnípedo se distribuye en las costas del Océano Pacífico desde la Isla de Vancouver en Canadá hasta las Islas Marías en México. ^{110, 111} Con base a diferencias genéticas se han clasificado dos subpoblaciones, una en el Océano Pacífico desde la Isla de Vancouver en Canadá hasta Cabo San Lucas, México y una segunda subpoblación dentro del Golfo de California. ¹¹⁰ De acuerdo a censos realizados en 1999, la población mundial de lobos marinos se estimó entre 237 y 244 mil individuos con una producción anual de mas de 56 mil crías. ¹¹² Se calcula que el 38% reside en las costas del Océano Pacífico estadounidense mientras que el 46% reside en las costas del Pacífico mexicano y el 16% dentro del Golfo de California. ¹¹³

El lobo marino es una especie migratoria, los animales se mueven de acuerdo a la época del año. En la subpoblación del Pacífico, se ha observado una migración principalmente de machos desde el Sur de Baja California a las costas de EUA o incluso hasta la Isla de Vancouver, esto después de la época reproductiva, mientras que las hembras se mantienen cerca de las costas del sur de California.

112

En la subpoblación del Golfo de California al parecer casi no hay migración, los animales se mueven entre las islas dentro del Golfo sin salir al Pacífico. Esto se ha corroborado mediante estudios de variabilidad genética entre lobos marinos del sur de California y los del Golfo de California, donde hay una diferenciación importante, indicando un flujo bajo de intercambio genético. ¹¹²

La época reproductiva se presenta en la primavera tardía-verano temprano, desde mediados de mayo hasta finales de junio. El pico de nacimientos sucede a mediados de junio y la mayoría de los apareamientos a principios de julio. ¹¹⁴

Los machos adultos llegan a medir 2.5 metros de longitud con un peso de 400 kg, las hembras siendo más pequeñas miden hasta 2 metros y pesan 150 Kg. ^{111, 114,}

¹¹⁵ En cuanto a las crías, lo que registramos durante nuestro muestreo, al nacer miden cerca de 70 cm. y tienen un peso de 7 Kg. Los machos alcanzan la madurez sexual entre los 4 y 5 años pero deben alcanzar la madurez física (10-11 años) para competir con otros machos por el territorio y poder reproducirse. Las

hembras son fértiles a partir de los 4 años y hasta los 14 años de edad aproximadamente. ¹¹⁵

Los lobos marinos son polígamos territorialistas, los machos mantienen la mayor cantidad de hembras dentro de su territorio, el cual defiende de otros machos que intentan desplazarlo. Esta especie presenta dimorfismo sexual, los machos tienen una cresta sagital craneal de la que carecen las hembras, los machos son más grandes y robustos, la coloración de su pelo es más oscura y el tono de las vocalizaciones es más agudo. ^{111. 114}

Las hembras presentan ovulación a los 28 días posparto, durante la lactancia temprana, tiempo en el cual se mantienen en el territorio de un macho para aparearse. ¹¹⁴ Su período de gestación es de 11 meses, sin embargo presentan lo que se conoce como implantación tardía. Este último acontece después de la fertilización del óvulo, se desarrolla por alrededor de 8-10 días y se detiene en la etapa de blastocisto, permanece completamente inactivo por 3 meses moviéndose libremente en la parte anterior del cuerno uterino. ¹¹⁴

El desarrollo continúa después de ese período, el blastocisto se implanta en la pared uterina continuando el desarrollo embrionario, por lo que se puede decir que la gestación activa es de 8 meses. Este retraso permite a las hembras parir y destetar a sus crías durante la época más favorable del año. ^{111. 114} Su placentación es endotelio-corial, la barrera de la circulación sanguínea del feto y la madre es delgada y estrecha, por lo que hay paso de moléculas a través de la

placenta. En cuanto a la distribución de las vellosidades se clasifica como tipo zonal, de igual manera que en el resto de los carnívoros.¹¹¹ Su periodo de lactación fluctúa entre los 6 y 12 meses, aunque se puede prolongar hasta dos años, observándose a la cría del año anterior amamantando junto a la cría nueva.

114

La pesca de tiburón merma las poblaciones de este pinnípedo ya que se utiliza ilegalmente su carne como carnada. Además las actividades humanas como la pesca y el turismo generan contaminantes que afectan directamente en las poblaciones de mamíferos marinos, esto aunado a la proliferación de ciertas algas y sus toxinas, un bajo flujo de intercambio genético, disminución de áreas reproductivas y por lo tanto alimenticias, son factores de estrés, lo cual es bien sabido puede llegar a inducir una inmunosupresión, dejando expuestos a estos animales a enfermedades a las que antes eran resistentes.¹⁰⁹

1.6 Sitio de muestreo.

El Golfo de California o Mar de Cortés es un cuerpo de agua semicerrado que se localiza en el Océano Pacífico (Figura 4) con una gran variedad de especies de mamíferos marinos donde llegan muchas especies migratorias como las ballenas.

¹¹¹ Está delimitado por los estados de Baja California, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Nayarit y Jalisco.^{113, 115}

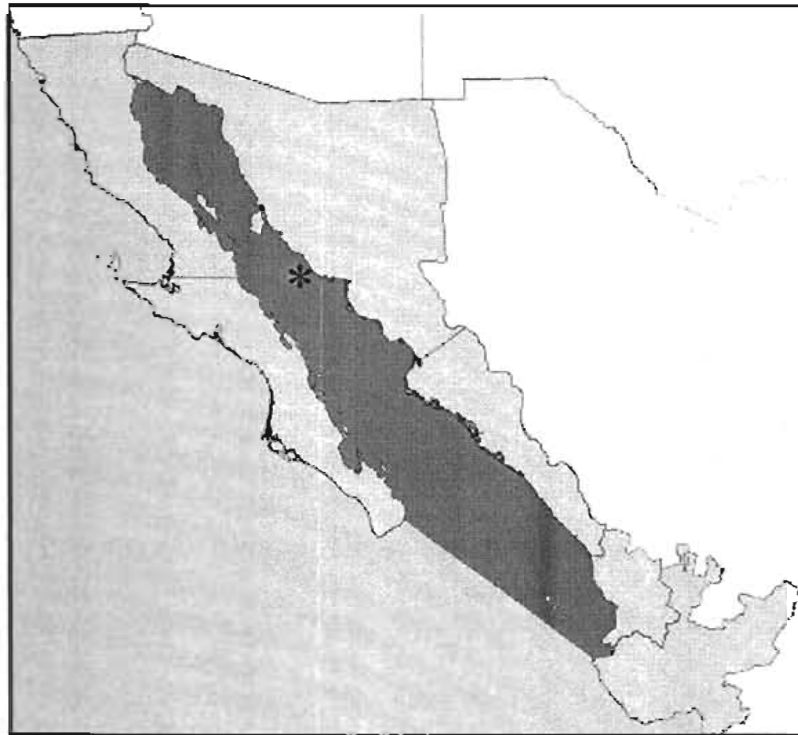


Figura 4.- Mapa donde se delimita el Golfo de California, se indica la localización de la isla San Pedro Nolasco (*).

La isla San Pedro Nolasco se localiza dentro del Golfo de California frente al estado de Sonora, se ubica en los $27^{\circ} 58' 41''$ N y $111^{\circ} 22' 63''$ W, mide 5.5 Km de largo, 1.5 Km de ancho, tiene una área aproximada de 3.2 km^2 la cual es muy escarpada, presenta pendientes pronunciadas y las partes más elevadas alcanzan los 200 m sobre el nivel del mar (Figura 5).¹¹⁶

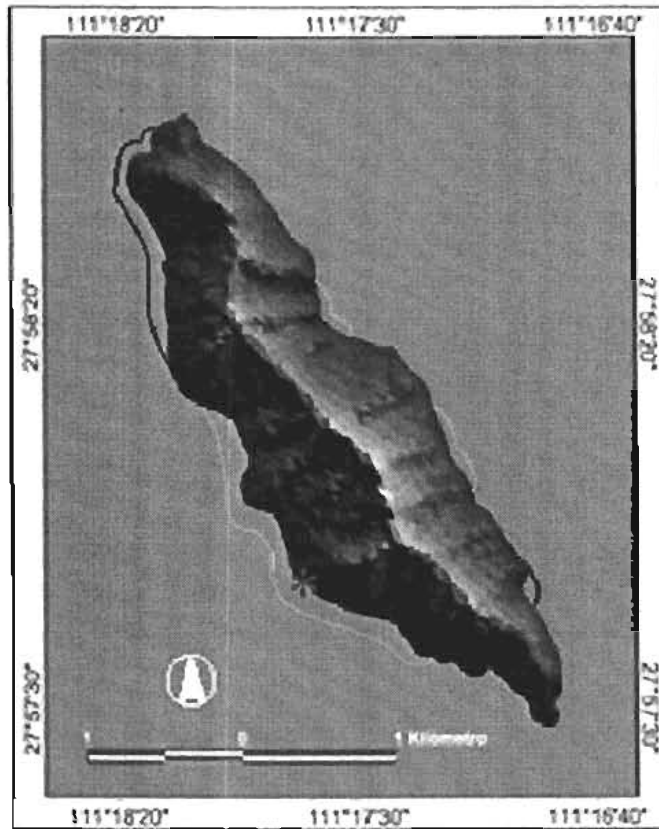


Figura 5.- Isla San Pedro Nolasco, se indican las zonas de las loberas reproductivas (□), de descanso (■) y el sitio de muestreo (*).

Esta isla cuenta con una lobera reproductiva principal localizada en el lado suroeste además de otras dos de menor tamaño y densidad. También cuenta con dos loberas de descanso, la más grande se localiza en el lado noroeste y una pequeña donde se encuentran sólo machos adultos y subadultos en el lado sureste de la isla (Figura 5). Su población de lobos marinos es de aproximadamente 720 individuos, aunque en los últimos años este número ha ido disminuyendo. ¹¹⁵

Justificación.

La información previamente citada, indica que las poblaciones de pinnípedos en costas mexicanas son susceptibles a una infección por morbillivirus, específicamente CDV y PDV, además la relación filogenética cercana entre fócidos (focas) y otáridos (lobos marinos) indica que no sería difícil que estos virus afectaran a los lobos marinos de California. Hasta el momento no se han realizado estudios para detectarlos en lobos marinos del Golfo de California. El Golfo de California es un cuerpo de agua semicerrado, en el cual se interrelacionan gran variedad de especies de mamíferos marinos, por lo que el riesgo de dispersión de una enfermedad es alto.^{110, 111, 114}

Se propuso la realización de un escrutinio inicial para la detección de anticuerpos contra Distemper usando como antígeno el virus del moquillo canino y la aplicación de la técnica RT-PCR y cultivo celular para detectarlo en una colonia de lobos marinos de California, en la isla San Pedro Nolasco, Sonora.

Hipótesis

Si el virus de Distemper canino o de fócidos está presente en las crías de lobo marino de California de esta colonia reproductiva, entonces las crías son seropositivas mediante ELISA al virus del Distemper y el virus está presente en heces o secreciones nasales detectándolo mediante RT-PCR y cultivo celular.

Objetivo General

Realizar un estudio preliminar mediante un inmunoensayo enzimático (ELISA), prueba de la transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y cultivo celular, para detectar la presencia del virus de Distemper canino y de fócidos en las crías de lobo marino de California, de la isla San Pedro Nolasco, Sonora.

Objetivos específicos

1.- Estandarizar un inmunoensayo enzimático (ELISA) indirecto para detectar anticuerpos que reaccionen con el virus de Distemper canino en las crías de lobo marino de California de la isla San Pedro Nolasco, Sonora.

2.- Estandarizar la técnica de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para detectar la presencia del virus de Distemper canino y de fócidos en heces y secreciones nasales de las crías.

3.- Detectar el virus de Distemper canino y de fócidos en heces y secreciones nasales de dichas crías mediante cultivo celular.

2. Material y métodos

2.1 Toma de muestras

La Isla San Pedro Nolasco cuenta con una lobera reproductiva y una de descanso, el sitio de muestreo se indica en la figura 1, que es la lobera más importante de la isla y se encuentra en el lado suroeste.

Se utilizaron 35 crías de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) capturadas entre los meses de mayo y octubre del 2000 en la isla San Pedro Nolasco, Sonora. Para facilitar el manejo de las crías se utilizó la camilla propuesta por Gentry y Casanas (1997) con algunas modificaciones para las crías de esta especie.¹¹⁷ Se obtuvieron muestras de sangre, hisopos nasales y anales de estas crías. (Permiso de SEMARNAT Oficio N° DOO.02.-0468). Cada cría se marcó con tinte para cabello tono rubio claro, se le dibujó una letra a cada una para posteriormente identificarla.

De las crías muestreadas, 16 (45.7%) presentaban dermatitis vesicular y ulcerativa, en algunos animales la distribución era principalmente en aletas, mientras que en otros estaba diseminada en la región ventral. No presentaban signología de afección respiratoria a excepción de una cría que tenía tos. En cuanto a trastornos digestivos solo una cría presentó diarrea, aunque esto podría deberse al estrés de la captura.

Sueros

Para el inmunoensayo enzimático (ELISA) se tomaron muestras de sangre de la vena glútea caudal en tubos vacutainer con gel separador de suero.

Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su arribo al Laboratorio de Ecofisiología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Unidad Guaymas. Se centrifugaron a 1,550 rpm en una centrífuga clínica con un rotor de 30 cm de diámetro durante 20 min para separar el suero.

Se obtuvo el suero y se almacenó en microtubos estériles los cuales se mantuvieron en congelación a -20° C hasta su análisis.

Hisopos nasales y rectales

Se tomaron muestras de secreciones nasales con hisopos estériles, frotando suavemente la cavidad nasal. Para las muestras de mucosa anal, el hisopo se introdujo en el ano, frotando suavemente hasta obtener la muestra. Esta maniobra se hizo cuidadosamente para evitar laceraciones.

Cada hisopo se guardó en un criotubo y se congeló a -20° C hasta su transporte a la Ciudad de México donde se almacenó a -80° C hasta su análisis en el laboratorio.

Las muestras se transportaron en refrigeración por vía aérea de Guaymas, Sonora a la Cd. de México y se ingresaron al Laboratorio de Microbiología Molecular, perteneciente al Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. (Permiso de SEMARNAT Oficio N° DOO.02.-1157).

2.2 Inmunoensayo enzimático (ELISA).

Los sueros se analizaron mediante un ELISA indirecto, en el cual el antígeno de captura se preparó a partir del virus completo de moquillo canino. Se utilizaron las cepas Snyder-Hill y Lederle del virus de moquillo canino las cuales se replicaron en células renales de mono verde (VERO).ⁱⁱ

Producción y evaluación de un suero anti-Inmunoglobulinas totales de lobo marino.

Como primera fase en la estandarización del ELISA, se llevó a cabo la producción de un suero anti-Inmunoglobulinas totales de lobo marinos. Esto con la finalidad de utilizar un segundo anticuerpo en el sistema, que reconociera a todas las clases de Inmunoglobulinas presentes en suero de lobo marino (IgA, IgG, IgM e IgE, principalmente).

ⁱⁱ El virus y las células fueron amablemente proporcionadas por Holland de México, S. A. de C. V.

Se obtuvieron muestras de suero sanguíneo de 6 lobos marinos adultos del Acuario de Mazatlán. Se hizo una mezcla de todos los sueros y se realizó una precipitación y purificación de inmunoglobulinas totales con sulfato de amonio, según el protocolo descrito por Ausubel, *et al.* (1994).¹¹⁸

Con las inmunoglobulinas totales de lobo marino purificadas se inmunizaron dos conejas de raza Nueva Zelanda. El antígeno (inmunoglobulinas) se preparó siguiendo el protocolo de Ausubel, *et al.* (1994).

Se tomó una muestra de sangre para obtener el suero y así utilizarlo como el control negativo en la evaluación. En la primera inmunización se utilizó Adyuvante completo de Freund (Sigma® St. Louis, MO, EUA), en las posteriores inmunizaciones se usó el Adyuvante incompleto (Sigma® St. Louis, MO, EUA).

Se realizaron inmunizaciones intramusculares cada cuatro días hasta completar 9 inoculaciones de 0.2 mg de antígeno cada una. Durante este período se analizaron muestras de suero de las conejas para evaluar la respuesta inmune contra el antígeno. Esta evaluación se hizo mediante un ensayo de Difusión doble en agar.¹¹⁹

Cuatro días después de la novena inoculación, ambas conejas se anestesiaron con 100 mg de ketamina y se realizó el sangrado total mediante punción cardiaca para obtener la mayor cantidad de suero sanguíneo. La sangre se mantuvo a

temperatura ambiente por dos horas y posteriormente se centrifugó a 1500 x g durante 10 min. Se colectó el suero y se guardó en alícuotas a – 20° C.

El suero de las dos conejas se evaluó por el ensayo de Doble difusión en agar realizando diluciones dobles seriadas iniciando en 1:2 y hasta 1:64.

Se realizó un ELISA para evaluar los sueros de las conejas. Adicionalmente se evaluaron las Proteínas A y G, lo que es ampliamente usado como segundo anticuerpo en las pruebas de ELISA, ya que ambas tienen afinidad por las Ig G de la mayoría de los mamíferos.^{79, 120} En microplacas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (NUNC® California, EUA), se fijaron 10 µg de antígeno (inmunoglobulinas de lobo marino), se realizaron 5 diluciones décuples seriadas para identificar la mínima cantidad detectada por los sueros de las conejas y las proteínas A y G (Sigma® St. Louis, MO, EUA). Se realizaron diluciones 1:50 y 1:150 de los sueros con PBS pH 7.2, se incubaron durante 2 h a 37° C, posteriormente se lavó tres veces con PBS-Tween, se incubó con suero anti-Ig G de conejo unido a peroxidasa (Sigma® St. Louis, MO, EUA) a una concentración de 1 µg/ ml. Por otro lado, en otra sección de la placa se colocó una solución de proteína A a una concentración de 1 µg/ ml, de la misma manera se probó una solución de proteína G a la misma concentración. La microplaca se incubó durante 2 h a 37° C, después se lavó tres veces con PBS-Tween y se le agregó el sustrato cromógeno, ácido 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfónico (ABTS) (Sigma® St. Louis, MO, EUA) a una concentración de 120 µg/ ml y 0.38 µl/ ml de

peróxido de hidrógeno (H_2O_2) ambos diluidos en solución amortiguadora de citratos pH 4.0 (Ácido cítrico 110 mM, citrato de sodio 100 mM). La placa se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente y se realizaron lecturas a los 15, 25 y 35 min en un lector de microplacas (3550 BIO-RAD® California, EUA) a una longitud de onda de 405 nm. ^{107, 108}

De acuerdo a los valores de absorbancia obtenidos se determinó cual sería el segundo anticuerpo en el sistema del ELISA para evaluar los sueros de los lobos marinos.

Antígeno

Se replicaron células Vero en medio 199 adicionado con 5% de suero fetal bovino (SFB) y en una atmósfera con 5% de CO_2 . A las 24 h presentaron un 70% de confluencia, se tiró el medio, se lavó con una solución amortiguadora salina de fosfatos (PBS) pH 7.2 frío, se infectó con una suspensión de virus 1:10 durante 1 h a 37° C, se retiró el inóculo, se le agregó medio fresco sin SFB y se incubaron a 37° C. Cuando éstas presentaron un efecto citopático (aproximadamente a los 7 días), se realizó una lisis mediante congelación y descongelación por tres veces, se centrifugó a 3,000 x g (Centrífuga Beckman® L8-80 California, EUA) durante 10 min para quitar detritus celulares. ^{15, 21, 26, 29, 45} El sobrenadante se alicuotó y se cuantificó la cantidad de proteína por el método de Bradford, las proteínas se separaron mediante electroforesis (Cámara de electroforésis Mini-Protean II, BIO-RAD® California, EUA) en un gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de amonio

(SDS-PAGE), el gel fue teñido con azul de Coomassie para observar su integridad, las alícuotas se almacenaron a -80°C hasta su uso.¹⁰⁸

Se realizó la titulación del virus en microplacas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (NUNC® California, EUA) en los cuales se hicieron diluciones décuples seriadas del virus, iniciando con una dilución 1:10, en un volumen de 100 μl , a las cuales se les agregaron 100 μl de una suspensión de células Vero (3.5×10^5 células/ ml), por cada dilución se realizaron 8 pozos, se dejó incubar por 6 días y se observó el efecto citopático producido en cada dilución viral. Con los resultados registrados se calculó el título viral mediante el método de Reed-Münch.^{103, 121} En este ensayo se utilizó la cepa Rockborn de CDV (cepario del Laboratorio de Virología, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM) como control positivo y células Vero sin infectar como control negativo.

Adicionalmente, las células infectadas con las diferentes cepas del virus de moquillo canino fueron procesadas para inmunofluorescencia (prueba de rutina de diagnóstico de moquillo canino) en el Laboratorio de Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Western Blot

Previo a la estandarización de la ELISA, se analizaron tanto el antígeno como los sueros controles positivos (sueros de perros hiperinmunes a CDV) y los sueros controles negativos (sueros de perros no inmunizados) , mediante un inmunoensayo tipo Western Blot. Esto fue importante para establecer los sueros como controles positivos y negativos, en el ensayo de ELISA. El Western Blot se llevó a cabo siguiendo la metodología reportada por Martínez (1998) ¹⁰⁸, brevemente se realizó lo siguiente: las proteínas totales de la cosecha viral (80 µg/ pozo) se separaron por electroforesis tipo SDS-PAGE al 12%, posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se incubó con 5 sueros de perros hiperinmunes a CDV y 5 sueros de perros sin inmunizar. Después se marcó con proteína A-peroxidasa y se reveló con 4 chloro-naphtol. Se analizó la reacción observada en la membrana.

Desarrollo.

En un inicio se realizaron diluciones del antígeno para seleccionar la concentración idónea en la cual los sueros positivos y negativos mantuvieron una mayor distancia en los valores de absorbancia, en esta etapa se utilizaron 5 sueros de perros hiperinmunes a CDV (controles positivos) y 5 sueros de perros sin inmunizar (controles negativos), analizados previamente mediante Western Blot.

Se realizaron diluciones dobles seriadas del antígeno a partir de 1:2 hasta 1:32. En microplacas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (NUNC® California, EUA), se fijaron 100 μ l / pozo de estas diluciones durante 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron tres veces con 250 μ l/pozo de PBS pH 7.2 con 0.05% de Tween 20 (PBS-T) en un lavador de microplacas (Immunowash 1250 BIO-RAD® California, EUA), se bloquearon con una solución de albúmina sérica bovina (Sigma® St. Louis, MO, EUA) al 1%, 200 μ l / pozo durante 12 h a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con PBS-T. Posteriormente se colocaron los sueros positivos y negativos, a una dilución 1:100 (dilución estándar inicial) durante 2 h a 37° C, después se incubaron con 100 μ l de una solución de Proteína A unida a peroxidasa como segundo anticuerpo, a una concentración de 1 μ g/ ml durante 2 h a 37° C. Se realizaron de nuevo tres lavados y se agregaron 100 μ l de sustrato cromógeno, el cual contenía 120 μ g/ ml de ácido 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfónico (ABTS) (Sigma® St. Louis, MO, EUA) y 0.38 μ l/ml de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) ambos diluidos en solución amortiguadora de citratos pH 4.0 (Ácido cítrico 110 mM, citrato de sodio 100 mM). Las placas se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente y se realizaron lecturas a los 15, 25, 35 y 45 min en un lector de microplacas (3550 BIO-RAD® California, EUA) a una longitud de onda de 405 nm.^{107, 108}

Ya establecida la cantidad de proteína a fijar como antígeno en la placa, se analizaron los sueros control a diluciones triples seriadas (1:50, 1:150, 1:450,

1:1350, 1:4050 y 1:12150) para determinar las diluciones en las cuales los sueros presentaban una mayor diferencia entre positivos y negativos.

Posteriormente se procedió a analizar los sueros de los lobos marinos, la prueba de ELISA indirecta se realizó de la siguiente manera: en las microplacas se fijaron 5 µg / pozo de proteínas totales (dilución 1:8 de cosecha viral) en un volumen de 100 µl, se realizaron lavados, se bloqueó con ASB, se volvió a lavar, se incubaron diluciones triples seriadas de los sueros de lobos marinos iniciando en 1:50 hasta 1:450 durante 2 h a 37° C, se lavaron con PBS-T, posteriormente se agregaron 100 µl de una solución de Proteína A unida a peroxidasa a una concentración de 1 µg/ ml durante 2 h a 37° C. Se realizaron de nuevo tres lavados y se agregaron 100 µl del sustrato cromógeno. Las placas se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente y se tomaron lecturas de absorbancia a los 15, 25, 35 y 45 min en el lector de microplacas a una longitud de onda de 405 nm.^{107, 108} En cada microplaca se incluyeron un suero control positivo, un suero control negativo y un blanco (sin suero). Cada muestra de suero de lobo marino se analizó por duplicado en cada microplaca y a su vez cada microplaca se repitió tres veces. Se obtuvo el promedio de los valores de absorbancia de cada muestra, con los que se calculó la media y la desviación estándar de la población.

Análisis estadístico.

Se aplicó el método Reed-Münch para obtener el título viral a partir de cultivo celular, siguiendo la metodología mencionada anteriormente en una microplaca.

¹²¹ En la prueba de ELISA los resultados obtenidos de los sueros tanto controles como de los lobos marinos se analizaron mediante una prueba de estadística descriptiva como el análisis de varianza. Los valores de absorbancia obtenidos con los sueros positivos y negativos a las diferentes diluciones analizadas y a los diferentes tiempos de incubación con el sustrato cromógeno, se procesaron mediante un análisis de varianza $P = 0.05$, para establecer las condiciones en las cuales los sueros positivos se diferenciaban mejor de los negativos. Esto mismo se realizó con los sueros de los lobos marinos para compararlos con los sueros positivos y los negativos. ¹²²

2.3 Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Extracción de ARN total

Para el control positivo, se realizó la extracción del ácido ribonucleico (ARN) total a partir de una botella de cultivo celular (NUNC® California, EUA) de 25 cm² de células Vero infectadas con el virus de moquillo de la misma forma que se hizo para obtener el antígeno de captura del ELISA. Para el control negativo se realizó la extracción de ARN total de una botella de 25 cm² con células Vero sin infectar.

La extracción se realizó de la siguiente manera:

1. Se retiró el medio de cultivo.
2. El monoestrato se lavó dos veces con PBS frío. Se retiró el remanente de PBS.
3. Se agregó 1 ml de Trizol® (Invitrogen® California, EUA) se bañó varias veces el estrato con la pipeta y se pasó a un microtubo.
4. Se incubó 5 min a temperatura ambiente.
5. Se agregaron 200 µl de cloroformo, se agitó por 15 seg y se incubó durante 3 min a temperatura ambiente.
6. Se centrifugó a 12,000 x g durante 15 min a 4° C. Se transfirió la fase superior acuosa a un microtubo nuevo.
7. Se precipitó con 0.5 ml de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubó 10 min a temperatura ambiente.
8. Se volvió a centrifugar a 12,000 x g durante 10 min a 4° C. Se decantó el sobrenadante.
Se lavó con 1 ml de etanol al 75% preparado con agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) (Sigma® St. Louis, MO, EUA). Se mezcló por agitación.
9. Se centrifugó a 7,500 x g durante 5 min a 4° C. Se decantó el sobrenadante con cuidado y se dejó secar al aire.
10. La pastilla de ARN se resuspendió en 50 µl de agua con DEPC y se incubó a 55° C durante 10 min para disolverlo completamente.

Se realizó la extracción del ARN total de las muestras de hisopos nasales y rectales de las crías de lobos marinos de la siguiente manera:

1. Al hisopo se le agregaron 800 μl de Trizol® en un microtubo, se mezcló por agitación durante 1 min y se incubó por 5 min a temperatura ambiente.
2. Se obtuvieron 500 μl y se pasaron a un microtubo nuevo.
3. Se agregaron 100 μl de cloroformo, se agitó por 15 seg y se incubó por 3 min a temperatura ambiente.

El procedimiento restante fue igual que el anterior pero se utilizó la mitad de los volúmenes arriba mencionados.

La pastilla de ARN se resuspendió en 20 μl de agua con DEPC y se incubó a 55° C durante 10 min.

Se cuantificó el ARN de cada muestra en un espectrofotómetro (Ultrospec 3000 Pharmacia Biotech® Cambridge, Inglaterra), las muestras que obtuvieron una proporción de A_{260}/A_{280} entre 1.5 y 2 se consideraron como ARN de buena calidad, ya que este cociente da una estimación de la pureza del ARN.^{123, 124}

Se observó la integridad del ARN mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% con formaldehído¹²⁵, teñido con bromuro de etidio en una cámara horizontal (GIBCO® BRL HORIZON 58 California, EUA). Las muestras de ARN se almacenaron a -80° C hasta su uso en el RT-PCR.

Iniciadores

Se diseñó un PCR anidado, donde en el primero se amplifica un fragmento común a Morbillivirus y en el segundo mediante el uso de otro juego de iniciadores se amplifica un fragmento específico al virus de Distemper de focas.

Los iniciadores se diseñaron basándose en la secuencia de nucleótidos homóloga de la proteína P del virus del Distemper canino (GenBank N° de acceso AB028916) y de fócidos (GenBank N° de acceso X75960) ¹²⁶ (Figura 4). Estos iniciadores son pequeñas secuencias de ADN conservadas en el virus de Distemper canino, de fócidos y morbillivirus de cetáceos, por lo que amplifican a estos tres virus. Dichos iniciadores (P1 y P2) amplifican un fragmento de 696 pb del gen P.

También se sintetizó un par de iniciadores, PDV1 y PDV2 reportados por Hass, *et al.* (1991) ³³, los cuales amplifican un fragmento interno de 245 pb específico para el virus de Distemper de fócidos (Figura 6).

En caso de obtener una amplificación en el primer PCR se determina si es Distemper canino o de fócidos sometiéndolo al segundo PCR.

Figura 6. Secuencia del gen P de los virus Distemper canino y de fócidos. Se señalan los iniciadores diseñados para ambos virus (□), el fragmento del gen que amplifican (■) y los iniciadores específicos para PDV (□).

P1

PDV 1 ATGGCAGAAAGAGCAGGCCCTATCATGTCAATAAAGGGCTGGAGTGCATCAAGGCCCTCAGA
 CDV 1 ATGCCAGAAGAGCAGGCCCTATCATGTCAATAAAGGGCTGGAATGCCTCAAAGGCCCTCAGA

61 GAAATCCTCCTAACATGGAGAGATTCAAGAGGTCAGTAAACATCAGGGATCAAACCTAC
 61 GAGAATCCTCCTGACATTGAGGAGATTCAAGAGGTCAGCAGTATCAGAGATCAAACCCGC
 PDV1

121 AAGTCAAGCAAGAAAAGCGGAACACAGGTGTCAAGAGGAAGAAATCACTCAGAATATC
 121 AACCCAGGCCAAGAGAATGGAACCGCAAGCATGCAGGAAGAGGAGTCTCTCAGGATCTC

181 GATGAATCACACAGCCAGCAAAAAGGATCAAACAGTGTGACCGATGTACTCCAAGAAGAT
 181 GATGAATCACAGAGCCAGCAAAAAGGATCAAACAGTGTGACCGATGTACTCCAATAAT

241 CAGAGAGGTAGAGAGGACAATACTGCACCTGTGGAGGCAAAAAGACCGTATTGAAGAGGAT
 241 CCGGGATGTGGAGAGAGCAACTGCGCTTGTGGAGGCAGAGCCCGCTGAAGATGAC

301 ACCCAACAGGACCTGCAGTACGACGTTATTATGTTTATGATCACTGGGGTGAAGAAGTT
 301 ATCCAACAGGACCTGGAATACGATGTTATCATGTTTATGATCACAGTGGTGAAGAGGTT
 PDV2

361 AAGGGAATCGAAGATGCTGACAGTCTCATGGTACCAGCAGGCCCTCCAAGTAATAGGGGA
 361 AAGGGAATCGAAGATGCTGACAGTCTCATGGTACCAGCAGGCCCTCCAAGTAATAGGGGA

421 TTCGAAGGAAGAGAGGGAGCCTTGATGATAGCATTGAAGATTCTAGCGAAGATTATTCC
 421 TTCGAGAGAGGAGAAGGAAGCCTTGATGATAGCACTGAAGATTCTGGCGAAGATTATTCC

481 GAAGGAATGCTTCATCTAACTGGGGATATACTTTTGGCCTTAACCAGACAGAGCAGCT
 481 GAGGGAATGCTTCATCTAACTGGGGATATTCTTTCGGCCTTAACCAGACAGAGCAGCT

541 GATGTGAGCATGCTAAAGGAGAGGAGTGTACTACTCTGCTTGGCACAGGGCACAAATGGC
 541 GATGTGAGCATGCTGATGGAAGAGGAATTGAGTGCTCTGCTCAAGCAAGCAGAAATGTG

601 GGGGGCCAAAAGAGGGGACGGGAACTCTACAGTTTCCGAAATAGTCCCGAAGGGAGTATA
 601 GGGATTAAGAAAAGGGATGGGAAGACTCTGAGTTCACACAATCCCGAAGGTAAGACA
 P2

661 GGGAAACCAAGTATGCGAACCATTAAAAAGGGCACAGCAGAGAAGTTAGCCTCACATGGA
 661 GAGGATCCGGAGTGTGGATCCATTAAAAAGGGCACAGGAGAGGTCAGCCTCACATGGA

721 ATGATGACCGCTGCTGGATTGACAAATGGTCAACCCGATCTGCACCAAGTCAACTGGG
 721 ATGGGGATAGTYGCTGGATCGACAAATGGTCAACCCAACTGCACTCAAGTCAACTGGG

781 GGGTCATCAGGGCCAAATGCATCTGCGGGGAGTGTCCCCAGTCTGTGACGACTGCAAAG
 781 GGATCATCAGGGCCAAAGTGTCTGCGGAGAATGTCCACCAACCTGCAATGAGTGCAAAG

841 ATGATCCAGAAATGCAAACCGAATCTGGTACGAGACCCCAACCCGAGAAACCAATGAG
 841 ATGACCCAGAAATGCAAACCGAGTCTGGTACGCAACTCCCTCCAGGACCTCAAATGAG

California, EUA); 100 U de transcriptasa reversa (SuperScript II, Invitrogen® California, EUA). Cada ensayo contó con un control positivo (ARN obtenido de células Vero infectadas con CDV) y uno negativo (ARN obtenido de células Vero sin infectar) o blanco, en este último en lugar de ARN se agregó agua. En un termociclador (Touchgene Gradient TECHNE® FTGRADZD Cambridge, Inglaterra) las muestra se sometieron a los ciclos de temperatura y tiempo mostrados en la figura 7.

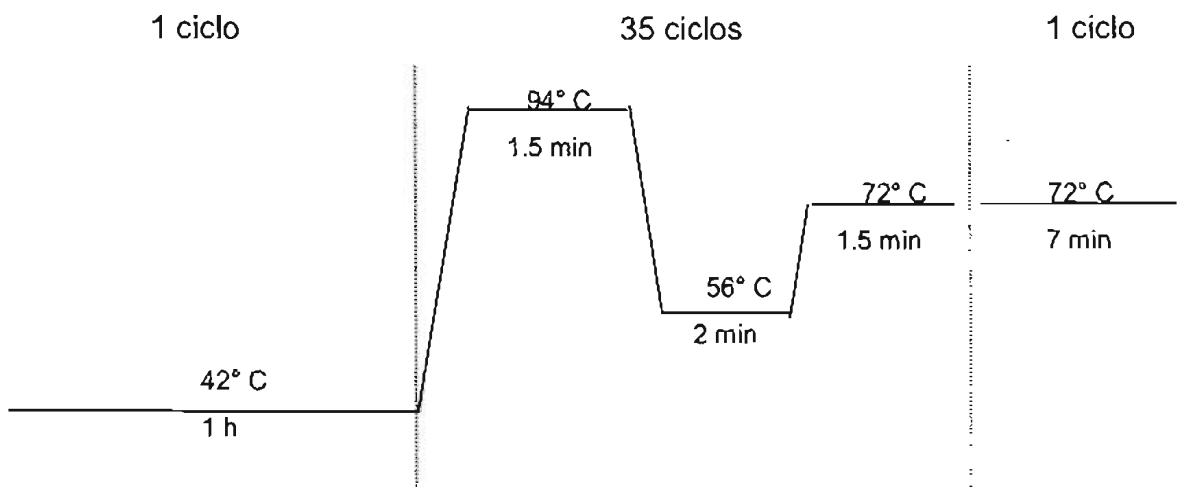


Figura 7.- Ciclos de tiempos y temperaturas de la RT-PCR 1 para amplificar el fragmento del gen P del virus de Distemper canino y de fócidos.

Los productos obtenidos se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % junto con marcador de peso molecular λ DNA/ *Hind* III (Invitrogen® California, EUA), se tiñeron con bromuro de etidio y se escanearon en un digitalizador de geles (Fluorespectr BIO-RAD® BRL California, EUA) para detectar las bandas de peso molecular esperado y registrar los resultados mediante una fotografía termosensible.

Se corroboró la amplificación del fragmento deseado mediante la digestión con la enzima de restricción *Asp718 I* (Invitrogen® California, EUA), la cual es un isoesquisómero de la enzima *Kpn I*, que corta al fragmento casi a la mitad, obteniendo dos fragmentos, uno de 302 y otro de 394 pb. Para esto se incubó a 37° C durante 1 h y posteriormente se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2% el cual se tiñó con bromuro de etidio. Además el producto se reamplificó procesándolo nuevamente en el PCR-1 omitiendo la primera incubación a 42° C, que es la fase donde actúa la transcriptasa reversa, generando el ADNc. Esto se hizo para tener un control positivo en caso de que alguna muestra amplificara una banda muy tenue y se procesara por segunda vez en el PCR-1.

Se realizaron diluciones dobles seriadas del ARN total del control positivo para determinar la cantidad mínima a someter en el RT-PCR-1 para obtener una amplificación del fragmento específico visible en el gel de agarosa.

PCR-2

Para el PCR-2 se usaron los iniciadores PDV1 y PDV2 reportados por Hass *et al.* (1991).³³ La mezcla se preparó de la siguiente manera: solución amortiguadora de PCR 10X (Gibco BRL ® Gaithersburg, EUA) 5µl; 1.5 mM de Mg Cl₂; dNTP's 10 mM 1 µl; iniciadores PDV1 10 µM 1 µl y PDV2 10 µM 1 µl; 2 U de *Taq* polimerasa y producto de PCR 2 µl en un volumen total de 50 µl. En el termociclador se

programaron los ciclos de tiempo y temperatura reportados por Hass *et al.* los cuales se muestran en la figura 8.

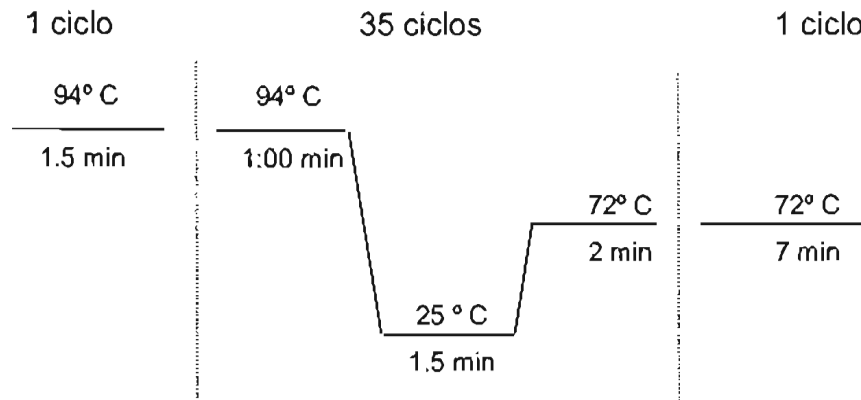


Figura 8.- Ciclos de tiempos y temperaturas de la PCR 2 para amplificar el fragmento del gen P del virus de Distemper de fócidos.

2.4 Aislamiento viral

De cada hisopo, antes de realizar la extracción de ARN se tomó una parte de la muestra con otro hisopo y se homogenizó en 0.5 ml de PBS pH 7.2 estéril en microtubos de 1.5 ml, se mantuvieron a -80°C hasta su análisis. Las muestras que no resultaron claramente negativas mediante la RT-PCR-1, se sembraron en cultivo celular para realizar el aislamiento en caso de que alguna muestra fuera positiva pero que el ARN específico estuviera degradado o fuera muy escaso y no se observara una banda bien definida en el gel con los productos de PCR.

Cultivo celular e inoculación

Se replicaron células Vero en las condiciones antes mencionadas, también se realizó un cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo (FEPO) para incrementar la posibilidad del aislamiento, ya que son células muy indiferenciadas.

El cultivo primario de fibroblastos se preparó de la siguiente manera:

Se utilizó un embrión con 12 días de incubación. El cascarón se desinfectó en la zona de la cámara de aire, con tijeras y pinzas estériles se rompió el cascarón. Se sacó el embrión tomándolo del cuello con las pinzas y se colocó en una caja de Petri estéril, se lavó dos veces con PBS pH 7.2 estéril, se cortaron las cuatro extremidades, se evisceró y el cuerpo se pasó a otra caja de Petri para volverlo a lavar con PBS. Se pasó a un vaso de precipitado y se cortó todo el cuerpo en trozos muy pequeños con unas tijeras estériles, se agregaron 3 ml de PBS para homogeneizarlo. El macerado se pasó a un tripsinizador con una bala magnética y se lavó con 10 ml de PBS, se dejó en agitación por 10 min, se decantó y el sedimento se volvió a lavar con PBS en agitación, ya decantado al sedimento se le agregaron 40 ml de tripsina al 3% y se dejó en agitación por 30 min. Después de ese tiempo se observó una suspensión turbia lechosa, la cual se pasó por un filtro de malla y se colectó el líquido en un tubo de centrifuga, el filtrado se centrifugó a 1000 x g durante 10 min a 4° C. Se decantó el sobrenadante, el paquete celular se resuspendió en 30 ml de medio 199 con 5% de SFB y se sembraron en botellas de cultivo celular de 25 cm² (NUNC® California, EUA), se incubaron a 37° C con 5% de CO₂.¹²⁷

Cada hisopo en PBS se descongeló y se le agregaron 50 µl de una mezcla de antibióticos Penicilina, Estreptomicina y Neomicina (PSN GIBCO® BRL California, EUA) y se incubó a 4° C durante 24 h.

Para la inoculación del cultivo celular se utilizaron microplacas de 96 pozos (NUNC® California, EUA). Se tomaron 50 µl del inóculo y se le agregaron 50 µl de medio 199 sin SFB, la mezcla se colocó en un pozo de la microplaca y se le agregaron 100 µl de la suspensión de células (3.5×10^5 células/ ml). Se incubaron a 37° C hasta observar un efecto citopático. Las muestras se trabajaron en dos microplacas, una con células Vero y otra con el cultivo primario FEPO, cada muestra se trabajó por duplicado en cada microplaca. Después de cuatro días de incubación se cosecharon congelando y descongelando la placa, se hicieron alícuotas y se guardaron a – 80° C. Posteriormente se realizaron 4 pases en células Vero siguiendo el mismo procedimiento de inoculación e incubación. En cada ensayo se usó el virus de Distemper cepa Lederle como control positivo y el virus de viruela y células sin infectar como controles negativos.

RT-PCR a partir de estrato celular

Al monoestrato celular del cuarto pase de cada inóculo se le retiró el medio y se hizo la extracción de ARN siguiendo el procedimiento antes descrito.

De igual manera que el ARN extraído de los hisopos, a las muestras de ARN obtenido de los cultivos inoculados se les realizó la RT-PCR-1 bajo las mismas

condiciones. Los productos obtenidos se visualizaron en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio. El medio de cultivo que se retiró previamente a la extracción de ARN se almacenó a -80° C.

2.5 RT-PCR de encéfalos de perros.

Como un ensayo de validación de la RT-PCR, se realizó la extracción de ARN de muestras de encéfalo de perros diagnosticados como positivos y negativos a moquillo mediante inmunofluorescencia por el Laboratorio de Virología (FMVZ, UNAM), los cuales se procesaron en el RT-PCR 1.

De cada muestra de encéfalo se pesaron 50 mg de corteza cerebral y se colocaron en un microtubo de 1.5 ml. Al tubo se le agregó 1 ml de Trizol y se homogenizó con la pipeta varias veces y después en vortex por 1 min. El procedimiento restante fue igual al mencionado para la extracción de ARN del estrato celular.

Las muestras se procesaron en el RT-PCR 1 y se visualizaron los productos en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

3. Resultados

ELISA

En la primera etapa de la estandarización de esta prueba se elaboró un suero anti-IgG totales de lobo marino en conejas Nueva Zelanda. Este suero se evaluó en un ensayo de Doble difusión en agar, en el cual se observaron dos líneas de precipitación en las diluciones 1:2 y 1:4 del suero.

Posteriormente se evaluó en un ensayo de ELISA, donde los sueros de las conejas presentaron una media de los valores de absorbancia de 1.048 (\pm 0.026) en ambas diluciones analizadas usando entre 10 μ g y 10 ng de antígeno/ pozo (inmunoglobulinas de lobo marino). Por otro lado la Proteína G presentó una reacción muy similar a la Proteína A, obteniendo valores de absorbancia de 0.909 (\pm 0.089) y 0.809 (\pm 0.002), respectivamente. Esta reacción se detectó hasta con 100 ng de antígeno/ pozo. Con base en estos resultados se determinó utilizar a la Proteína A en lugar de un segundo anticuerpo debido a que la reacción obtenida con los sueros de las conejas fue similar. Además los sueros controles son de origen canino, la Proteína A tiene una mayor afinidad por las Ig G de perro que la proteína G.¹¹⁶

Para realizar los inmunoensayos se replicó el virus de Distemper canino, cepas Snyder-Hill y Lederle, en células Vero. Se compararon las dos cepas virales como antígeno de captura en el ELISA. No se observaron diferencias entre ambas cepas en cuanto a los valores de absorbancia obtenidos con los sueros positivos y

negativos, por lo cual se decidió utilizar la cepa vacunal Lederle para los ensayos de ELISA y de RT-PCR.

Se realizó la titulación del virus de Distemper en células Vero mediante el método Reed-Münch^{103, 121} con el cual se obtuvo un título viral de $10^{4.59}$ DICC 50%/ ml.

Se observó la integridad de las proteínas totales de la cosecha separándolas por electroforesis tipo SDS-PAGE, teñidas con azul de Coomassie¹⁰⁸ (Figura 9).

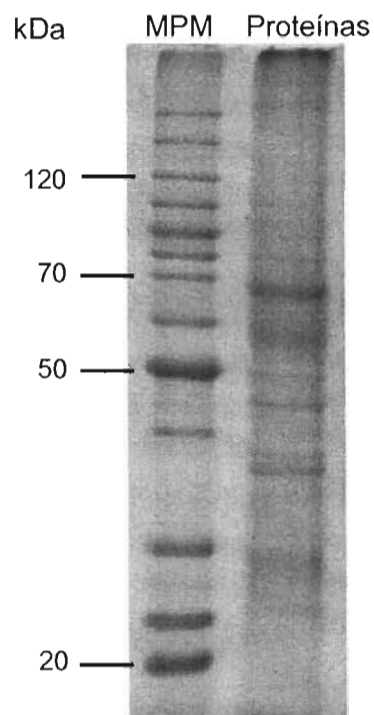


Figura 9.- Fotografía de un gel de poliacrilamida SDS al 12% teñido con azul de Coomassie donde se observa el marcador de peso molecular (MPM: BenchMark Invitrogen® California, EUA) y las proteínas de la cosecha viral cepa Lederle.

Los monoestratos infectados con las diferentes cepas del virus de distemper resultaron positivas mediante inmunofluorescencia para moquillo canino, prueba que se realiza como diagnóstico de rutina de moquillo en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

En el Western Blot, los sueros de perros hiperinmunes reaccionaron positivamente contra dos bandas de la cosecha viral, correspondiendo al peso aproximado de las proteínas P y N de CDV (70 y 60 kDa respectivamente). Los sueros negativos no presentaron reacción a ninguna proteína.

Se utilizaron las proteínas totales de la cosecha (proteínas del virus completo y de las células) como antígeno de captura; la dilución 1:8 de la cosecha viral se determinó como la óptima para realizar los inmunoensayos, fijando 5 μg de proteína total por pozo.

Los sueros control se analizaron a diferentes diluciones (1:50, 1:150, 1:450, 1:1350, 1:4050 y 1:12150), se obtuvieron los valores de absorbancia a 405 nm, con los cuales se calculó la media y la desviación estándar de los positivos y negativos. Se realizó una gráfica donde se observa una curva descendente; en la dilución 1:50 la diferencia entre positivos y negativos es significativamente mayor ya que la media de los positivos fue de 1.175 mientras que para los negativos fue de 0.156, con una desviación estándar de 0.144 y 0.059, respectivamente (Figura 10).

Cinética de los valores de los sueros controles en el ELISA

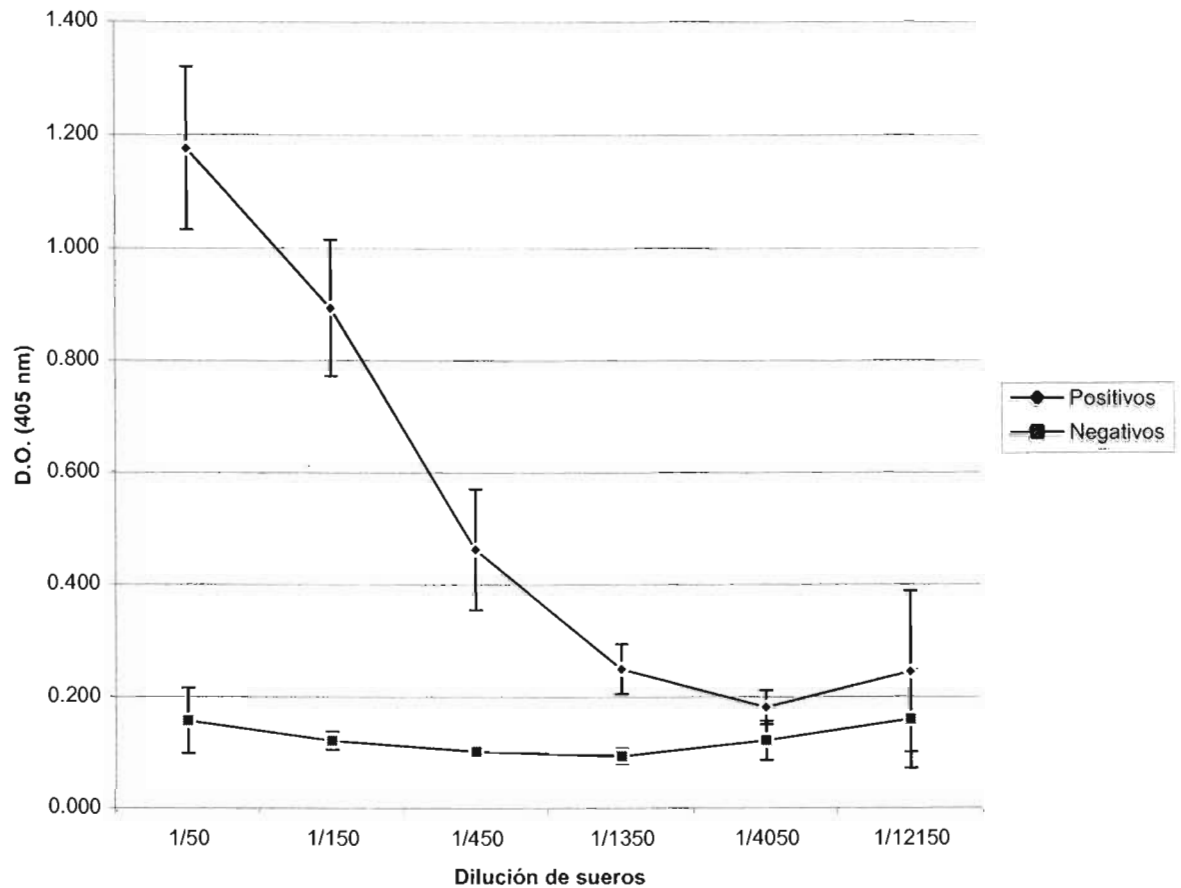


Figura 10.- Gráfica donde se muestran la media y la desviación estándar de los valores de absorbancia de los sueros controles positivos y negativos en las diferentes diluciones analizadas. Lectura a los 45 minutos.

Se realizó el análisis de varianza a partir de los valores de absorbancia obtenidos con los sueros controles positivos y negativos en todas las diluciones y a diferentes tiempos de lectura para establecer las condiciones a las cuales ambos grupos se separaron como grupos distintos ya que a altas diluciones tienden a formar uno solo. Para esto se estableció lo siguiente:

$H_0 A = B$

$H_a A \neq B$

Donde A corresponde a los valores de absorbancia de los sueros positivos y B a los valores de los sueros negativos.

Los resultados de ambos grupos determinó el rechazo de la hipótesis nula, por lo que se aceptó la hipótesis alternativa donde se consideran grupos diferentes, con una significancia de $T = 0.05$. Mediante este análisis se determinó el tiempo de lectura a los 45 min ya que a ese tiempo los controles positivos se diferencian claramente de los negativos desde la dilución 1:50 y hasta la dilución 1:450, en la dilución 1:1350 estadísticamente las poblaciones se acercan pero se mantienen como grupos separados, a partir de la dilución 1:4050 se acercan mucho los valores de ambas poblaciones, formando un solo grupo.

De acuerdo a lo anterior, se establecieron las diluciones 1:50, 1:150 y 1:450 como las óptimas para analizar los sueros a un tiempo de lectura de 45 min.

Se analizaron 35 sueros de crías de lobos marinos provenientes de la Isla San Pedro Nolasco, Sonora. La media de los valores de absorbancia detectados con los sueros de los lobos marinos se ubicó ligeramente arriba de la media de las lecturas de los controles negativos (Figura 11), esta diferencia no fue significativa.

Al realizar el análisis de varianza entre los valores de absorbancia de los sueros de los lobos marinos y los sueros controles, se determinó que los sueros de los

lobos marinos forman un grupo diferente a los sueros controles positivos, pero al compararlos con los sueros controles negativos se determinó que constituyen un mismo grupo ($P = 0.05$). Con base en estos análisis se determinaron los sueros de los lobos marinos como negativos a CDV.

Comparación de los valores de absorbancia de los sueros positivos, negativos y de las crías de lobo marino

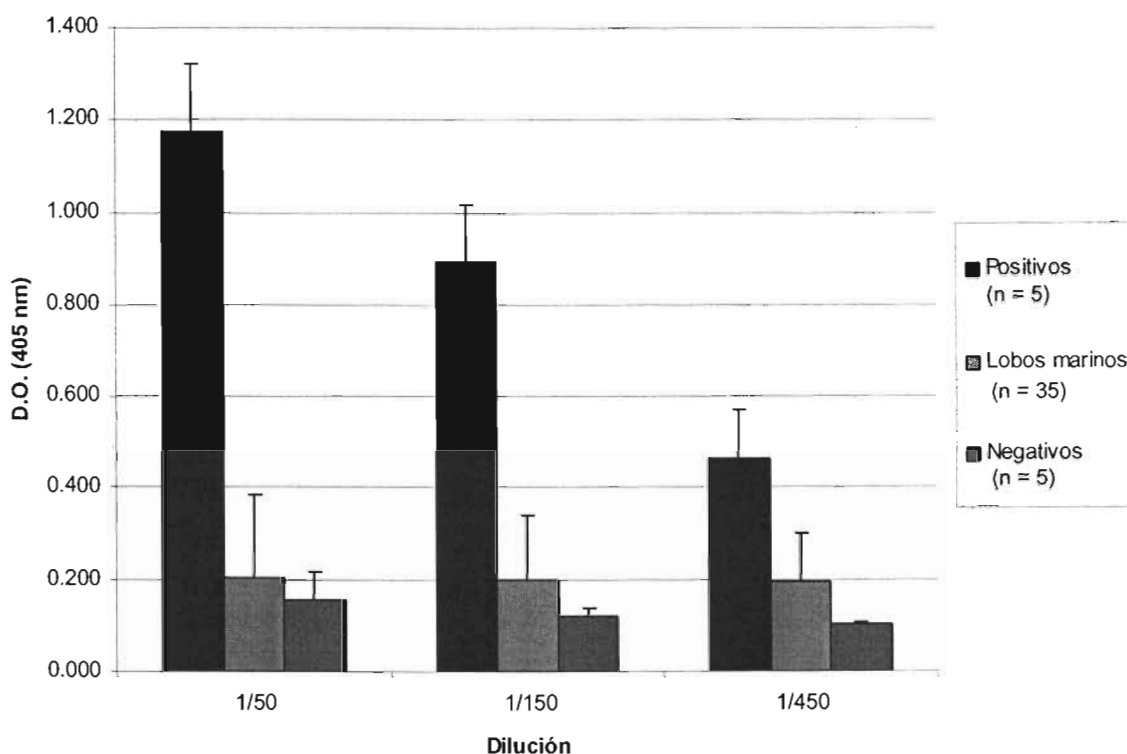


Figura 11.- Gráfica donde se muestra la media con su respectiva desviación estándar de los valores de absorbancia de los sueros control positivos y negativos (de origen canino), así como de los sueros de los lobos marinos. Lectura a los 45 min.

Tres de las 35 muestras de sueros presentaban hemólisis, dichas muestras no representaron problema alguno al momento de analizarlas mediante ELISA, ya que no se obtuvieron valores de absorbancia por reacciones inespecíficas.

RT-PCR

El ARN obtenido del cultivo infectado con el virus de Distemper canino se observó íntegro y en la cuantificación se obtuvo $1.6 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ con una proporción $A_{260}/A_{280 \text{ nm}}$ de 1.7, considerándolo como ARN de buena calidad.^{123, 124}

Se realizó la extracción de ARN de las muestras biológicas contenidas en 70 hisopos (35 nasales y 35 anales) de las crías de lobo marino. De acuerdo a la cuantificación y la observación del material genético en el gel se obtuvieron 57 muestras de ARN con una degradación mínima, 2 muestras de ARN degradado y 11 muestras de las cuales no se logró obtener ARN. Por otro lado algunas muestras se observan contaminadas con ADN. Ejemplo de las muestras de ARN obtenidas de los hisopos se observan en la figura 12.

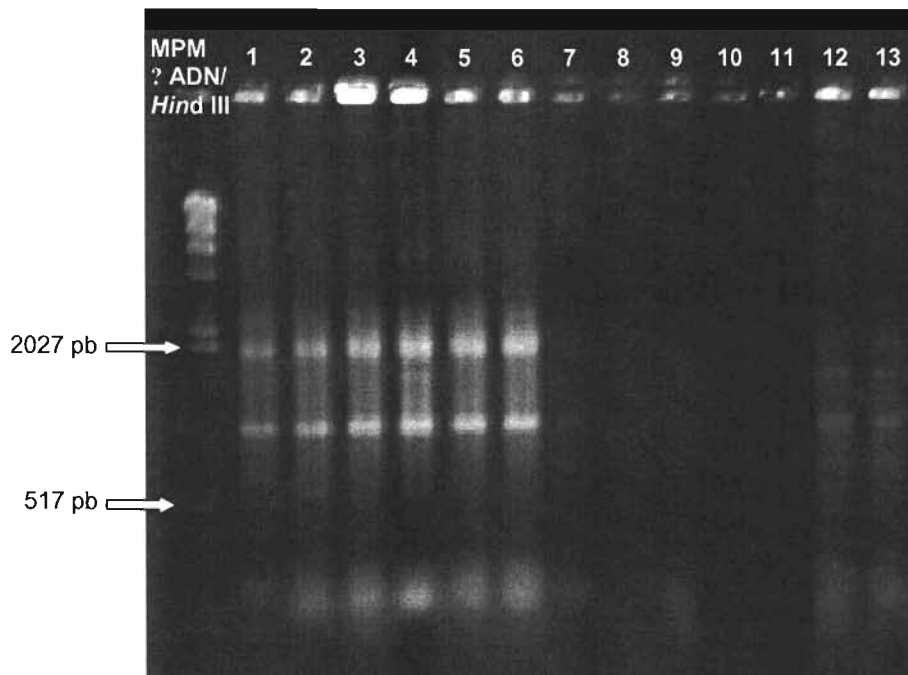


Figura 12.- Fotografía de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se observa el ARN total extraído a partir de los hisopos de las crías de lobos marinos. Carriles del 1 al 6 hisopos anales, carriles del 7 al 13 hisopos nasales. MPM = Marcador de peso molecular, ? ADN/ *Hind* III.

El ARN obtenido de los cultivos celulares infectados con el virus de Distemper canino, tanto con la cepa Lederle como con la cepa Snyder-Hill, amplificaron un fragmento de 696 pb específico para Morbillivirus, mediante la RT-PCR-1 usando los iniciadores P1 y P2.

Se corroboró que fuera el fragmento deseado mediante la digestión del producto con la enzima *Asp718 I*. Al realizar la digestión se observaron dos productos, uno de 302 y otro de 394 pb (Figura 13).

Al producto amplificado en el RT-PCR-1 se le realizó la PCR-2 usando los iniciadores PDV1 y PDV2 donde no se detectó amplificación alguna, por lo que se confirmó que el PCR-2 no amplifica el genoma de Distemper canino, ya que es específico de Distemper de fócidos. Además, el producto se pudo reamplificar procesándolo nuevamente mediante la PCR-1 eliminando la primera incubación a 42° C.

Con base en estos análisis, el ARN que amplificó mediante la RT-PCR-1 (Distemper canino) se usó como el control positivo en cada RT-PCR. El ARN obtenido de las células Vero sin infectar no amplificó ningún fragmento en el ensayo (Figura 13).

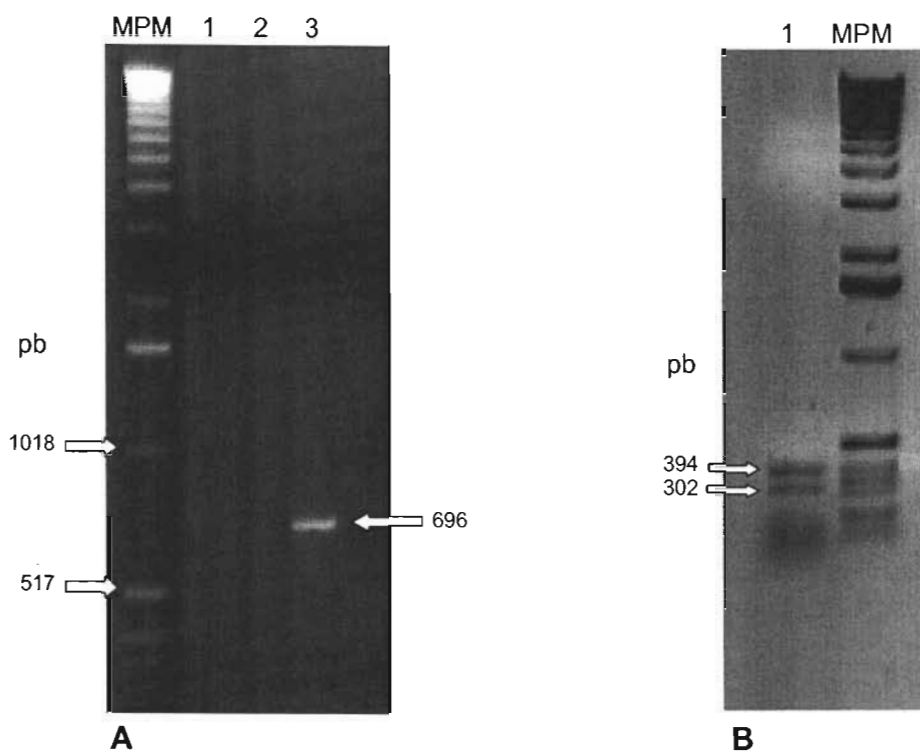


Figura 13.- **A** fotografía de un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio donde se muestra los productos de la RT-PCR-1. Carriles 1 y 2 controles negativos (a partir de ARN de células Vero sin infectar y agua respectivamente). Carril 3 el producto amplificado de 696 pb a partir de ARN de células Vero infectadas con CDV, éste se utilizó como control positivo. **B** fotografía de un gel de agarosa al 2% donde se muestra el producto de la RT-PCR-1 digerido con *Asp718 I*, se observan dos fragmentos. MPM = marcador de peso molecular, 1 Kb DNA Ladder.

Para determinar la mínima cantidad de ARN que amplifica el RT-PCR-1 se realizaron diluciones de éste. Se obtuvo amplificación del fragmento específico del gen P de Distemper canino a partir de 2.1 µg y hasta 17 ng de ARN total del control positivo mediante la RT-PCR-1 (Figura 14).

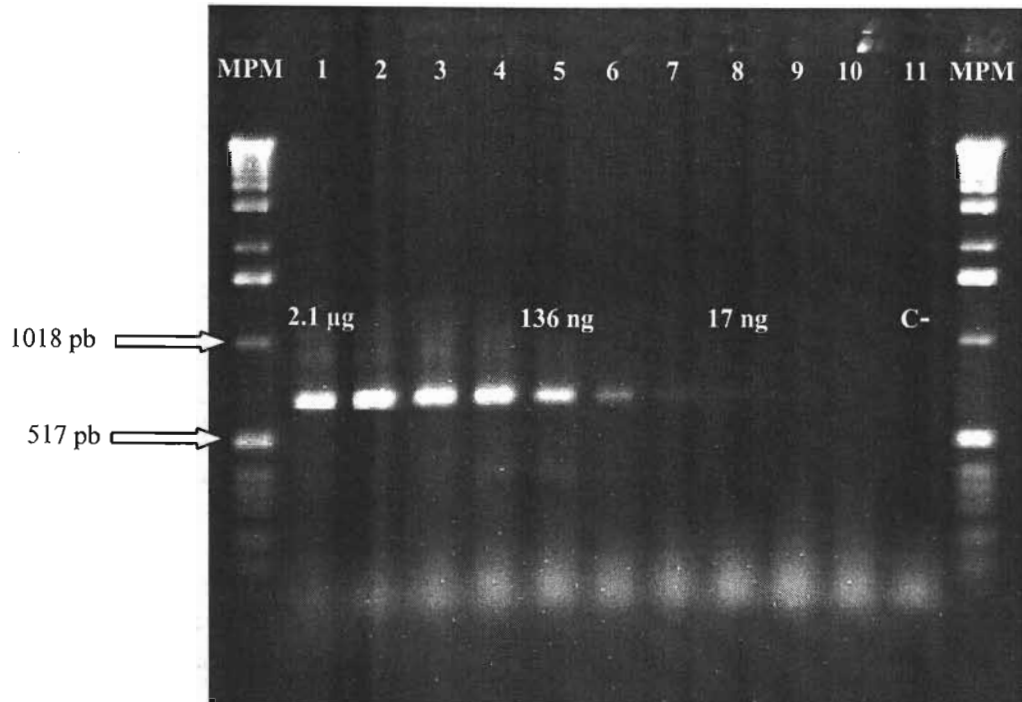


Figura 14.- Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio donde se observa el fragmento amplificado de 696 pb con las diluciones dobles seriadas del ARN total iniciando con 2.1 µg (carriles 1 al 10). Se detectó amplificación hasta con 17 ng de ARN total. Carril 11 control negativo (agua). MPM = marcador de peso molecular, 1 Kb DNA Ladder.

Aislamiento viral

Las muestras que en la RT-PCR-1 amplificaron una banda difusa o un barrido se procesaron una segunda vez en el PCR-1, sin obtener amplificación alguna. Estas muestras se inocularon en cultivo celular para hacer el aislamiento y descartar falsos negativos.

Las muestras se inocularon tanto en células Vero como en un cultivo de FEPO, a los 4 días de la infección se detectó un efecto citopático donde se observaron células redondeadas, principalmente en las células Vero. Se hicieron 4 pases de

cada muestra en células Vero, se observó efecto citopático a los 4 días de incubación, constando principalmente de formación de sincitios y células redondeadas. Las células infectadas con el virus de viruela desarrollaron un efecto citopático muy diferente, el cual constó principalmente de agregación celular en forma de racimos de uvas, llegando a formar proyecciones en forma de hongo.

Se obtuvo un ARN de buena calidad de los estratos celulares. Al realizar el RT-PCR-1 del último pase en cultivo celular no se amplificó el producto esperado ni se obtuvo un barrido como en la primer PCR, por lo que se consideraron negativas. Del mismo modo tanto el ARN de las células infectadas con el virus de viruela como de las células sin infectar, no amplificaron ningún fragmento mediante la RT-PCR 1.

El presente trabajo constituye el primer estudio sobre Morbillivirus realizado en lobos marinos de California de vida libre en México.

RT-PCR de encéfalos de perros

Se obtuvo ARN de 12 muestras de encéfalos de perros positivos y negativos a moquillo por inmunofluorescencia, en dos de las cuales el ARN se observó muy degradado. Mediante la RT-PCR se obtuvo la amplificación del fragmento a partir de las muestras positivas mientras que de las negativas no se obtuvo ninguna amplificación. Es importante señalar que se obtuvo amplificación aún con ARN muy degradado.

4. Discusión.

En este trabajo se estandarizaron y utilizaron una prueba serológica (ELISA) y una de biología molecular (RT-PCR), así mismo se utilizó el aislamiento (cultivo celular), para detectar la presencia de Morbillivirus en lobos marinos de California.

Mediante las tres pruebas empleadas en este trabajo, ELISA, RT-PCR y cultivo celular, no se obtuvo evidencia de la presencia del virus de Distemper en crías de esta colonia de lobos marinos.

Debido a la similitud del virus de Distemper canino con el de fócidos (80% aproximadamente) ⁶⁶ y por ende a la reactividad cruzada entre ambos virus, ^{1, 2, 5} se utilizó el virus canino cepa vacunal Lederle en el ELISA indirecto, aunque para el caso del Distemper de fócidos el sistema fue heterólogo, esto no representó inconveniente alguno, como lo informado previamente por Osterhaus, *et al.* ^{1, 2}, es posible encontrar evidencia serológica usando el virus de Distemper canino. Los sueros de las crías de lobos marinos no presentaron títulos detectables de anticuerpos contra el virus de Distemper canino y por lo tanto tampoco contra el de fócidos.

Como en el resto de los carnívoros, la inmunidad pasiva transmitida de la madre a la cría a través del calostro, aumenta los niveles séricos de inmunoglobulina tipo G (Ig G) principalmente, ésto bloquearía una infección por el virus.⁴⁵ Sin embargo, estos anticuerpos se detectarían mediante una prueba serológica como el ELISA

empleada en este trabajo, ya que se utilizó Proteína A en lugar de un segundo anticuerpo, la cual tiene afinidad por las Ig G. La ausencia de anticuerpos séricos contra el virus de Distemper indica que probablemente ni las crías ni las madres han estado expuestas al virus, o en caso contrario que los niveles de anticuerpos hayan decaído a tal grado que no pueden ser detectados debido al tiempo transcurrido entre el nacimiento y el muestreo. En focas comunes la vida media promedio de la inmunidad pasiva se ha estimado en 14 días.⁴⁵ No se detectó otro tipo de inmunoglobulinas como la Ig M, la cual se produce en una etapa temprana de la infección, o Ig A que puede ser secretada en mucosas.¹²⁸

La prueba de ELISA estandarizada en este trabajo podría ser usada para analizar muestras hemolizadas, ya que no se obtuvieron valores de absorbancia elevados debidos a un fondo en la reacción.

Las muestras utilizadas para detectar el virus se consideraron adecuadas ya que se ha informado que en pinnípedos el virus se elimina por vía respiratoria, urinaria, fecal y ocular.⁸²

Con la RT-PCR diseñada y estandarizada en este trabajo no fueron detectados los virus de Distemper canino ni de fócidos, ya que las muestras analizadas no amplificaron el fragmento de 696 pb específico del gen P de ambos virus.

Esto sugiere que las crías de lobos marinos de esta colonia no presentaban una infección activa por el virus de Distemper en el momento del muestreo. Las crías

capturadas para este trabajo tenía 5 meses de edad como máximo, se desconoce si a una mayor edad pudieran montar una respuesta inmune detectable por las técnicas aquí empleadas como consecuencia de la exposición a estos virus. En focas se ha estimado que alrededor de los 2 meses de edad su sistema inmune alcanza la madurez, por lo que hasta esa edad pueden montar una respuesta inmune propia.⁴⁵

Se desconoce la situación serológica de animales juveniles o adultos de la colonia ya que no se muestrearon individuos mayores a 5 meses.

El ARN obtenido de algunas muestras fue escaso y en 11 de estas no fue posible obtenerlo. Esto puede deberse a que el material tomado con el hisopo fue poco, además de que pudo ser degradado durante el almacenamiento y el transporte de las muestras, ya que el ARN de una cadena es muy lábil¹²⁹ siendo susceptible a la acción de enzimas propias de las muestras. Esto podría haber disminuido la probabilidad de encontrar una muestra que amplificara el fragmento buscado. Las muestras que amplificaron una banda difusa o un barrido en el RT-PCR-1 se pudieron deber a que el ARN estaba parcialmente degradado y se amplificaron pequeños fragmentos inespecíficos. Estas muestras produjeron un efecto citopático en células Vero, lo que sugirió el aislamiento de un virus, pero al realizar la RT-PCR-1 no se amplificó el fragmento específico de Distemper, lo que lleva a la conclusión de que el virus aislado no es un Morbillivirus. Actualmente se está caracterizando el virus aislado.

Se ha informado ampliamente la presencia de varias cepas de Calicivirus en lobos marinos de California, hasta el momento se han reconocido 14 serotipos en animales marinos, de los cuales 8 se han aislado de *Zalophus californianus*. Se considera una enfermedad enzoótica, la cual produce problemas respiratorios y nerviosos además de partos prematuros y vesículas cutáneas donde se encuentra el virus.^{130, 131, 132, 133, 134} La signología que induce Calicivirus es parecida a la producida por Distemper, por lo que se pueden confundir estas dos patologías. Los Calicivirus son también virus ARN^{129, 130} por lo que es posible que durante la transcripción reversa se obtuvieran copias del ARN de este virus, observándose ADNc en el gel.

Los lobos marinos tienen interacción con especies migratorias dentro del Golfo de California, se forman grupos mixtos de alimentación donde interactúan aves marinas, delfines, lobos marinos y ballenas.¹³⁵ Por este comportamiento existe la posibilidad de que si alguna especie proveniente del Pacífico fuera portadora de estos virus, se transmitieran a los lobos marinos. En febrero de 1999 hubo una mortalidad de lobos marinos en la Isla San Jorge, en una reunión de la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPa) se informó verbalmente de la detección del virus de Distemper canino y de fócidos mediante PCR en estos animales. Con base en esto, es probable que animales convalecientes tuvieran contacto con individuos de San Pedro Nolasco y el virus se transmitiera a esta colonia, por lo que existía la probabilidad de encontrar animales serológicamente positivos, ya que el contacto con este tipo de virus

genera una inmunidad que permanece durante largo tiempo, incluso durante algunos años.^{45, 102}

Algo importante a considerar es que Reidarson, *et al.* (1998), informaron la detección del Morbillivirus de cetáceos en delfines comunes del Pacífico Norte los cuales también presentaban anticuerpos contra el mismo.⁸⁰ De igual manera Van Bresseem, *et al.* (1998) detectaron delfines seropositivos a Morbillivirus de cetáceos en el Pacífico sureste, específicamente en las costas de Perú.⁷⁹ Esto sugiere que otro Morbillivirus está presente en el Pacífico, no muy lejos de las costas de México.

Además de la interacción de los lobos marinos con otras especies marinas, también hay que tener en cuenta su interacción con algunas especies terrestres como es el caso de isla Tiburón donde se han observado coyotes en la zona intermareal alimentándose de carroña.¹³⁵ Además de las especies silvestres, también hay cierto contacto con especies domésticas, durante el muestreo de este trabajo, se observaron algunas embarcaciones en las cuales iban a bordo perros, los turistas visitan las islas junto con sus mascotas constituyendo un riesgo para los lobos marinos.

La cantidad de muestras analizadas (35) son representativas de la colonia reproductiva de la Isla San Pedro Nolasco, sin embargo, sería conveniente analizar muestras de animales juveniles y adultos para conocer su situación serológica con respecto a estos Morbillivirus.

Hasta el momento no existen informes de Distemper en lobos marinos de California de vida libre, sin embargo, Barrett, *et al.* (2004) detectaron el virus de Distemper canino en un lobo marino en cautiverio, del cual se desconoce si el momento de exposición al virus fue antes de ser capturado o en el recinto, en Inglaterra.⁸⁶ En 1994, este animal presentó algunos episodios de signología nerviosa, se le realizaron varios análisis y no fue posible identificar algún patógeno. Un año después el animal murió, a la necropsia, macroscópicamente no se encontraron hallazgos relevantes, al examen microscópico tampoco se encontraron lesiones sugerentes a una infección por Morbillivirus, sin embargo, por la signología presentada se realizó la prueba de inmunohistoquímica, resultando positiva en encéfalo con un suero policlonal anti-CDV, indicando una encefalopatía por Morbillivirus. No se detectó el virus en otro tejido, lo cual indica que la infección estaba restringida a sistema nervioso. Con base en esto realizaron la prueba de RT-PCR con los iniciadores universales para Morbillivirus, los cuales amplifican un fragmento del gen P, el análisis filogenético del fragmento obtenido indicó que estaba muy relacionado con la cepa Onderstepoort de CDV. No se encontró evidencia de inmunodepresión, característica de una infección clásica por Distemper. Debido a la ausencia de lesiones en sistema nervioso central se sospecha que fue una infección accidental sin relación alguna con la patología. Es sabido que algunos Morbillivirus pueden persistir en tejido nervioso y causar lentamente una enfermedad degenerativa, como es el caso del virus del sarampión y CDV.⁸⁶ Esto sugeriría que los lobos marinos son susceptibles a una infección por CDV aunque por otro lado no desarrollarían la enfermedad, como lo demostrado en una foca gris inoculada con CDV.⁸²

El único estudio sobre Distemper en lobos marinos de vida libre que se conoce, es el que se llevó a cabo en las islas de Galápagos cuando se presentó una epidemia de moquillo en la población canina a principios del año 2000. Se tomaron las medidas pertinentes para evitar el contacto de los perros con las poblaciones de pinnípedos de las islas (lobo marino de Galápagos y lobo fino de Galápagos), el Dr. Albert Osterhaus, del Centro de Rehabilitación y de Investigación de Focas de Holanda, realizó un estudio serológico en los lobos marinos de las diferentes colonias e islas, sin encontrar evidencia de infección.¹³⁶

Al analizar la distribución de este agente en pinnípedos, se puede plantear la hipótesis de que este tipo de virus requiere ambientes fríos para mantenerse activo y así dispersarse en una población. El Golfo de California presenta temperaturas muy elevadas durante el verano, época en la que se reúnen los lobos marinos para aparearse. Las islas del Golfo se pueden caracterizar como calientes y secas ya que la precipitación pluvial varía entre los 100 y 150 mm al año.¹³⁷ Las temperaturas registradas oscilan alrededor de los 30° C a la sombra a principios del verano, sin embargo, las temperaturas alcanzan los 40° C a finales de la estación.^{137, 138} Durante el muestreo se registraron temperaturas de hasta 42° C en la lobera reproductiva. Si se considera que los lobos marinos permanecen en las orillas de las islas, en las cuales las temperaturas son mayores a las registradas a la sombra, es muy poco probable que estos virus permanezcan activos en el medio ambiente, evitando así su dispersión.

En contraste a toda la información disponible sobre Distemper en focas, lo que se conoce de estos virus en lobos marinos es prácticamente nulo, a excepción de lo publicado por Barrett, *et al.* (2004), sobre el caso del lobo marino en cautiverio en Inglaterra ⁸⁶ y el estudio realizado en lobos marinos de Galápagos. ¹³⁶ Lo que indica que hasta el momento no se ha publicado ningún trabajo sobre Morbillivirus o Distemper en lobos marinos de California de vida libre en México, siendo el presente trabajo el primero.

Los resultados de este trabajo coinciden con lo informado por Duignan, *et al.* (1995) en focas del Pacífico, debido a que no se ha encontrado evidencia serológica contra Morbillivirus en poblaciones de pinnípedos, específicamente en focas comunes y grises. ⁴⁴

Los lobos marinos de California son susceptibles a estos virus, si estas poblaciones tuvieran contacto con dichos agentes a través de un reservorio o transmisor, se presentaría una alta mortalidad. México cuenta con una especie endémica de pinnípedo, el lobo fino de Guadalupe (*Arctocephalus townsendi*), la cual es una especie que estuvo a punto de extinguirse y que ahora está en recuperación, ^{139, 140} sería muy riesgoso que esta especie sufriera una merma debido a una mortalidad por Morbillivirus. De ahí resulta la importancia de realizar monitoreos para detectar estos agentes y conocer sus posibles consecuencias, como las epidemias presentadas en Europa. ^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9}

5. Conclusiones

1. No se encontró evidencia de la presencia del virus de Distemper en crías de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) de la isla San Pedro Nolasco, Sonora.
2. Se estandarizó la técnica de ELISA indirecto para detectar anticuerpos séricos contra el virus de Distemper en lobos marinos.
3. Se estandarizó la técnica de RT-PCR para detectar el virus de Distemper a partir de muestras biológicas nasales y anales de lobos marinos.
4. El presente trabajo constituye el primer estudio sobre Morbillivirus realizado en crías de lobo marino de California de vida libre que se tiene conocimiento.

Prospectivas

1. Confirmar el aislamiento de un virus diferente a Morbillivirus, el cual se deberá caracterizar.
2. Se propone la prueba de ELISA estandarizada como una herramienta para evaluar la respuesta inmune humoral de perros contra el virus de Distemper canino.
3. Se propone la RT-PCR estandarizada como una prueba para detectar el virus de Distemper canino en muestras biológicas de perros.
4. Es necesario llevar a cabo estudios más extensos sobre Morbillivirus en las poblaciones de mamíferos marinos en México para conocer mejor la epidemiología y patogenia de estos virus en especies marinas.

Literatura citada

- 1 .- Osterhaus AD, Vedder EJ. Identification of virus causing recent seal deaths. Nature, 1988; 335: 20.
- 2 .- Osterhaus AD, Groen J, de Vries P, Uytdehaag FG, Klingeborn B, Zarnke R. Canine distemper virus in seals. Nature, 1988; 335: 403-404.
- 3 .- Kennedy S, Smyth JA, Mc Cullough SJ, Allan GM, Mc Neilly F, Mc Quaid S. Confirmation of cause of recent seal deaths. Nature, 1988; 335: 404.
- 4 .- Goodhart CB. Did virus transfer from harp seals to common seals? Nature 1988; 336: 21.
- 5 .- Osterhaus ADME, Groen J, Spijkers HEM, Broeders HWJ, UytdeHaag FGC M, de Vries P, *et al.* Mass mortality in seals caused by a newly discovered virus-like morbillivirus. Vet Microbiol 1990; 23: 343-350.
- 6 .- Kennedy S. A review of the 1988 European seal morbillivirus epizootic. Vet Rec 1990; 127:563-567.
- 7 .- Kennedy S, Smyth JA, Cush PF, Duignan P, Platten M, McCullough SJ, *et al.* Histopathologic and immunocytochemical studies of distemper in seals. Vet Pathol 1989; 26: 97-103.
- 8 .- Bergman A, Järplid B, Svensson BM. Pathological findings indicative of distemper in European seals. Vet Microbiol 1990; 23: 331-341.
- 9 .- Thompson PM, Cornwell HJ, Ross HM, Miller D. Serologic study of phocine distemper in a population of harbor seals in Scotland. J Wild Dis 1992; 28(1): 21-27.

-
- 10.- Baker JR. The pathology of phocine distemper. *The Science of the Total Environment* 1992; 115 (Special Issue: Chemical contaminants and viral infection in sea mammals in UK coastal waters) 1-7.
 - 11.- Mahy BWJ, Barrett T, Evans S, Anderson EC, Bostock CJ. Characterization of a seal morbillivirus. *Nature* 1988; 336: 115.
 - 12.- Bostock CJ., Barrett T, Crowther JR. Characterisation of the European seal morbillivirus. *Vet Microbiol* 1990; 23: 351-360.
 - 13.- Barrett T, Crowther J, Osterhaus ADME, Subbarao SM, Groen J, Hass L, *et al.* Molecular and serological studies on the recent seal virus epizootics in Europe and Siberia. *The Science of the Total Environment* 1992; 115 (Special Issue: Chemical contaminants and viral infection in sea mammals in UK coastal waters) 117-132.
 - 14.- Cosby SL, McQuaid S, Duffy N, Lyons C, Rima BK, Allan GM, *et al.* Characterization of a seal morbillivirus. *Nature* 1988; 336: 115-116.
 - 15.- Liess B, Frey HR, Zaghawa A, Stede M. Morbillivirus Infection of Seals (*Phoca vitulina*) during the 1988 Epidemic in the Bay of Heligoland. *J Vet Med B* 1989; 36: 601-608.
 - 16.- Liess B, Frey HR, Willhaus T, Zaghawa A. Morbillivirus Infection among Seals (*Phoca vitulina*) during the 1988 Epidemic in the Bay of Heligoland *J Vet Med B*. 1989; 36: 709-714.
 - 17.- Hughes DE, Carter SD, Robinson I, Clarke DD, Clarke CJ. Anti-canine distemper virus antibodies in common and grey seals. *Vet Rec* 1992; 130: 449-450.

-
- 18.- Cornwell HJC, Anderson SS, Thompson PM, Mayer SJ, Ross HM, Pomeroy PP, *et al.* The serological response of the common seal (*Phoca vitulina*) and the grey seal (*Halichoerus grypus*) to phocine distemper virus as measured by canine distemper virus neutralisation test. *The Science of the Total Environment* 1992; 115 (Special Issue: Chemical contaminants and viral infection in sea mammals in UK coastal waters) 99-116.
- 19.- Harder TC, Klusmeyer K, Frey H-R, Örvell C, Liess B. Intertypic differentiation and detection of intratypic variants among canine and phocid morbillivirus isolates by kinetic neutralization using a novel immunoplaque assay. *J Virological Meth* 1993; 41: 77-92.
- 20.- Örvell C, Blixenkrona-Möller M, Svansson V, Have P. Immunological relationships between phocid and canine distemper virus studied with monoclonal antibodies. *J Gen Virol* 1990; 71: 2085-2092.
- 21.- Osterhaus AD, Visser IK, de Swart RL, van Bressema MF., van de Bildt MW, Örvell C. *et al.* Morbillivirus threat to Mediterranean monk seals. *Vet Rec* 1992; 130: 141-142.
- 22.- Rima BK, Cosby SL, Duffy N, Lyons C, O'Loan D, Kennedy S, *et al.* Humoral immune responses in seals infected by phocine distemper virus. *Res Vet Sci* 1990; 49: 114-116.
- 23.- Rima BK, Curran MD, Kennedy S. Phocine distemper virus, the agent responsible for the 1988 mass mortality of seals. *The Science of the Total Environment* 1992; 115 (Special Issue: Chemical contaminants and viral infection in sea mammals in UK coastal waters) 45-55.

-
- 24.- Curran MD, Loan DO, Rima BK, Kennedy S. Nucleotide sequence analysis of phocine distemper virus reveals its distinctness from canine distemper virus. Vet Rec 1990; 127: 430-431.
- 25.- Kövamees J, Blixenkrone-Möller M, Sharma B, Örvell C, Norrby E. The nucleotide sequence and deduced amino acid composition of the haemagglutinin and fusion proteins of the morbillivirus phocid distemper virus. J Gen Virol 1991; 72: 2959-2966.
- 26.- Curran MD, Lü YJ, Rima BK. The fusion protein gene of phocine distemper virus: nucleotide and deduced amino acid sequences and a comparison of morbillivirus fusion proteins. Arch Virol 1992; 126: 159-169.
- 27.- Curran MD, Rima BK. The genes encoding the phospho- and matrix proteins of phocine distemper virus. J Gen Virol 1992; 73: 1587-1591.
- 28.- Curran MD, O'Loan D, Kennedy S, Rima BK. Molecular characterization of phocine distemper virus: gene order and sequence of the gene encoding the attachment (H) protein. J Gen Virol 1992; 73: 1189-1194.
- 29.- Visser IK, Bildt MW, Brugge HN, Reijnders PJ, Vedder EJ, Kuiper J, *et al.* Vaccination of harbour seals (*Phoca vitulina*) against phocid distemper with two different inactivated canine distemper virus (CDV) vaccines. Vaccine, 1989; 7: 521-526.
- 30.- Osterhaus ADME, UytdeHaag FGCM, Visser IKG, Vedder EJ, Reijnders PJM, Kuiper J., *et al.* Seal vaccination success. Nature 1988; 337: 21.
- 31.- Osterhaus A. A morbillivirus causing mass mortality in seals. Vaccine 1989; 7.

-
- 32.- Van Bresseem MF, De Meurichy J, Chappuis G, Spenhner D, Kiény MP, Pastoret PP. Attempt to vaccinate orally harbour seals against phocid distemper. *Vet Rec* 1991; 129: 362.
- 33.- Hass L, Subbarao SM, Harder T, Liess B, Barrett T. Detection of phocid distemper virus RNA in seal tissues using slot hybridization and the polymerase chain reaction amplification assay: genetic evidence that the virus is distinct from canine distemper virus. *J Gen Virol* 1991; 72: 825-832.
- 34.- Dietz R, Heide-Jørgensen MP, Härkönen T. Mass death of harbor seals (*Phoca vitulina*) in Europe. *Ambio* 1989; 18 (5): 258-264.
- 35.- Krogsrud J, Evensen Ø, Holt G, Høie S, Markussen NH. Seal distemper in Norway in 1988 and 1989. *Vet Rec* 1990; 126: 460-461.
- 36.- Markussen NH, Have P. Phocine distemper virus infection in harp seals (*Phoca groenlandica*). *Marine Mammal Science* 1992; 8 (1): 19-26.
- 37.- Ross PS, Visser IKG, Broeders HWJ, Van de Bildt MWG, Bowen WD, Osterhaus ADME. Antibodies to phocine distemper virus in Canadian seals. *Vet Rec* 1992; 130: 514-516.
- 38.- Duignan PJ, Saliki JT, St Aubin DJ, House JA, Geraci JR. Neutralizing antibodies to Phocine Distemper Virus in Atlantic Walruses (*Odobenus rosmarus rosmarus*) from Arctic Canada. *J Wild Dis* 1994; 30 (1): 90-94.
- 39.- Carter SD, Hughes DE, Taylor VJ, Bell SC. Immune responses in common and grey seals during the seal epizootic. *The Science of the Total Environment* 1992; 115 (Special Issue: Chemical contaminants and viral infection in sea mammals in UK coastal waters) 83-91.

-
- 40.- Daoust PY, Haines DM, Thorsen J, Duignan PJ, Geraci JR. Phocine distemper in a Harp Seal (*Phoca groenlandica*) from the Gulf of St. Lawrence, Canada. *J Wild Dis* 1993; 29 (1): 114-117.
- 41.- Henderson G, Trudgett A, Lyons C, Ronald K. Demonstration of antibodies in archival sera from Canadian seals reactive with a European isolate of phocine distemper virus. *The Science of the Total Environment* 1992; 115 (Special Issue: Chemical contaminants and viral infection in sea mammals in UK coastal waters) 93-98.
- 42.- Duignan PJ, Nielsen O, House C, Kovacs KM, Duffy N, Early G, Sadove S, St. Aubin DJ, Rima BK, Geraci JR. Epizootiology of morbillivirus infection in harp, hooded and ringed seals from the Canadian arctic and western Atlantic. *J Wild Dis* 1997; 33 (1): 7-19.
- 43.- Duignan PJ, Sadove S, Saliki JT, Geraci JR. Phocine distemper in harbor seals (*Phoca vitulina*) from Long Island, New York. *J Wildl Dis* 1993; 29(3): 465-469.
- 44.- Duignan PJ, Saliki JT, St. Aubin DJ, Early G, Sadove S, House JA, *et al.* Epizootiology of morbillivirus infection in North American harbor seals (*Phoca vitulina*) and grey seals (*Halichoerus grypus*). *J Wildl Dis* 1995; 31(4): 491-501.
- 45.- Harder TC, Stede M, Willhaus T, Schwarz J, Heidemann G, Liess B. Morbillivirus antibodies of maternal origin in harbour seal pups (*Phoca vitulina*). *Vet Rec* 1993; 132: 632-633.

-
- 46.- Visser IKG, Vedder EJ, Vos HW, Van de Bildt MWG, Osterhaus ADME.
Continued presence of phocine distemper virus in the Dutch Wadden Sea seal population. *Vet Rec* 1993; 133: 320-322.
- 47.- Duignan PJ, Duffy N, Rima BK, Geraci JR. Comparative antibody response in harbour and grey seals naturally infected by a morbillivirus. *Vet Immunol Immunopathol* 1997; 55: 341-349.
- 48.- Bengtson JL, Boveng P, Franzén U, Have P, Heide-Jørgensen MP, Härkönen TJ. Antibodies to canine distemper virus in Antarctic seals. *Marine Mammal Science* 1991; 7 (1): 85-87.
- 49.- Ham-Lammé K.D, King DP, Taylor BC, House C, Jessup DA, Jeffries S, *et al.* The application of immuno-assays for serological detection of morbillivirus exposure in free ranging harbor seals (*Phoca vitulina*) and sea otters (*Enhydra lutris*) from the Western coasts of the United States. *Marine Mammal Science* 1999; 15 (2): 601-608.
- 50.- Grachev MA, Kumarev VP, Mamaev LV, Zorin VL, Baranova LV, Denikina NN, *et al.* Distemper virus in Baikal seals. *Nature* 1989;338: 209.
- 51.- Osterhaus ADME, Groen J, Uytdehaag FGCM, Visser IKG, Bildt MWG, Bergman A, *et al.* Distemper virus in Baikal seals. *Nature* 1989; 338: 209-210.
- 52.- Visser IKG, Kumarev VP, Örvell C, de Vries P, Broeders HWJ, van de Bildt MWG, *et al.* Comparison of two morbilliviruses isolated from seals during outbreaks of distemper in North West Europe and Siberia. *Arch Virol* 1990;111:149-164.

-
- 53.- Visser IKG, van der Heijden RWJ, van de Bildt MWG, Kenter MJH, Örvell C, Osterhaus ADME. Fusion protein gene nucleotide sequence similarities, shared antigenic sites and phylogenetic analysis suggest that phocid distemper virus type 2 and canine distemper virus belong to the same virus entity. *J Gen Virol* 1993; 74: 1989-1994.
- 54.- Mamaev LV, Denikina NN, Belikov SI, Volchkov VE, Visser IKG, Fleming M, *et al.* Characterisation of morbilliviruses isolated from Lake Baikal seals (*Phoca sibirica*). *Vet Microbiol* 1995; 44: 251-259.
- 55.- Svansson V, Blixenkrone-Møller M, Skirnisson K, Have P, Heje N-I, Nielsen J, *et al.* Infection studies with canine distemper virus in harbour seals. *Arch Virol* 1993; 131: 349-359.
- 56.- Harding KC, Harkonen T, Caswell H. The 2002 European seal plague: epidemiology and population consequences. *Ecology letters* 2002; 5: 727-732.
- 57.- Kennedy S, Smyth JA, Cush PF, McCullough SJ, Allan GM, McQuaid S. Viral distemper now found in porpoises. *Nature* 1988; 336: 21.
- 58.- Trudgett A, Lyons C, Welsh MJ, Duffy N, McCullough, McNeilly F. Analysis of a seal and porpoise morbillivirus using monoclonal antibodies. *Vet Rec* 1991; 128: 61.
- 59.- Kennedy S, Smyth JA, Cush PF, McAliskey M, McCullough SJ, Rima BK. Histopathologic and Immunocytochemical Studies of Distemper in Harbor Porpoises. *Vet Pathol* 1991; 28: 1-7.

-
- 60.- Lipscomb TP, Schulman Y, Moffett D, Kennedy S. Morbilliviral Disease in Atlantic Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) from the 1987-1988 Epizootic. *J Wild Dis* 1994; 30 (4): 567-571.
- 61.- Domingo M, Ferrer L, Pumarola M, Marco A, Plana J, Kennedy S, *et al.* Morbillivirus in dolphins. *Nature* 1990; 348: 21.
- 62.- Van Bresseem MF, Visser IKG, Van De Bildt MWG, Teppema JS, Raga JA, Osterhaus ADME. Morbillivirus infection in Mediterranean striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Vet Rec* 1991; 129: 471-472.
- 63.- Duignan PJ, Geraci JR, Raga JA, Calzada N. Pathology of Morbillivirus Infection in Striped Dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from Valencia and Murcia, Spain. *Can J Vet Res* 1992; 56: 242-248.
- 64.- Di Guardo G, Agrimi U, Amadeo D, McAliskey M, Kennedy S. Morbillivirus infection in a striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) from the coast of Italy. *Vet Rec* 1992; 130: 579-580.
- 65.- Visser IKG, Van Bresseem MF, de Swart RL, van de Bildt MWG, Vos HW, van der Heijden RWJ, *et al.* Characterization of morbilliviruses isolated from dolphins and porpoises in Europe. *J Gen Virol* 1993; 74: 631-641.
- 66.- Barrett T, Visser IKG, Mamaev L, Goatley L, van Bresseem M-F, Osterhaus ADME. Dolphin and Porpoise Morbilliviruses Are Genetically Distinct from Phocine Distemper Virus. *Virology* 1993; 193: 1010-1012.
- 67.- Barrett T, Blixenkrone-Møller M, Di Guardo G, Domingo M, Duignan P, Hall A, *et al.* Morbilliviruses in aquatic mammals: report on round table discussion. *Vet Microbiol* 1995; 261-265.

-
- 68.- Osterhaus ADME, de Swart RL, Vos HW, Ross PS, Kenter MJ, Barrett T. Morbillivirus infections of aquatic mammals: newly identified members of the genus. *Vet Microbiol* 1995; 44: 219-227.
- 69.- Rima BK, Wishaupt RGA, Welsh MJ, Earle JAP. The evolution of morbilliviruses: a comparison of nucleocapsid gene sequences including a porpoise morbilliviruses. *Vet Microbiol* 1995; 44: 127-134.
- 70.- Haffar A, Libeau G, Moussa A, Cécile M, Diallo A. The matrix protein gene sequence analysis reveals close relationship between peste des petits ruminants virus (PPRV) and dolphin morbillivirus. *Virus Res* 1999; 64: 69-75.
- 71.- Lipscomb T, Kennedy S, Moffett D, Ford BK. Morbilliviral Disease in a Atlantic Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*) from the Gulf of Mexico. *J Wild Dis* 1994; 30 (4): 572-576.
- 72.- Krafft A, Lichy JH, Lipscomb TP, Klaunberg BA, Kennedy S, Taubenberger JK. Postmortem Diagnosis of Morbillivirus (*Tursiops truncatus*) in the Atlantic and Gulf of Mexico Epizootics by Polymerase Chain Reaction-Based Assay. *J Wild Dis* 1995; 31 (3): 410-415.
- 73.- Duignan PJ, House C, Geraci JR, Duffy N, Rima BK, Walsh MT, *et al.* Morbillivirus infection in cetaceans of the western Atlantic. *Vet Microbiol* 1995; 44: 241-249.
- 74.- Duignan PJ, House C, Odell DK, Wells RS, Hansen LJ, Walsh MT, *et al.* Morbillivirus infection in bottlenose dolphins: evidence for recurrent epizootics in the Western Atlantic and Gulf of Mexico. *Marine Mammal Science* 1996; 12(4): 499-515.

-
- 75.- Domingo M, Vilafranca M, Visa J, Prats N, Trudgett A, Visser I. Evidence for chronic morbillivirus infection in the Mediterranean striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*). *Vet Microbiol* 1995; 44: 229-239.
- 76.- Van de Bildt MWG, Vedder EJ, Martina BEE, Ba Abou Sidi, Azza Bent Jiddou, Ould Abraham ME, *et al.* Morbilliviruses in Mediterranean monk seals. *Vet Microbiol* 1999; 69: 19-21.
- 77.- Duignan PJ, House C, Geraci JR, Early G, Copland HG, Walsh MT, *et al.* Morbillivirus infection in two species of pilot whales (*Globicephala* sp.) from the Western Atlantic. *Marine Mammal Science* 1995; 11(2): 150-162.
- 78.- Taubenberger JK, Tsai MM, Atquin TJ, Fanning TG, Krafft AE, Moeller RB, *et al.* Molecular genetic evidence of a novel morbillivirus in a Long-Finned pilot whale (*Globicephala melas*). *Emerg Infect Dis* [serial on line] 2000 Jan-Feb; 6(2). Disponible en URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol6no1/taubenberger.htm>.
- 79.- Van Bresse MF, van Waerebeek K, Fleming M, Barrett T. Serological evidence of morbillivirus infection in small cetaceans from the Southeast Pacific. *Vet Microbiol* 1998; 59: 89-98.
- 80.- Reidarson TH, McBain J, House C, King DP, Stott JL, Krafft A, *et al.* Morbillivirus infection in stranded common dolphins from the Pacific Ocean. *J Wildl Dis* 1998; 34(4): 771-776.
- 81.- Blixenkrone-Møller M, Bolt G, Jensen TD, Harder T, Svansson V. Comparative analysis of the attachment protein gen (H) of dolphin morbillivirus. *Virus Res* 1996; 40: 47-56.

-
- 82.- Kennedy S. Morbillivirus infections in aquatic mammals. In: Williams ES, Barker IK editors. Infectious Diseases of Wild Mammals. Part I/ Viral and Prion Diseases. 3a edition. Iowa: Iowa State University Press/Ames, 2001: 67.
- 83.- Duignan PJ, House C, Walsh MT, Campbell T, Bossart GD, Duffy N, *et al.* Morbillivirus infection in manatees. *Marine Mammal Science* 1995; 11(4): 441-451.
- 84.- Mos L, Ross PS, McIntosh D, Raverty S. Canine distemper virus in river otters in British Columbia as an emergent risk for coastal pinnipeds. *Vet Rec* 2003; 152: 237-239.
- 85.- Garner GW, Everman JF, Saliki JT, Follman EH, McKeirnan AJ. Morbillivirus ecology in polar bears (*Ursus maritimus*). *Polar Biol* 2000; 23: 474-478.
- 86.- Barrett T, Wohlsein P, Bidewell CA, Rowell SF. Canine distemper in a Californian sea lion (*Zalophus californianus*). *Vet Rec* 2004; 154: 334-336.
- 87.- Appel MJ, Carmichael LE. Systemic Viral Diseases. In: Catcott EJ editor. Canine Medicine vol. 1, 4a edición. Santa Barbara: American Veterinary Publications, Inc., 1979: 18-25.
- 88.- Mohanty SB, Dutta SK. Virología veterinaria. México, DF: Ed. Interamericana, 1983: 235-237.
- 89.- Hall AJ. Morbilliviruses in marine mammals. *Trends Microbiol* 1995; 3(1): 4-9.
- 90.- Bellini W J, Rota PA, Anderson LJ. Paramyxoviruses. In: Mahy B.W.J., Collier L., editors. Microbiology and microbial infections vol. 1 Virology. New York: Arnold Press, 1998: 435-461.

-
- 91.- Williams ES. Canine Distemper. In: Williams ES, Barker IK editors. Infectious Diseases of Wild Mammals. Part II/ Viral and Prion Diseases. 3a edición. Iowa: Iowa State University Press/Ames, 2001: 50-59.
- 92.- Barrett T, Rima BK. Molecular Biology of Morbillivirus Diseases of Marine Mammals. In: Pfeiffer, CJ (Ed). Molecular and Cell Biology of Marine Mammals. Florida: Krieger Publishing Company, 2002: 161-172.
- 93.- Alldinger S, Baumgärtner W, Van Moll P, Örvell C. In vivo and in vitro expression of canine distemper viral proteins in dogs and non-domestic carnivores. Arch Virol 1993; 132: 421-428.
- 94.- Harder TC, Osterhaus ADME. Canine distemper virus-a morbillivirus in search of new hosts? Trends Microbiol 1997; 5(3): 120-124.
- 95.- Lamb RA, Kolakofsky D. Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (Eds). Fundamental Virology. 4a. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 689-724.
- 96.- Barrett T, Subbarao SM, Belsham GJ, Mahy BWJ. The Molecular Biology of the Morbilliviruses. In: Kingsbury D (Ed). The Paramyxoviruses. New York: Plenum Press, 1990: 83-102.
- 97.- Tatsuo H, Ono N, Yanagi Y. Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. J Virol 2001; 75 (13): 5842-5850.
- 98.- Tatsuo H, Yanagi Y. The morbillivirus receptor SLAM (CD150). Minireview. Microbiol Immunol 2002; 46 (3): 135-142.

-
- 99 .- Bartz R, Firsching R, Meulen V, Schneider-Schaulies J. Differential receptor usage by measles virus strains. *J Gen Virol* 1998; 79 (5): 1015-1025.
- 100.-Schneider-Schaulies J. Cellular receptors for viruses: links to tropism and pathogenesis. *J Gen Virol* 2000; 81 (6): 1413-1429.
- 101.-Murphy FA, Gibbs EP, Horzinek MC, Studdert MJ. Paramyxoviridae, in *Veterinary Virology*. Third edition. California: Academic Press. 1999, 411-428.
- 102.-Greene CE. Canine Distemper, in: *Infectious diseases of the Dog and Cat*. Second edition. Pennsylvania: WB Saunders Company. 1998, 9-22.
- 103.-Payment P, Trudel M. *Methods and Techniques in Virology*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1993: 309 pp.
- 104.-Barrett T. Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. *Vet Microbiol* 1999; 69: 3-13.
- 105.-Shin YS, Mori T, Okita M, Gemma T, Kai C, Mikami T. Detection of Canine Distemper Virus Nucleocapsid Protein Gene in Canine Peripheral Blood Mononuclear Cells by RT-PCR. *J Vet Med Sci* 1995; 57 (3): 439-445.
- 106.-Gemma T, Iwatsuki K, Shin YS, Yoshida E, Kai C, Mikami T. Serological Analysis of Canine Distemper Virus Using an Immunocapture ELISA. *J Vet Med Sci* 1996; 58 (8): 791-794.
- 107.-Sánchez J M y Cambra M. Técnicas inmunoenzimáticas ELISA en patología animal y vegetal. Serie técnica N° 7, 2ª ed. París, Francia: OIE, 1987.
- 108.-Martínez D. Desarrollo y estandarización de un inmunoensayo enzimático indirecto como método de diagnóstico para la Brucelosis caprina utilizando

-
- proteínas de la membrana externa de *Brucella melitensis*. (Tesis de Licenciatura). México D. F.: UNAM 1998.
- 109.-Aguirre AA, O'Hara TM, Speaker TR and Jessup DA. Monitoring the health and conservation of marine mammals, sea turtles and their ecosystems. In: Aguirre AA, Ostfeld RS, Tabor GM, House c and Pearl MC. Conservation Medicine Ecological Health in Practice. Oxford University Press, EUA, 2002.
- 110.-Rice DW. Marine Mammals of the World. Systematics and Distribution. The Society for Marine Mammalogy. Special publication No. 4. U.S.A.: Allen Press, Inc., 1998, pp. 15-18, 28-30.
- 111.-King JE. Seals of the World. Second edition. New York: Comstock Publishing Associates and Cornell University Press. 1983. 23-27, 155 pp.
- 112.-Carretta JV, Forney KA, Muto MM, Barlow J, Baker J, and Lowry M. U.S. Pacific marine mammal stock assessments: 2003. Technical Memorandum. U.S. Department of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration, National Marine Fisheries Service. March 2004.
- 113.-Le Boeuf B, Auriolos D, Condit R, Fox C, Gismer R, Romero R, *et al.* Size and Distribution of the California Sea Lion Population in Mexico. Proceedings of the California Academy of Science. 1983; 43 (7): 77-85.
- 114.-Riedman M. The Pinnipeds. Seals, sea lions and walruses. University of California Press. Berkeley/Los Angeles Oxford. USA. 1990.
- 115.-Maravilla MO y JP Gallo-Reynoso. Familia Otariidae. In: Alvarez-Castañeda y J.L. Patton (eds.) Mamíferos del Noroeste de México II. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 2000, La Paz, B.C. 775-780.

-
- 116.-Gallo-Reynoso, JP, J. Egido-Villarreal, G, Suarez-Gracida, H. Cabrera-Santiago. 2005. Guía de Historia Natural de la Región de San Carlos y Guaymas, Sonora. CIAD, AC. Guaymas. pp 34-35. (en prensa).
- 117.-Gentry RL, Casanas VR. A new method for immobilizing otariid neonates. *Marine Mammal Science* 1997; 13 (1): 155-157.
- 118.-Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J, *et al.* *Current Protocols in Molecular Biology*. Vol. 2. Massachusetts, EUA. John Wiley & Sons, Inc., 1994.
- 119.-Vicencio MM. *Manual de Laboratorio. Prácticas de Inmunología*. 2ª ed. México, D. F. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 2005.
- 120.-Harlow E, Lane D. *Antibodies. A laboratory manual*. EUA. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
- 121.-Del Castillo E, Gómez F. *Manual de Laboratorio. Prácticas de Virología*. México D. F. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 2000.
- 122.-Kurstak E. *Enzyme Immunodiagnosis*. Orlando, Florida. Academic Press 1986.
- 123.-Chomczynski P and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 1987; 162: 156-159.
- 124.-Madrigal M. *Análisis de cambios transcripcionales relacionados con apoptosis en células cebadas tratadas con toxina A de Clostridium difficile*. (Tesis de Maestría). México, D.F.: IPN 2000.

-
- 125.-Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2a ed. Vol I. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 126.-National Center for Biotechnology Information. 2005. Disponible en URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- 127.-Cunningham C. A Laboratory Guide in Virology. 7a ed. Minnesota, EUA. Burgess Publishing Company, 1973.
- 128.-Sell S. Immunology, immunopathology and immunity. 6a ed. Washington, D. C.: ASM Press, 2001.
- 129.-Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Principios de bioquímica. 2ª ed. Barcelona, España. Ediciones Omega, 1993.
- 130.-Smith AW, Akers TG, Prato CM, Bray H. Prevalence and distribution of four serotypes of SMSV serum neutralizing antibodies in wild animal populations. J Wild Dis 1976; 12: 326-334.
- 131.-Soergel ME, Akers TG, Schaffer FL. Aminoacid composition of three immunological types of a calicivirus, San Miguel Sea Lion Virus. Virology 1976; 72: 527-529.
- 132.-Smith AW, Prato CM, Skilling DE. Characterization of two new serotypes of San Miguel Sea Lion Virus. Intervirology 1977; 8: 30-36.
- 133.-Barlough JE, Matson DO, Skilling DE, Berke T, Berry ES, Brown RF, *et al.* Isolation of reptilian calicivirus crotalus type 1 from feral pinnipeds. J Wild Dis 1998; 34 (3): 451-456.
- 134.-Dierauf LA. Handbook of Marine Mammal Medicine: health, disease and rehabilitation. Vol 1. Washington DC, CRC press, 1990.

-
- 135.-Robles P, Escurra E, Mellink E. El Golfo de California, un mundo aparte. Ed. Pegaso-Casa Lamm-Sierra Madre. Tokio, Japón. Pp. 96-97, 2001.
- 136.-Fundación Charles Darwin. 2000. Disponible en URL:
<http://www.darwinfoundation.org/news/news06210102.html>
- 137.-Cody M, Moran R, Tompson H. The plants. In: Case TJ, Cody ML. Island Biogeography in the Sea of Cortez. California: University of California Press. Pp. 51, 1983.
- 138.-Sistema meteorológico nacional/ Comisión nacional del agua. 2005. Disponible en URL: <http://smn.cna.gob.mx/productos/map-lluv/hmproduc.html>.
- 139.-Gallo RJ. Factors affecting the population growth of Guadalupe fur seal (*Arctocephalus townsendi* Merriam, 1897), in Isla de Guadalupe, Baja California, México. (Tesis de doctorado).California, EUA. University of California, Santa Cruz, 1994.
- 140.-Gallo RJ, Figueroa CA. La batalla del lobo fino de Guadalupe. 2000. Disponible en URL: <http://www.jornada.unam.mx/2000/07/10/eco-batalla.html>