



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
VIROLOGÍA Y FAUNA SILVESTRE

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y SEROLÓGICA DE
MORBILIVIRUS EN MAMÍFEROS MARINOS Y CARNÍVOROS
TERRESTRES DE LAS COSTAS DE LA PENÍNSULA DE BAJA
CALIFORNIA, MÉXICO**

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

Presenta:

LILIANA SUÁREZ RAMÍREZ

TUTOR PRINCIPAL: ROSA ELENA SARMIENTO SILVA,
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

COMITÉ TUTOR: GERARDO SUZÁN AZPIRI,
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

KARINA ACEVEDO WHITEHOUSE,
Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

México, D.F.

Noviembre, 2014



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.

Dedicatorias

Quiero dedicar este trabajo a mi papá, quien me ha apoyado en todos los aspectos de mi vida, incluso académicamente. A mi mamá, que ha sido el apoyo emocional más grande que he tenido y mi mejor amiga. A mi hermana, quien ha jugado un rol muy importante en mi vida, dándome consejos para salir adelante.

A la Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva, de quien aprendí mucho en este proceso y quien al ser una gran persona tuvo la paciencia y dedicación para que yo pudiera concluir este proyecto. También al Dr. Gerardo Suzán Azpiri, por quien me fue posible integrarme en el área de medicina de la conservación.

A Cristian Cornejo Latorre, que me ayudo a mejorar como estudiante y que ha sido un gran amigo. A J. Manuel Saavedra Montañez quien fue una guía muy buena onda y muy importante para poder realizar el trabajo. A todos mis amigos que también me apoyaron durante este camino, y a quienes aprecio muchísimo. Ustedes saben quienes son. A mis compañeros del laboratorio de virología y a mis compañeros de fauna silvestre, quienes de una u otra forma siempre influyeron sobre mi persona.

También quiero hacer una dedicatoria particular a esos seres tan vulnerables por los que tome la decisión de llevar a cabo este proyecto, refiriéndome a aquellos lobitos marinos, ballenas, perros y el coyote bebé, que permitieron hacer posible este trabajo. Siempre con el enfoque de encontrar soluciones ante las dificultades que estan viviendo en este planeta.

"Elige un trabajo que te guste y no tendrás que trabajar ni un día de tu vida" (Confucio).

Agradecimientos

Doy mis más sinceros agradecimientos a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, por brindarme un espacio dentro del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal.

Agradezco al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por otorgar el financiamiento para la realización del proyecto IN229111 y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por apoyarme con la beca para realizar dichos estudios.

También agradezco a los integrantes de mi comité tutor: Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva, Dr. Gerardo Suzán Azpiri y Dra. Karina Acevedo Whitehouse, quienes estuvieron siempre presentes, dirigiendo de la mejor manera mi proyecto de tesis.

Agradezco a los integrantes de mi jurado, quienes me dieron las mejores recomendaciones para modificar mi tesis: Dra. Rosa Elena Sarmiento silva, Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira, Dr. Luis Medrano González, Dra. Rocío Gabriela Tirado Mendoza y Dr. Rafael Ávila Flores.

A todo el equipo de CONANP-APFF, de las Islas del Golfo de California, a CONANP-Reserva de la Biósfera del Vizcaíno, a los integrantes de la salinera de Guerrero Negro, al señor Víctor de la Toba y a la señora Marisel Valladolid, quienes formaron parte del trabajo de campo. Así como también a mis compañeros, Octavio López Fernández y Rosalía Avalos Téllez.

Agradezco al personal del laboratorio de virología quienes siempre fueron un gran apoyo, en especial a José Manuel Saavedra Montañez quien fue un gran apoyo para el trabajo de laboratorio.

Resumen

A nivel mundial, se han documentado elevados índices de mortalidad ocasionados por morbilivirus, en algunas especies de mamíferos marinos. En México, la Península de Baja California es una región que presenta las condiciones óptimas para mantener el morbilivirus en circulación. Aunque, no se han reportado brotes epizooticos, algunos estudios reportan la presencia de morbilivirus en mamíferos marinos del Golfo de California. Por esta razón, el objetivo general de este trabajo es identificar la presencia de morbilivirus en diferentes especies, tanto marinas como terrestres y en diferentes regiones de la Península de Baja California. Durante los años del 2012 y 2013, se obtuvieron muestras de 192 individuos pertenecientes a 11 especies. Las muestras se analizaron molecularmente, se secuenciaron y se realizó un análisis filogenético para determinar si la especie viral circundante se encuentra relacionada entre carnívoros terrestres y mamíferos marinos. También se realizaron análisis serológicos a partir de 137 muestras de suero de lobos marinos, perros domésticos y un coyote, de los periodos 2011, 2012 y 2013. Posteriormente, se utilizó la prueba de independencia de χ^2 de Pearson para analizar si la presencia de morbilivirus se encuentra asociada a algunas variables. El análisis molecular reporta la presencia de morbilivirus en 3 crías de lobos marinos del Golfo de California, en un perro doméstico y en una cría de coyote de la vertiente del Pacífico. Asimismo, se encontró evidencia serológica para distemper canino y distemper de fócidos, en crías de lobo marino de California y perros domésticos. El análisis de independencia mostró una influencia por parte del tipo de ecosistema, fa-

milia, especie y meses sobre la presencia del agente viral. Podemos determinar que existe una importante influencia por parte de los carnívoros terrestres sobre la ocurrencia de morbilivirus en mamíferos marinos de la Península de Baja California. Se sugiere llevar a cabo proyectos que involucren la regulación de especies invasoras en islas y zonas costeras donde se incluyan programas de educación a los habitantes de la región acerca del riesgo que representan las especies domésticas para los mamíferos marinos.

Palabras clave: morbilivirus, Península de Baja California, mamíferos marinos, carnívoros terrestres, molecular, serológico.

Abstract

High mortality events in different species of marine mammals due to morbillivirus have been documented, worldwide. In Mexico, the Peninsula of Baja California is a region with ideal conditions to maintain the virus in circulation. Even though, there are no reports of epizootics, some studies report the presence of morbillivirus in marine mammals from the Gulf of California. For this reason, the main aim of this work is to identify the presence of morbillivirus in different marine and terrestrial species and in different regions of the Peninsula of Baja California. During the years 2012 and 2013, samples of 192 individuals, from 11 species were collected. The samples were analyzed molecularly, they were sequenced and a phylogenetic analysis was made, in order to determine if the circulating viral species is related between terrestrial carnivores and marine mammals. Serologic tests were also carried out from 137 serum samples that belonged to sea lions, domestic dogs and a coyote, from the years 2011, 2012 and 2013. Subsequently, we used Pearson's χ^2 test for independence, to analyze if the presence of morbillivirus is associated to some variables. Molecular analysis reports the presence of morbillivirus in 3 sea lion pups from the Gulf of California, a domestic dog and in a coyote offspring from the Pacific coast. Serologic evidence of canine distemper virus and phocine distemper virus was given in sea lion pups and domestic dogs. The independence test showed an influence of the ecosystem, family, species and months over the presence of the infectious agent. We can determine that there is an important influence from terrestrial carnivores over the presence of morbillivirus in marine mammals from the

Peninsula of Baja California. We suggest that projects that involve the regulation of invasive species should be carried out, together with educational programs that inform the population about the risks that domestic species represent to marine mammals.

Keywords: morbillivirus, Peninsula of Baja California, marine mammals, terrestrial carnivores, molecular, serologic.

Contenido

Resumen	i
Abstract	iii
Lista de Figuras	viii
Lista de Cuadros	x
1 Introducción	1
1.1 Planteamiento del problema	1
1.2 Generalidades	4
1.2.1 <i>Morbillivirus</i>	4
1.2.2 Especies centinela	7
1.2.3 Diversidad y ecología de mamíferos marinos en México	8
1.2.4 Amenazas para los mamíferos marinos	12
1.2.5 Golfo de California	17
1.2.6 Islas del Pacífico de la Península de Baja California	18
1.3 Justificación	18
1.4 Hipótesis	20
1.5 Objetivos	20
1.5.1 General	20
1.5.2 Específicos	21

2	Materiales y Métodos	22
2.1	Selección de áreas de estudio	22
2.1.1	Establecimiento de fechas y sitios	22
2.2	Áreas de estudio	22
2.3	Trabajo de campo	23
2.3.1	Captura de lobos marinos	23
2.3.2	Muestreo	24
2.4	Clasificación de las muestras	25
2.5	Conservación de las muestras	26
2.6	Análisis de laboratorio	26
2.6.1	Estandarización de la técnica y diagnóstico molecular	26
2.6.2	Secuenciación de los productos de PCR y análisis filogenético	29
2.6.3	Virus y células	30
2.6.4	Análisis serológico	31
2.7	Análisis estadístico	33
3	Resultados	35
3.1	Obtención de muestras	35
3.2	Análisis molecular (RT-PCR)	36
3.2.1	Estandarización de la técnica	36
3.2.2	Diagnóstico molecular	36
3.3	Secuenciación y análisis filogenético	40
3.4	Titulación viral	43
3.5	Análisis serológico	43
3.5.1	Neutralización con células MDCK (2011-2012)	45
3.5.2	Neutralización con células VERO (2011, 2012 y 2013)	46
3.5.3	Seroprevalencia en lobos marinos	46
3.5.4	Seroprevalencia por localidad	47

3.5.5	Seroprevalencia de CDV y PDV por localidad, de acuerdo al título de anticuerpos	51
3.6	Análisis estadístico	52
3.6.1	Relación entre las distancias geográficas de las localidades y la seroprevalencia	52
3.6.2	Factores geográficos, ambientales, temporales, poblacionales e individuales, asociados a la presencia de morbilivirus	53
4	Discusión y Conclusiones	56
	Anexo A. Reactivos	62
	Anexo B. Abreviaturas	64
	Anexo C. Fotografías	66
	Referencias	69

Lista de Figuras

1.1	Hallazgos importantes de morbilivirus a nivel mundial.	2
1.2	Diagrama esquemático de un morbilivirus conteniendo su genoma y las proteínas que lo conforman	5
1.3	Transmisión de morbilivirus entre diversas especies	7
2.1	Mapa de áreas de estudio	23
2.2	Sitio de unión de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del fragmento deseado	29
2.3	Titulación de CDV y PDV	31
2.4	Ensayo de seroneutralización	32
3.1	Imagen de gel de agarosa de la técnica estandarizada para la detección de un fragmento del gen P de morbilivirus	37
3.2	Foto de gel de agarosa de las muestras positivas mediante RT-PCR.	38
3.3	Prevalencia de morbilivirus por orden y familia	39
3.4	Número de individuos positivos a morbilivirus en las Islas del Golfo de California (lobos marinos).	40
3.5	Árbol filogenético construido con base al método de unión de vecinos.	42
3.6	Efecto citopático de CDV, cepa Lederle en células MDCK. . .	43

3.7	Efecto citopático de CDV, cepa Lederle en células VERO.	44
3.8	Efecto citopático ocasionado por PDV en células VERO.	44
3.9	Seroprevalencia de morbilivirus por especie utilizando células MDCK.	45
3.10	Seroprevalencia de morbilivirus por especie utilizando células VERO.	46
3.11	Seroprevalencia de morbilivirus en lobos marinos pertenecientes a las Islas del Golfo de California	47
3.12	Seroprevalencia de morbilivirus en lobos marinos pertenecientes a las Islas de la vertiente del Pacífico	48
3.13	Seroprevalencia de CDV en las diferentes localidades de muestreo.	49
3.14	Seroprevalencia de PDV en las diferentes localidades de muestreo.	50
3.15	Seroprevalencia de acuerdo al título de anticuerpos.	52
3.16	Influencia del ecosistema sobre la presencia de morbilivirus.	54
3.17	Influencia del grupo taxónomico (orden y familia) sobre la presencia de morbilivirus.	54
3.18	Influencia de la especie sobre la presencia de morbilivirus.	55
3.19	Influencia de los meses sobre la presencia de morbilivirus.	55

Lista de Cuadros

2.1 Mezcla de reacción para PCR	28
2.2 Protocolo de la técnica de RT-PCR	28
3.1 Cantidad de individuos muestreados por especie durante el 2012 y 2013	35
3.2 Identificación de las muestras con base a la condición en la que se encontraron los tejidos	36
3.3 Prevalencia de morbilivirus por especie	39
3.4 Porcentaje de identidad de las secuencias obtenidas con secuencias del GenBank.	41
3.5 Seroprevalencia obtenida para CDV por especie de acuerdo a la localidad de muestreo	48
3.6 Seroprevalencia obtenida para PDV por especie de acuerdo a la localidad de muestreo	51
3.7 Resultados de la prueba de independencia χ^2 de Pearson . . .	53

1. Introducción

1.1 Planteamiento del problema

Algunas especies pertenecientes al género *Morbilivirus* son emergentes en el ambiente acuático, siendo uno de los patógenos más agresivos en pinnípedos y cetáceos. En 1987 se documentaron los primeros reportes de epizootias ocasionadas por morbilivirus en mamíferos marinos. Durante este año, se produjeron altas mortalidades entre toninas (*Tursiops truncatus*) en la costa noroeste del Atlántico, donde se identificó al morbilivirus de los delfines (DMV) como el agente causal; la epizootia se repitió en los años de 1992 y 1994 (Taubenberger et al., 2000).

En 1988 se aisló el morbilivirus de marsopas (PMV) en marsopas (*Phocoena phocoena*) que murieron en la misma región del Atlántico (Taubenberger et al., 2000), en este periodo también se presentaron dos epizootias importantes en pinnípedos, ocasionadas por morbilivirus; una afectó severamente a poblaciones de focas de Siberia (*Pusa sibirica*) del lago Baikal, identificando al virus del distemper canino (CDV) como el agente causal. La otra epizootia afectó a las poblaciones de focas de puerto (*Phoca vitulina*) en el norte de Europa, en la cual murieron alrededor de 18,000 individuos. En el 2002, se presentó una nueva epizootia en la misma región en la que murieron más de 20,000 individuos. Se identificó al virus del distemper de fócidos (PDV) como el agente causal en las epizootias ocurridas en focas de puerto (Müller et al., 2004; Jensen et al., 2002; de Swart et al., 1995).

En los años de 1990, 1992 y 2007, el DMV fue la causa primaria de mortalidad entre delfines listados (*Stenella Coeruleoalba*) en las costas del Mediterráneo (Raga et al., 2008). En 1997 y posteriormente en el 2000 se identificó que el CDV era el agente responsable de mortalidades elevadas entre las poblaciones de focas del Mar Caspio (*Pusa caspica*) (Kennedy et al., 2000).

Se sabe que los morbilivirus representan un riesgo para otras especies de mamíferos marinos. Por ejemplo, en el 2002 y en el 2005, se reportó la presencia de el PDV en nutrias marinas de Alaska (*Enhydra lutris*) (Goldstein et al., 2009).

En México, *González* (2008), reportó la presencia del agente en dos individuos de ballena gris (*Eschrichtius robustus*) varadas en las costas de Sonora y Sinaloa durante el 2005 y 2006. En las Islas del Golfo de California no se han documentado casos de mortalidad ocasionados por morbilivirus en poblaciones de lobos marinos, sin embargo algunos estudios (*Rivera-Gómez*, 2010) identificaron la presencia de el CDV en esta especie mediante la técnica de RT-PCR, con la amplificación de un fragmento del gen N (que codifica para la nucleoproteína viral), obteniendo una prevalencia de hasta el 60% en esta región, durante el periodo del 2008 al 2009. (Figura 1.1) (*Rivera-Gómez*, 2010).



Figura 1.1: Hallazgos importantes de morbilivirus a nivel mundial.

A nivel mundial, se ha reportado que ciertas especies juegan un papel importante para la transmisión de morbilivirus entre mamíferos marinos, entre ellas la foca de Siberia (*Pusa sibirica*), foca del mar Caspio (*Pusa caspica*), foca de puerto (*Phoca vitulina*), foca gris (*Halichoerus grypus*), foca de Groenlandia (*Pagophilus groenlandica*), delfín listado (*Stenella Coeruleoalba*), calderon de aletas largas (*Globicephala melas*) y el calderon de aletas cortas (*G. macrorhynchus*), (Raga et al., 2008; Härkönen et al., 2006; Kennedy et al., 2000; Taubenberger et al., 2000; Mamaev et al., 1995; Duignan et al., 1995). Dado que algunas de estas especies son migratorias, como la foca gris y la foca de Groenlandia, se considera que participaron en la expansión de PDV hacia el norte de Europa, ya que estas especies pueden ser portadoras del virus sin ser afectadas por el mismo, transmitiéndolo hacia especies susceptibles como las focas de puerto. Otros factores pueden jugar un papel importante en la transmisión de este agente infeccioso. Por ejemplo, la introducción de animales domésticos e invasores a las islas y zonas costeras permite la dispersión de patógenos y facilita la transmisión de estos hacia las especies silvestres (Burek, Gulland, & O'Hara, 2008). Otros carnívoros terrestres portadores de morbilivirus como coyotes, pueden ser transmisores del virus al mantener contacto con mamíferos marinos. Asimismo, se sabe que los humanos pueden transmitir el virus mediante fómites si han estado en contacto reciente con individuos infectados (Burek et al., 2008; Härkönen et al., 2006; Mamaev et al., 1995).

La transmisión de los morbilivirus en mamíferos marinos se considera de tipo denso-dependiente, en donde la ocurrencia de una infección es determinada por el número de individuos que conforman una población y el contacto al azar entre individuos infectados e individuos susceptibles, así como la probabilidad de que esto suceda dentro de un periodo dado (Burek et al., 2008; Härkönen et al., 2006). Por ejemplo, se tiene conocimiento de que durante la epizootia ocurrida en Europa en los años de 1988 y 2002, la cantidad de individuos en las poblaciones de foca de puerto había sobrepasado el número promedio, favoreciendo una alta tasa de mortalidad (Härkönen et al., 2006). También se ha sugerido que la configuración espacial de las poblaciones puede deter-

minar la prevalencia de la enfermedad, considerando que poblaciones más cercanas presentan niveles de prevalencias similares, a diferencia de aquellas que se encuentran geográficamente más alejadas; este patrón pudo observarse igualmente en el norte de Europa, en donde la prevalencia de la infección, era similar en zonas adyacentes (Burek et al., 2008; Härkönen et al., 2006). Por otra parte, se ha definido que otros factores pueden favorecer la presencia de morbilivirus entre especies susceptibles, por ejemplo; el cambio climático puede favorecer la expansión geográfica de especies portadoras de enfermedades como morbilivirus, permitiendo el contacto con especies particularmente susceptibles a este agente infeccioso (Moore, 2011; Burek et al., 2008). Esta situación pudo haberse dado con la foca de Groenlandia, en la cual se observó una alteración de su ruta migratoria, viajando a regiones más hacia el sur del norte de Europa, previo a la epizootia en focas de puerto en el año de 1988 (Ohishi et al., 2012). Otros factores como la estación, edad y el sexo, igualmente determinan de manera importante la presencia del agente infeccioso en diferentes especies susceptibles (M. Morales et al., 1997).

1.2 Generalidades

1.2.1 *Morbillivirus*

De acuerdo con el Comité Internacional de Taxonomía en Virus, el género *Morbillivirus* pertenece a la familia de los *Paramyxoviridae*. Dentro de este género se clasifican las especies virales de: morbilivirus de los cetáceos, peste de los pequeños rumiantes, rinderpest, virus del sarampión, distemper canino y distemper de fócidos (Gámiz et al., 2011; Mamaev et al., 1995). Siendo el morbilivirus de los cetáceos, rinderpest, distemper canino y distemper de fócidos, los más importantes para estudiar, en el tema de morbilivirus en mamíferos marinos.

Los *Paramyxovirus* son un grupo de virus envueltos de RNA de cadena sencilla,

sentido negativo, no segmentados, pleomórficos, con un diámetro que varía de 150 a 300 nm, con aproximadamente 15,894 nucleótidos, son virus envueltos. El genoma viral codifica para ocho proteínas: hemaglutinina (H), proteína de fusión (F), proteína de matriz (M), nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína V y C y la proteína L (Figura 1.2). La fosfoproteína de 507 aminoácidos y de aproximadamente 1524 a

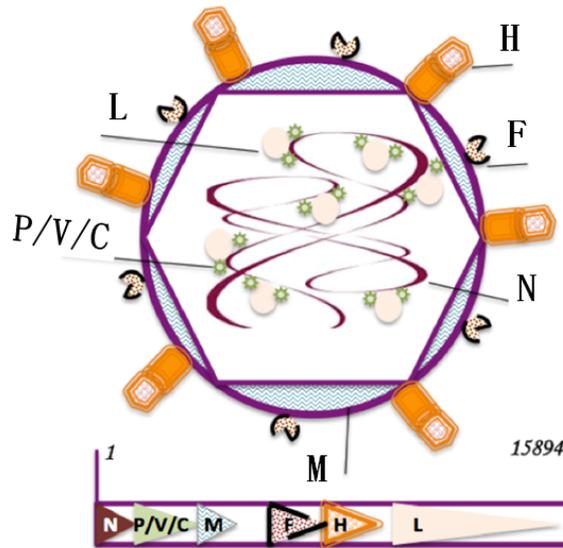


Figura 1.2: **Diagrama esquemático de un morbilivirus conteniendo su genoma y las proteínas que lo conforman.** El esquema inferior muestra las regiones codificantes de la región 5 prima, desde el primer nucleótido hasta el 15,894. De acuerdo al orden en que se muestran, la primera proteína para la que codifica es la nucleoproteína (N), posteriormente se encuentra la fosfoproteína (P), junto con la proteína V y C, le continúa la proteína de matriz (M), la proteína de fusión (F), la hemaglutinina (H) y finalmente la proteína larga (L).

1667 nucleótidos, se encuentra en pequeñas cantidades en el virus empaquetado pero ampliamente en la célula infectada y juega un papel importante en la transcripción y replicación viral (K. N. Bossart & Broder, 2007). Excepto por la región que comprende el dominio N-terminal de los aminoácidos 1 a 230, el gen que codifica para la fosfoproteína, es uno de los más conservados del género *Morbillivirus*, manteniendo la misma secuencia de nucleótidos en todas las especies que pertenecen a este género. Esto permite la identificación de cualquier especie de morbilivirus mediante RT-PCR, con

el uso de oligonucleótidos universales que amplifiquen fragmentos con las regiones más conservadas del gen (Rzeżutka & Mizak, 2003).

De manera general, los morbilivirus ocasionan una enfermedad sistémica severa, con elevada mortalidad entre los individuos susceptibles, observando signos clínicos como: debilidad, exudación nasal y ocular, fiebre, afecciones gastrointestinales, espasmos musculares y convulsiones (Kennedy et al., 2000). Existen diferentes especies que afectan a los mamíferos marinos, como distemper canino (CDV), distemper de fócidos (PDV) y morbilivirus de los cetáceos (CeMV). Mientras que PDV muestra mayor relación filogenética con CDV, CeMV se asemeja más con rinderpest (Bressem, Waerebeek, & Raga, 1999) y se divide en cuatro variantes: a) morbilivirus de los delfines (DMV), b) morbilivirus de las marsopas (PMV), c) morbilivirus de calderones (PWMV) y d) morbilivirus del zifio de Longman (LBWMV) (*Morbillivirus Infection in Dolphins, Porpoises, and Whales*, 2013).

En las epizootias ocurridas en focas Siberia (1987) y en focas de puerto (1988), al analizar los aislados se clasificó al virus de las focas de Europa como distemper de fócidos, mientras que el virus que afectó a las focas en Siberia presentaba mayor similitud con distemper canino, concluyendo que la transmisión de distemper de cánidos hacia pinnípedos había sido posible (Figura 1.3) (Mamaev et al., 1995). Asimismo se ha analizado la relación antigénica entre PDV y aislados de morbilivirus en carnívoros terrestres en donde se mostró que PDV había sido transmitido de focas infectadas hacia carnívoros terrestres, ocasionando una epizootia entre poblaciones de visones en cautiverio (Figura 1.3) (Blixenkron-Möller et al., 1992). En los cetáceos, se ha demostrado que el calderón de aletas largas es un hospedero importante para la transmisión de morbilivirus hacia otros cetáceos odontocetos, ya que se ha identificado una variante viral específica para esta especie (PWMV) y no existen reportes de mortalidades masivas (Figura 1.3) (Taubenberger et al., 2000). Asimismo, se identificó otra variante de CeMV en un espécimen varado, perteneciente al zifio de Longman (*Indopacetus pacificus*) durante el 2010 en las costas de Maui, Hawaii (West et al., 2013).

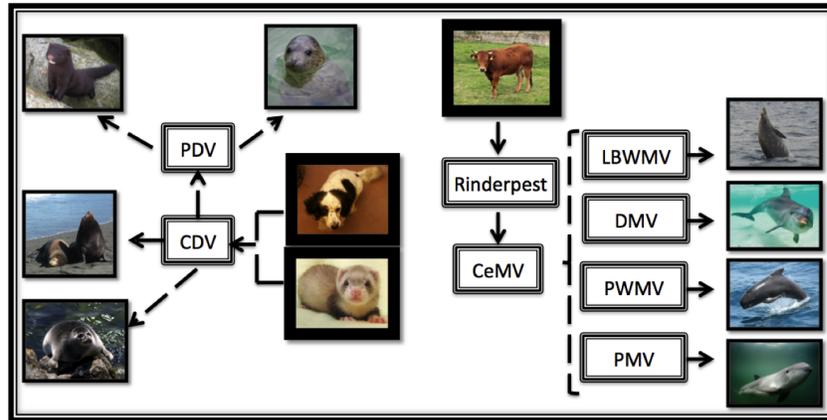


Figura 1.3: **Transmisión de morbilivirus entre diversas especies.** La transmisión de morbilivirus ha permitido la diferenciación hacia nuevas especies y variantes virales. Se considera que la transmisión inicial de CDV hacia fócidos se dio por el contacto cercano de carnívoros terrestres como hurones y perros, con focas de la región, así como la transmisión de morbilivirus hacia cetáceos a partir de rumiantes que se encontraban en granjas cercanas a zonas costeras (Mamaev et al., 1995)

1.2.2 Especies centinela

Las especies centinela son especies que por diferentes características poblacionales y ecológicas aportan información valiosa que permite determinar las condiciones de un hábitat, comunidad o ecosistema al ser clave para el funcionamiento del mismo (Hutcheson et al., 1999). Son utilizadas para proveer alertas tempranas acerca de impactos potencialmente negativos en el ambiente, debido a que son altamente sensibles a cambios en el mismo (Godínez-Reyes et al., 2006). La conservación de especies centinela, permite a la vez la conservación de otras especies. A nivel mundial, se conocen diferentes especies de anfibios, aves, mamíferos e insectos como especies centinela (Zacharias & Roff, 2001).

Los mamíferos marinos representan uno de los mejores ejemplos de especies centinela en ambientes acuáticos y costeros, estas especies presentan un promedio de vida prolongado, se alimentan en un nivel trófico elevado y poseen grandes reservas de energía que pueden servir como depósitos de toxinas antropogénicas. Entre las especies de mamíferos marinos que se consideran indicadores de la salud de un ecosistema se en-

cuentran los siguientes: 1) lobos marinos de California, 2) toninas, 3) nutrias (*Enhydra lutris*), 4) ballena de Groenlandia (*Balaena mysticetus*), 5) oso polar (*Ursus maritimus*) y 6) manatíes (*Trichechus manatus*) (G. D. Bossart, 2006).

Los depredadores tope como los pinnípedos pueden presentar cambios en su comportamiento, salud o variaciones en su abundancia poblacional, al enfrentarse a oscilaciones ambientales y degradación en su hábitat. El lobo marino de California se utiliza como indicador del grado de conservación de las zonas que habita (*Proyecto Para la Conservación, Manejo y Aprovechamiento Sustentable de los Pinnípedos en México*, 2000), ya que debido a características de comportamiento como permanecer en tierra por periodos prolongados, brinda la oportunidad de realizar conteos directos de sus colonias de reproducción en forma continua y en ciclos anuales, estimando sus tamaños poblacionales y obteniendo datos referentes a la producción de crías al mantener un periodo de reproducción bien definido. También se facilita la obtención de muestras biológicas a partir de crías y hembras (Godínez-Reyes et al., 2006).

1.2.3 Diversidad y ecología de mamíferos marinos en México

En México existen aproximadamente 48 especies de mamíferos marinos, las cuales son migratorias, endémicas, de distribución restringida o de aparición ocasional (Ceballos & Arroyo-Cabrales, 2012).

Los pinnípedos forman parte de los mamíferos pertenecientes al orden *Carnivora* y se vinculan con carnívoros terrestres actuales que incursionaron en los mares hace millones de años y desarrollaron adaptaciones para la vida acuática (Berta, 2009). Existen a nivel mundial tres familias de pinnípedos: *Otariidae*, *Odobenidae* y *Phocidae*, distribuidas mundialmente en aguas polares, subpolares y templadas. En México se han registrado cinco especies de otáridos y tres de fócidos: a) el lobo fino de Guadalupe (*Arctocephalus townsendi*), b) el lobo marino de California o lobo marino común (*Zalophus californianus californianus*), c) el lobo fino de las Islas Galápagos (*Arctocephalus gala-*

pagoensis) y lobo marino de las Islas Galápagos (*Zalophus wolfebaeki*), d) el oso marino ártico (*Callorhinus ursinus*), e) la foca común o foca de puerto (*Phoca vitulina*), f) la foca elefante del norte o elefante marino (*Mirounga angustirostris*) y g) la ya extinta foca monje del Caribe (*Monachus tropicalis*) (Ceballos & Arroyo-Cabrales, 2012). Tanto la foca de puerto como la foca elefante del Norte limitan su distribución geográfica en México cerca de los 28°N y el lobo marino de California es el único pinnípedo residente de la región del Golfo de California, aunque se ha reportado la presencia ocasional de ciertos individuos de especies como lobo fino de Guadalupe, elefante marino del norte y foca de puerto (Gallo-Reynoso et al., 2010).

Los pinnípedos realizan en tierra ciertas actividades como el apareamiento, parto, descanso y muda, sin embargo pasan la mayor parte de su vida en el mar de donde obtienen su alimento, el cual se basa desde kril de los mares antárticos, pasando por crustáceos, moluscos y peces, hasta animales de sangre caliente como aves. Las hembras paren una cría anual o bianualmente, dependiendo de la especie (King, 1983).

En general los pinnípedos ocupan una amplia variedad de hábitats y ecosistemas, desde el Ártico hasta el Antártico. Algunos de ellos se encuentran en agua dulce, otros en aguas marinas costeras o en mar abierto y aguas profundas. Los pinnípedos son importantes para el funcionamiento de las comunidades marinas, contribuyen al reciclamiento de nutrientes y están considerados dentro de los grupos animales más importantes para la conservación en territorio insular y costero de México (Berta, 2009; Aurióles-Gamboa & González, 1994; Olesiuk, 1993).

Asimismo, México es uno de los países con mayor riqueza de cetáceos en el mundo (Ceballos & Arroyo-Cabrales, 2012; Torres, Esquivel, & Ceballos, 1995). Las especies registradas en las costas de la Península de Baja California, pertenecen a dos subórdenes, *Mysticeti* (cetáceos con barbas) y *Odontoceti* (cetáceos con dientes), y a seis familias: *Balaenopteridae* (rorcuales como la ballena de aleta, azul, jorobada, de Bryde), *Eschrichtiidae* (ballena gris), *Physeteridae* (cachalote), *Kogiidae* (cachalote enano y

pigmeo), *Ziphiidae* (zífidos) y *Delphinidae* (delfines y calderones). Particularmente, el Golfo de California alberga un 35% del total de especies registradas, en donde el Canal de Ballenas representa un área importante para estas especies (Guerrero-Ruiz et al., 2006; Alvarez-Borrego & Lara-Lara, 1991).

Lobo marino de California (*Zalophus californianus californianus*)

El lobo marino de California, es el pinnípedo de distribución más amplia y mayor abundancia en México. Se distribuye en el Pacífico nororiental a lo largo de toda la costa occidental de la Península de Baja California y en todo el Golfo de California (Mellink & Saavedra, 2005). Sus principales áreas de concentración en la vertiente del Pacífico abarcan desde islas Coronados, islas Cedros, Natividad, Asunción, Santa Margarita, hasta la parte sur de la Península de Baja California (Cabo San Lucas); en el Golfo de California abunda en la Región de las Grandes Islas (Maravilla-Chávez & Gallo-Reynoso, 1999). En México se ha estimado que el tamaño de su población es de aproximadamente 93,000 individuos: 63,000 en la costa del Pacífico y 30,000 en el Golfo de California (Mellink & Saavedra, 2005). De las 19 colonias conocidas de lobos marinos en el Golfo de California, 14 se encuentran en el cinturón de las Grandes Islas y al norte de éste, conteniendo 82% (19,000 individuos) de la población del Golfo. Esta región contiene las dos colonias principales de lobos marinos en el Golfo: Isla San Esteban (en el cinturón de las Grandes Islas) e Isla San Jorge (en el norte del golfo). Se ha sugerido que las mayores concentraciones de lobos marinos en esta región son producto de una mayor productividad primaria y una mayor abundancia de presas en el área (Mellink & Saavedra, 2005).

En el lobo marino se puede observar un dimorfismo sexual marcado; los machos llegan a medir hasta 2.4 m y pesan aproximadamente 300 kg; las hembras alcanzan un peso de 150 kg con una longitud aproximada de 1.8 m. Al nacer, las crías pesan entre 5.5 y 6.5 kg y miden alrededor de 70 cm. El pelaje de los lobos marinos es de color

café oscuro, ligeramente más claro en las hembras y juveniles. A diferencia de otras especies de otáridos, la cresta sagital externa de los machos adultos es prominente y muy desarrollada, al igual que los músculos del cuello. Emiten vocalizaciones cortas y de sonido grave (Berta, 2009).

Durante el periodo de reproducción las hembras llegan a las zonas reproductivas de uno o dos días antes del parto, que ocurren desde mediados de mayo hasta finales de julio, los machos adultos llegan con pocos días de anticipación y de inmediato establecen territorios que defienden de otros machos, las características del territorio van a determinar el éxito reproductivo del mismo, el cual intentará copular con el mayor número de hembras posibles, las cópulas se presentan desde julio hasta mediados de agosto. El periodo de lactancia dura un año, durante ese tiempo las hembras hacen viajes al mar para alimentarse, que duran en promedio dos días y regresan a tierra para amamantar a sus crías (Riedman, 1990; King, 1983). El área reproductiva de esta especie, abarca desde Rocas Consag, B.C. hasta Los Islotes, B.C.S., por su costa oriental, y por su costa occidental hasta el Farallón de San Ignacio, Topolobampo, Sinaloa. En la costa del Pacífico de Baja California, de sur a norte, la zona reproductiva abarca desde isla Santa Margarita hasta la frontera con Estados Unidos de Norteamérica en las Islas Coronados. Después de la temporada reproductiva, los lobos marinos machos de las colonias del Pacífico migran hacia el norte, a lo largo de la costa de California y, probablemente, hasta Oregón, Washington y la Columbia Británica (Berta, 2009).

Tanto hembras como machos, alcanzan la madurez sexual entre los 4 y 5 años de edad, mientras que la madurez física se presenta entre los 8 y 9 años. La longevidad es de 20-22 años en las hembras y de 17 años en los machos. La tasa de fecundidad para el Golfo de California se estima en 55.8%. Se ha estimado la estructura poblacional del lobo marino en el Golfo de California compuesta por un 6.9% de machos adultos, 5% de machos subadultos, 40.7% de hembras adultas, 23.9% de animales jóvenes, 22.7% de crías y 0.8% de animales no clasificados. Para las loberas del Pacífico mexicano se estimó un 8.03% de machos adultos, 5.97% de machos subadultos, 37.12% de hembras adultas,

12.25% de animales jóvenes y 36.63% de crías (C. Hernández & Auriolles-Gamboa, 1997; Auriolles-Gamboa & González, 1994; B. Morales, 1990; Peterson & Bartholomew, 1967).

Con respecto a la alimentación del lobo marino de California en México, diversos estudios indican que en el Pacífico las presas consumidas son diferentes dependiendo de la zona y la época del año; en Islas Coronados se distinguen presas como la anchoveta del norte (*Engraulis mordax*) y en Isla Cedros la especie que sobresale es la langostilla (*Pleuroncodes planipes*). Por otra parte, en el Golfo de California, las principales presas de Los Islotes, B.C.S. son especies integrantes de la ictiofauna de la bahía de La Paz. En islas ubicadas más hacia el norte, la alimentación se basa en mictófidios, como es en el caso de San Pedro Mártir, San Esteban y El Rasito; en Los Machos por la sardina Monterrey (*Sardinops sagax*), la macarela (*Scomber japonicus*), el pez sable (*Trichiurus lepturus*) y la anchoveta; en Los Cantiles por el pez sapo (*Porichthys* sp.) y el pez sable (*Trichiurus nitens*); El Coloradito por el pez sable y en Granito la anchoveta (García-Rodríguez & Auriolles-Gamboa, 1997; García-Rodríguez, 1995).

En relación a la genética del lobo marino de California, algunos estudios sugieren la existencia de cinco grupos filogenéticamente divergentes, dos en el Óceano Pacífico y tres en el Golfo de California, indicando ausencia de migración entre lobos marinos del Golfo de California e individuos del Pacífico. La importancia de encontrar un aislamiento entre estas poblaciones significa que la población del Golfo de California es exclusiva de México, situación que es importante considerar para las políticas de conservación (Schramm et al., 2009; Maldonado et al., 1995).

1.2.4 Amenazas para los mamíferos marinos

A nivel mundial, una gran cantidad de especies de mamíferos marinos se encuentran amenazadas por diferentes factores como el incremento en el número de depredadores, cambios en el hábitat, exposición a nuevos patógenos, entre otros factores, aunque la amenaza principal hacia estas especies está dada por actividades humanas (Guerrero-

Ruiz et al., 2006) .

Entre los depredadores naturales que afectan a las poblaciones de pinnípedos en México, destacan las orcas (*Orcinus orca*) y algunas especies de tiburones, como el tiburón blanco (*Carcharodon carcharias*), el tiburón chato (*Isistius brasiliensis*) y el tiburón lobero (*Carcharinus leucas*). Estos depredadores atacan generalmente a animales jóvenes y adultos; la frecuencia de ataque a animales lactantes es baja ya que éstos casi siempre permanecen en tierra hasta el destete y bajo los cuidados maternos. Debido a sus hábitos y distribución no tienen depredadores naturales terrestres; la depredación terrestre se presenta en zonas perturbadas donde hay fauna introducida como coyotes, perros o gatos ferales . En el Golfo de California, se ha identificado a la gaviota de patas amarillas (*Larus livens*) como depredador de lobos marinos neonatos, a quienes les picotean los ojos y el cordón umbilical. Estos ataques en muchas ocasiones solo provocan lesiones en las crías, pero en algunos casos les conducen a la muerte de manera directa o indirecta al facilitar infecciones secundarias (Aurioles & Llinas, 1987; Sánchez, 1987).

La introducción de especies exóticas a los territorios donde habitan los pinnípedos puede ocasionar problemas en las poblaciones de estos últimos. El número de estas especies invasoras en las islas ha aumentado en los últimos años y se les ha observado cada vez más cerca de zonas costeras. Por ejemplo, la presencia de coyotes y perros ferales en estas zonas, puede causar la mortalidad principalmente de crías de pinnípedos, por depredación y por exposición a patógenos nuevos como morbilivirus (García-Aguilar & Gallo-Reynoso, 2012; Gallo-Reynoso & García-Aguilar, 2008).

Algunos eventos como contingencias ambientales o la introducción de algún agente patógeno exótico mediante vectores como aves silvestres, mamíferos introducidos o humanos, pueden desencadenar brotes de enfermedades en las poblaciones de mamíferos marinos. La mayoría de los estudios sobre las enfermedades que afectan a las poblaciones de mamíferos marinos han sido evaluadas mediante el análisis ocasional de cadáveres

varados y el estudio de animales en clínicas de rehabilitación o en parques acuáticos, dejando vacías algunas áreas en el entendimiento de enfermedades en poblaciones silvestres (Guerrero-Ruiz et al., 2006).

Coyote (*Canis latrans*)

El coyote es una especie que se localiza en una gran variedad de ambientes, siendo una de las especies más adaptables de Norteamérica (Atkinson & Shackleton, 1991; Bekoff, 1977). La distribución geográfica de los coyotes abarca el intervalo latitudinal de los 70° N en el noroeste de Alaska, a largo de Canadá y Estados Unidos, a los 10° N en Costa Rica (Bekoff, 1977). En México, esta especie se encuentra en todo el país, con excepción de la Península de Yucatán. En el noroeste de México, los coyotes conforman el grupo de carnívoros más abundante. En la Península de Baja California se encuentra la subespecie (*Canis latrans peninsulae*) y particularmente en algunas partes como en la región del Vizcaíno son considerados plaga, por lo cual han sido sometidos a control en varias ocasiones (Alvarez-Castañeda, 1999). Los coyotes originalmente se distribuían en pastizales, sin embargo en la actualidad han llegado a ocupar un amplio espectro de hábitats los cuales incluyen zonas desérticas, bosques abiertos, zonas agrícolas e incluso áreas urbanas (Bekoff, 1977; Leopold, 1959). Los coyotes permanecen activos tanto en el día como en la noche, pero los picos de actividad ocurren al atardecer y el amanecer (Ortega, 1988; Andelt, 1985; Bekoff & Wells, 1981; Leopold, 1959). Son animales de hábitos crepusculares y altamente sociales que pueden cazar de forma solitaria o en pequeños grupos familiares, donde las liebres tienden a ser un recurso muy importante en su dieta. Los modos de organización social incluyen desde individuos solitarios nómadas hasta grupos estables con un tamaño promedio de 1.4 individuos en verano y hasta 3 en invierno, dependiendo directamente del tamaño de las presas disponibles (Vaughan et al., 2000). Los coyotes son depredadores oportunistas y carroñeros. Presentan una dieta muy diversa, la cual varía tanto estacional como

geográficamente, de acuerdo con la disponibilidad de alimento. Entre la dieta de los coyotes se incluyen lagomorfos, ratones, ardillas, aves, reptiles, peces, insectos, materia vegetal como moras silvestres y semillas, igualmente se ha observado a los individuos que habitan en islas y zonas costeras alimentarse de mamíferos marinos varados (Servín & Huxley, 1995; L. Hernández et al., 1994; Cypher et al., 1994; Arnaud, 1993; Hamlin & Schweitzer, 1979; Leopold, 1959). Se han identificado anticuerpos contra CDV en suero de coyotes en diferentes regiones de Estados Unidos, como Texas y Colorado (Gese et al., 1991; Guo et al., 1986). En México, no existen estudios que reporten la presencia de morbilivirus en coyotes, sin embargo, la distribución de esta especie en zonas costeras mantiene el riesgo de transmisión de este agente infeccioso hacia los mamíferos marinos.

Perros domésticos y ferales (*Canis lupus familiaris*)

Los perros ferales son depredadores oportunistas que obtienen su alimento cazando a la fauna nativa o a través de carroña, aunque en general presentan una alimentación muy variada (Mitchell & Banks, 2005). La presencia de perros ferales en islas de la Península de Baja California ha sido documentada desde hace más de 15 años (Mellink, 1993). Estos animales son los cánidos salvajes con la mayor distribución geográfica en el mundo (Green & Gipson, 1994). Su comportamiento alimenticio es activo, buscando a sus presas ya sea de manera individual o en parejas, en zonas donde no coexisten otras especies de mamíferos carnívoros pueden ser los depredadores eficientes de la fauna nativa, especialmente de organismos con un peso menor a 50 kg (Butler et al., 2004; Kruuk & Snell, 1981). Los perros potencialmente pueden cazar crías de pinnípedos (el peso promedio de los neonatos de lobo marino es de 6 kg) (García-Aguilar & Auriolles-Gamboa, 2003) ya que éstos últimos son una presa indefensa por su poca movilidad en tierra y adecuada para un cánido de talla mediana, como los perros ferales, cuyo tamaño es similar o un poco mayor al de los coyotes (Green & Gipson, 1994). Estos eventos de depredación han sido reportados en la Isla Cedros, Baja California (Gallo-

Reynoso & García-Aguilar, 2008) además de que su presencia ha sido referida por pescadores locales. Los resultados del análisis de la dieta de los perros ferales en Isla Cedros mostraron que los lobos marinos constituyen su segunda presa más importante durante la época de verano (23.3%), mientras que durante el invierno este porcentaje disminuye considerablemente (5.8%) . El elefante marino fue la especie más consumida por los perros ferales en ambas temporadas (43.3% verano y 51.9% invierno) (García-Aguilar & Gallo-Reynoso, 2012). El mayor porcentaje de presencia del lobo marino en la alimentación de los perros corresponde con la temporalidad de los nacimientos. Sin embargo, también se encontraron restos de lobo marino en las excretas de los perros fuera de la temporada de reproducción de estos pinnípedos, cuando los animales que se encuentran en las playas descansando (juveniles y adultos) son lo suficientemente grandes para evitar el ataque de los perros. Lo anterior sugiere que los perros también podrían adquirir alimento de cadáveres de pinnípedos disponibles en las playas durante todo el año (García-Aguilar & Gallo-Reynoso, 2012). Como evidencia adicional, los lugareños han referido que los perros ferales se adentran en las playas de descanso y de reproducción de los pinnípedos con la finalidad de conseguir alimento, ya sea en busca de los cadáveres de estos mamíferos marinos o cazándolos activamente.

La interacción entre los perros ferales y los lobos marinos tiene importantes implicaciones de conservación, específicamente por el impacto que el consumo de los perros puede tener sobre las poblaciones de los pinnípedos, donde estos son un componente muy importante de su dieta. Adicionalmente, existe el posible riesgo de que los perros ferales les contagien sus patógenos a los pinnípedos, ya que los cánidos son hospederos de diversas enfermedades, lo cual podría incursionar con serias consecuencias epizoóticas (García-Aguilar & Gallo-Reynoso, 2012).

1.2.5 Golfo de California

El Golfo de California o Mar de Cortés, es un mar semicerrado limitado al oeste por la Península de Baja California y al este por los estados de Sonora, Sinaloa, Nayarit y Jalisco, se ubica entre los 21° 00' a 32° 00' N y 106° 00' a 115° 00' O. Presenta una orientación general Noroeste y Suroeste y se une al Océano Pacífico en su porción sur. Tiene una longitud y anchura cercanas a los 1,400 y 209 km, respectivamente, una superficie de 258,593 km² y alberga en su interior a más de 900 islas e islotes (Lluch-Cota, 2007). Del límite de la línea imaginaria que une Cabo San Lucas (sur de la península) con Cabo Corrientes en Jalisco, está la zona de transición con el Pacífico, denominada Boca del Golfo de California y tiene un área aproximada de 40,000 km². Se considera que el clima que impera dentro del Golfo de California se caracteriza por ser más continental que oceánico; carece de nubes la mayor parte del año y los vientos son extremadamente variables. Las mareas, vientos, el calentamiento solar y demás interacciones de esta zona con el Océano Pacífico provocan que exista una circulación vigorosa. Las temperaturas del Golfo son más calientes de abril a septiembre e iguales durante el resto del año a diferencia de lo que se observa para el Pacífico (Guerrero-Ruiz et al., 2006). En general las ricas aguas pelágicas del Golfo albergan una gran cantidad de peces, tortugas, aves y mamíferos marinos (Nix, 2010; Guerrero-Ruiz et al., 2006).

Islas del Golfo de California

Las Islas del Golfo de California representan ecosistemas con un notable aislamiento geográfico, rarezas biológicas e importantes endemismos. Son sitios estratégicos para la reproducción de tortugas marinas, aves marinas y mamíferos marinos pues ofrecen un acceso relativamente fácil y seguro a las áreas marinas donde encuentran alimento y brindan seguridad para el establecimiento de nidos y crianza de pollos, así como un sustrato sólido para la reproducción de lobos marinos (Godínez-Reyes et al., 2006).

1.2.6 Islas del Pacífico de la Península de Baja California

Las islas situadas en el Océano Pacífico de la península son reconocidas por su alta diversidad, abundancia y endemismos de flora y fauna, y por la relativa integridad natural de sus ecosistemas. La vegetación principal es matorral costero suculento y de cactáceas. También albergan una gran cantidad de colonias de mamíferos marinos y aves marinas. Sin embargo, el conjunto de islas de esta región no han sido consideradas como áreas naturales protegidas, observando un incremento de la actividad humana y generado impactos que afectan la integridad de las islas, como la introducción de especies exóticas (gatos, ratas y perros) que significan un riesgo para las especies nativas de la región. La Isla Cedros es una de las más grandes e importantes islas de esta zona y en la que se han observado mayores cambios generados por factores antropogénicos (Gallo-Reynoso & García-Aguilar, 2008; *Estudio previo justificativo para el establecimiento de la Reserva de la Biósfera del Pacífico de California*, 2005).

1.3 Justificación

Se reconoce que las enfermedades infecciosas pueden regular el tamaño poblacional de las especies al reducir su éxito reproductivo e incrementar las tasas de mortalidad (Delahay et al., 2009). Para mamíferos marinos, específicamente en pinnípedos se ha reportado que algunos patógenos (i. e. morbilivirus) han causado diversas epizootias, las cuales a su vez han ocasionado cambios significativos en el tamaño y la estructura de las poblaciones (Cosby et al., 1988; Osterhaus et al., 1988).

Los pinnípedos, como el lobo marino de California (*Zalophus californianus californianus*), son especies altamente vulnerables al contagio de enfermedades infecciosas, esto se explica en función de sus hábitos gregarios y al ser organismos que se reúnen en playas continentales o en islas para reproducirse y descansar (Boeuf, 1978; Bartholomew, 1970). Además, sus adaptaciones morfológicas y funcionales para ex-

plotar el ambiente marino, los hace poco eficientes para desplazarse en tierra y por lo tanto más susceptibles al ataque por carnívoros depredadores terrestres como perros y coyotes. A su vez, estos carnívoros son hospederos de enfermedades como el virus de distemper canino, el cual representa una afección a la salud de los animales con implicaciones letales. Esta enfermedad ha provocado varios eventos de mortalidad masiva en distintas especies de mamíferos y en el caso de los pinnípedos, se ha especulado que los perros domésticos podrían ser una de las causas de la infección. La Península de Baja California no ha escapado a esta problemática, pues a pesar de que no se ha presentado ningún brote epizoótico, se ha reportado la presencia de morbilivirus entre ciertas especies de mamíferos marinos en la zona del Golfo de California, así como se reporta que ha existido el contacto con carnívoros terrestres en la región de la costa oeste de la Península de Baja California (García-Aguilar & Gallo-Reynoso, 2012; Sánchez-Pacheco, Tershy, & Aguilar, 2000; Auriolos-Gamboa et al., 2000). Por ejemplo, en la Isla Cedros se ha reportado la presencia de perros ferales, en donde personas residentes han mostrado interés para llevar a cabo programas de control de esta especie (Gallo-Reynoso & García-Aguilar, 2008). Una regulación en la presencia de perros ferales podría prevenir potencialmente una futura epizootia por distemper canino en mamíferos marinos de la región. Por otra parte, en el Pacífico Este, los lobos marinos realizan movimientos migratorios a lo largo de la costa, por lo que el contagio de enfermedades a una sola colonia susceptible podría tener graves consecuencias para el resto de las poblaciones (Stern, 2002; Brillinger & Stewart, 1998). El lobo marino de California representa la especie de pinnípedo con mayor distribución en México. Al considerarse especie centinela, su abundancia y características poblacionales facilitan el desarrollo de estudios a largo plazo acerca de la incidencia de enfermedades infecciosas, permitiendo el seguimiento sobre el estado de salud de las poblaciones, importante para inhibir o mitigar cualquier brote epizoótico que llegara a presentarse (Szteren & Auriolos, 2006). Otras especies de mamíferos marinos (por ejemplo diferentes especies de cetáceos) también pueden servir como centinelas. El varamiento de ciertos individuos permite la recolección de muestras

para obtener información acerca de agentes infecciosos que puedan introducirse desde otras regiones, al ser en su mayoría, especies migratorias. Diversos factores, hacen de la Península de Baja California un lugar ideal para el estudio de morbilivirus en ambientes costeros, entre ellos: 1) la presencia de una gran cantidad de especies susceptibles al contagio de morbilivirus, 2) la oportunidad de captura de lobos marinos, 3) el varamiento de una gran cantidad de mamíferos marinos, 4) la presencia de carnívoros terrestres, y 5) el fácil acceso a ciertas islas y otras zonas costeras.

1.4 Hipótesis

1. Debido a las interacciones interespecíficas de mamíferos terrestres y marinos y a la capacidad de los morbilivirus para producir infecciones interespecíficas, esperamos encontrar que la cepa circundante en las costas de la Península de Baja California esté relacionada filogenéticamente en ambos grupos biológicos (carnívoros terrestres y mamíferos marinos).
2. La presencia del virus estará influenciada por factores geográficos, ambientales, variaciones temporales, atributos poblacionales e individuales, así como por el tipo de muestra obtenida.
3. Si existe evidencia de la presencia del virus, se espera que poblaciones cercanas con mayor tasa de contacto tengan seroprevalencias similares.

1.5 Objetivos

1.5.1 General

Identificar molecular y serológicamente la presencia de morbilivirus en carnívoros terrestres y mamíferos marinos de tres regiones de la Península de Baja California (Reserva

del Vizcaíno e islas adyacentes, Islas del Golfo de California e Isla Magdalena en el Pacífico) durante el periodo del 2012-2013.

1.5.2 Específicos

1. Establecer sitios de muestreo conforme se han reportado mayor número de varamientos de mamíferos marinos y sitios de reproducción de lobos marinos en la Península de Baja California.
2. Estandarizar la técnica molecular para la detección de morbiliviruses.
3. Comprobar por medio de secuenciación de los amplicones obtenidos, la presencia de morbilivirus
4. Realizar análisis filogenéticos, para determinar la similitud de las secuencias.
5. Realizar análisis serológico en muestras de crías de lobo marino y carnívoros terrestres y comparar seroprevalencia entre localidades.
6. Analizar variables geográficas, ambientales, temporales, poblacionales, individuales, así como del tipo de muestra, que influyen sobre la presencia o ausencia de morbilivirus.
7. Determinar la prevalencia y distribución de morbilivirus en las regiones establecidas (Reserva del Vizcaíno e islas adyacentes, Islas del Golfo de California e Isla Magdalena en el Pacífico).

2. Materiales y Métodos

2.1 Selección de áreas de estudio

2.1.1 Establecimiento de fechas y sitios

Se establecieron las fechas para la toma de muestras en el periodo de migración de la ballena gris (noviembre-abril) y en la época de reproducción del lobo marino de California (mayo-agosto) durante los años 2012 y 2013, en islas y otras zonas costeras tanto en la región del Golfo de California como en la vertiente del Pacífico en la Península de Baja California. Se eligieron varias localidades con la finalidad de integrar muestras biológicas representativas de diversas especies de mamíferos marinos de toda la región para el diagnóstico de morbilivirus. Se tomaron en cuenta aquellas zonas en donde se ha reportado la mayor cantidad de varamientos de mamíferos marinos.

2.2 Áreas de estudio

Las colonias de reproducción en donde se llevó a cabo el trabajo de campo en el Golfo de California fueron: El Rasito y Partida en el Archipiélago de San Lorenzo, Los Machos, Los Cantiles y Granito en el Archipiélago Ángel de la Guarda, El Coloradito en el Archipiélago de San Luis Gonzaga y Rocas Consag (Figura 2.1). En la vertiente del Pacífico se obtuvieron muestras en la bahía de la Reserva de la Biosfera del Vizcaíno,

en la Laguna Ojo de Liebre y de las siguientes islas: 1) Isla Asunción, 2) Isla Cedros, 3) Isla Magdalena, e 4) Isla Natividad (Figura 2.1).

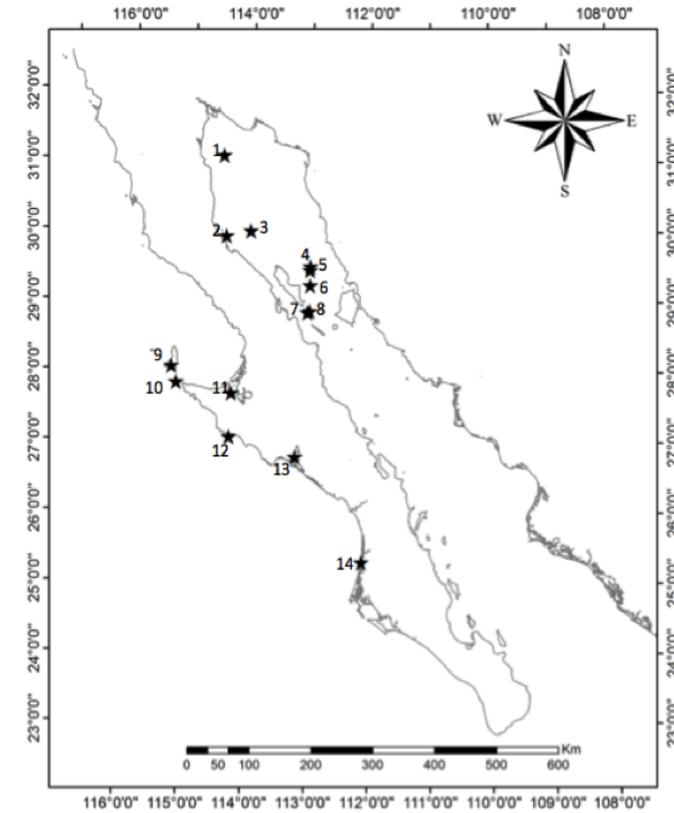


Figura 2.1: **Mapa de áreas de estudio.** Localidades de la Península de Baja California donde se obtuvieron muestras biológicas: 1) Rocas Consag, 2) San Luis Gonzaga, 3) Coloradito, 4) Granito, 5) Cantiles, 6) Machos, 7) Partida, 8) Rasito, 9) Cedros, 10) Natividad, 11) Laguna Ojo de Liebre, 12) Asunción, 13) Laguna San Ignacio y 14) Isla Magdalena.

2.3 Trabajo de campo

2.3.1 Captura de lobos marinos

Para la captura de lobos marinos, se ubicaron zonas con grupos de crías y accesibles para el desembarque. Una vez en tierra, se montó el campamento de manejo y se

capturó a las crías con redes especiales (Godínez-Reyes et al., 2006). En cada colonia de reproducción se capturaron 10 crías. De cada una se tomó el peso, la longitud total, circunferencia de la cabeza, tórax y abdomen y la muestra biológica correspondiente.

2.3.2 Muestreo

Se contactó al personal de CONANP-APFF, Islas del Golfo de California, CONANP-Reserva de la Biósfera del Vizcaíno, exportadora de sal en Guerrero Negro, y personal de la región de Isla Magdalena en Baja California Sur; todos ellos capacitados para llevar a cabo el monitoreo y obtención de las muestras biológicas necesarias.

Se realizaron recorridos sobre tierra en costas para localizar especímenes varados, así como realizar recorridos vía marítima para la obtención de muestras a partir de individuos vivos en las islas (crías de lobo marino) y para la obtención de muestras de exhalación de ballena gris. Asimismo, se consideró importante la toma de muestras de cánidos (coyotes y perros domésticos) que habitan en la región, tomando en cuenta que son considerados un factor importante en la transmisión de distemper hacia los pinnípedos. Las muestras biológicas que se colectaron fueron sangre completa, tejidos, hisopos conjuntivales y oculares para estudio de PCR y suero sanguíneo para la serología. En las crías de lobos marinos, la sangre se extrajo puncionando la vena glutea caudal inferior y en los caninos a partir de la vena yugular externa, conservando la sangre en tubos vacutainer sin anticoagulante y en tubos con heparina y EDTA.

Año 2012

Durante el mes de abril y posteriormente en julio, se llevó a cabo la colecta de tejidos (bazo, hígado, pulmón y cerebro) de cadáveres de mamíferos marinos varados en las costas de la localidad de Isla Magdalena en B.C.S. Igualmente fue posible obtener muestras sanguíneas de perros domésticos y una cría de coyote. Se realizó la captura

de crías de lobos marinos en la región de las Islas del Golfo de California en los meses de julio y agosto, para la obtención de muestras sanguíneas e hisopados nasales y conjuntivales para el diagnóstico molecular mediante RT-PCR, así como suero sanguíneo para el diagnóstico serológico.

Año 2013

Se ubicaron individuos varados (principalmente ballena gris) sobre la localidad de Guerrero Negro, en las orillas e islas que rodean la Laguna Ojo de Liebre, que pertenece a la Reserva de la Biósfera del Vizcaíno, durante los meses de febrero y marzo, de los cuales fue posible obtener muestras de tejidos e hisopados del espiráculo de ballenas principalmente. Asimismo se pudo obtener muestras de la exhalación de ballenas grises vivas que se encontraban dentro de la laguna. Se logró la obtención de muestras sanguíneas de perros domésticos en la misma región. En ese mismo periodo se logró realizar la necropsia de un ballenato sobre la localidad de Cabo San Lázaro en Isla Magdalena. Posteriormente en el periodo de julio-agosto fue posible trabajar en Isla Cedros e Isla Natividad, así como en las Islas del Golfo de California, llevando a cabo la captura de crías de lobo marino para la obtención de las muestras biológicas.

2.4 Clasificación de las muestras

De los individuos muestreados que se encontraban varados, se llevó a cabo la clasificación de acuerdo al grado de descomposición que presentaba el animal (Pugliares et al., 2007), considerando lo siguiente:

- Grado 1 – individuo vivo
- Grado 2 – tejido fresco
- Grado 3 – descomposición moderada

- Grado 4 – descomposición avanzada
- Grado 5 – restos momificados

2.5 Conservación de las muestras

Para la conservación de las muestras se recolectaron fracciones de tejido no mayores de 2 cm y se sumergieron en un tubo tipo eppendorf con RNAlater, buffer que retrasa la degradación del RNA y después junto con los hisopos, las muestras sanguíneas y serológicas se mantuvieron en hielo hasta la llegada al laboratorio donde se conservaron a -80°C , hasta su procesamiento.

2.6 Análisis de laboratorio

2.6.1 Estandarización de la técnica y diagnóstico molecular

Extracción RNA

1. Sangre; las muestras se mantuvieron a -20°C en tubos con heparina o EDTA. Se realizaron lavados previos con agua destilada estéril fría, para romper los eritrocitos y obtener únicamente el paquete de leucocitos; el procedimiento se repitió 3 veces para eliminar la mayor cantidad de eritrocitos posible. La extracción a partir de sangre se llevó a cabo utilizando trizol-reagent (Invitrogen). Se agregaron $700\ \mu\text{L}$ de trizol por cada $300\ \mu\text{L}$ de muestra y se incubaron 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se adicionaron $200\ \mu\text{L}$ de cloroformo, se agitaron 15 seg en vórtex y se dejaron 3 min a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm, 15 min a 4°C , se recuperaron $500\ \mu\text{L}$ de sobrenadante en $500\ \mu\text{L}$ de isopropanol/etanol frío para precipitar y se mantuvieron a -80°C toda la

noche. Una vez precipitado, se mezclaron suavemente y se centrifugaron a 12,000 rpm 10 min a 4°C, se descartó el líquido y se lavó, agregando 1ml de etanol al 75%, se volvió a centrifugar 10 min a 12,000 rpm, se descartó el etanol y se dejó secar a temperatura ambiente durante 15-30 min. Finalmente se reconstituyeron con 20-30 μL de agua DEPC, se homogenizaron y se conservaron a -80°C hasta su procesamiento para la reacción de RT-PCR (Gámiz et al., 2011).

2. Tejido e hisopos; el tejido fue macerado en mortero primeramente y se lavó con PBS con antibiótico. En los hisopos se llevó a cabo la extracción a partir del buffer RNAlater en el que se encontraban contenidos. La extracción de RNA a partir de estas muestras se llevó a cabo mediante el método de extracción por columna con la utilización de QIAamp Viral RNA Mini Kit, siguiendo la siguiente metodología: Se agregaron 0.56 ml de buffer AVL y 5.6 μL de buffer acarreador por muestra, obteniendo un total de 565.6 μL , posteriormente se adicionaron 565 μL de etanol al 100%, se colocó en el vórtex durante 15 seg, se colocaron 700 μL de cada mezcla a la columna y se centrifugó a 8000 rpm durante 2 min, este procedimiento se repitió cambiando de tubo colector, posteriormente se añadieron 500 μL de buffer AW1 a la columna con tubo colector nuevo y se centrifugó a 8000 rpm durante 2 min. Después de añadieron 500 μL de buffer AW2 cambiando nuevamente el tubo colector y se centrifugó a 8000 rpm durante 2 min. Finalmente se eluyó en un tubo tipo eppendorf de 1.5 ml con agua DEPC o con buffer AVE que viene integrado en el kit, agregando 15 μL del mismo, centrifugando a 8000 rpm por 2 min y repitiendo este procedimiento.

RT-PCR

La técnica para el diagnóstico de morbilivirus se estandarizó utilizando la cepa de la vacuna Bayovac protect 3 atenuada, a partir de un protocolo ya establecido para diagnóstico de distemper canino mediante la técnica de RT-PCR, que consiste en la

Reactivos	Volúmenes
	1X
5X Buffer	5 μ l
DNTP's	1 μ l
Primer Forward 0.6 μ M	0.6 μ l
Primer Reverse 0.6 μ M	0.6 μ l
Enzima Qiagen	1 μ l
H2O	11.8 μ l
RNA	5 μ l

Cuadro 2.1: **Mezcla de reacción para PCR.** Se muestran las cantidades utilizadas en cada mezcla por reactivo para obtener un volumen final de 25 μ L por muestra. El ajuste de volúmenes se llevó a cabo de acuerdo al protocolo de Qiagen OneStep RT-PCR Kit Handbook 2002 (los primers se refieren a los oligonucleótidos) (Qiagen, 2002).

	Temperatura	Tiempo
Paso 1. Transcripción reversa	50°C	30 min.
Paso 2. Inactivación de la enzima RT	95°C	15 min.
Paso 3. Desnaturalización	94°C	01 min.
Paso 4. Alineamiento	50°C	01 min.
Paso 5. Extensión	72°C	01 min.
Repetición de los pasos 3, 4 y 5. 35 ciclos		
Paso 6. Extensión final	72°C	10 min.
Paso 7. Término de la PCR a 4°C		

Cuadro 2.2: **Protocolo de la técnica de RT-PCR**, para la amplificación de un fragmento del gen de la fosfoproteína de 429 pb a partir de los oligonucleótidos reportados por *Farooq et al* (2008), estandarizando la temperatura de alineamiento a 50°C .

transcripción reversa del material genético viral para la obtención de cDNA y posteriormente se lleva a cabo la amplificación del fragmento . Se realizó la mezcla de reacción utilizando el kit de Qiagen one- step (Cuadros,2.1 2.2) y se utilizaron un set de oligonucleótidos universales para amplificar un fragmento conservado del gen de la fosfoproteína de 429 pb. (Forward 5' -ATG TTT ATG ATC ACA GCG GT -3', Reverse 5' -ATT GGG TTG CAC CAC TTG TC -3', (Farooq et al., 2008; Jensen et al., 2002) (Figura 2.2). Una vez estandarizada la técnica, se procedió al análisis de las muestras biológicas obtenidas.

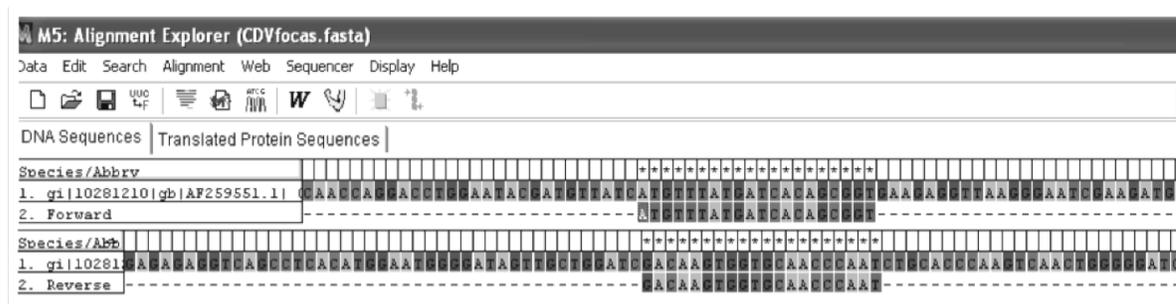


Figura 2.2: **Sitio de unión de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del fragmento deseado.** Se alinearon los oligonucleótidos a un fragmento del gen de la fosfoproteína del virus de distemper canino, utilizando el programa MEGA 5. El oligonucleótido sentido (Forward) se une a la secuencia del gen P a partir del nucleótido 373 y el antisentido (Reverse) a partir del nucleótido 802, obteniendo un fragmento de 429 pb.

2.6.2 Secuenciación de los productos de PCR y análisis filogenético

Una vez procesadas las muestras mediante RT-PCR, se procedió a la purificación de las muestras positivas mediante geles E-Gel® SizeSelect™ Agarose Gels, 2% . Life Technologies, para poder ser enviadas a secuenciar con la técnica de Sanger en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Las secuencias se analizaron utilizando Geneious Pro (5.6.4). Los alineamientos se construyeron usando CLUSTAL W, ejecutados en

Geneious para calcular el porcentaje de identidad. También se utilizó el programa MultAlin (Multiple sequence alignment) para llevar a cabo el alineamiento. Las secuencias se alinearon entre ellas, y entre secuencias obtenidas del GenBank. Posteriormente se realizó un árbol filogenético utilizando el programa MEGA 5, mediante el método de unión de vecinos (Taubenberger et al., 2000). Las distancias genéticas se llevaron a cabo utilizando el algoritmo de Kimura en dos parámetros, con un bootstrap de 10,000 repeticiones. Se utilizó la cepa de sarampión, rinderpest y peste de de los pequeños rumiantes como grupo externo en el árbol filogenético (Gámiz et al., 2011).

2.6.3 Virus y células

Propagación del virus

Se llevó a cabo la infección con morbilivirus en las líneas celulares MDCK (células de riñón canino Madin-Darby) y VERO (células epiteliales de riñón de mono verde), realizando el mismo procedimiento para ambas. Las células fueron proporcionadas por el laboratorio de virología de la FMVZ-UNAM. Después de haberlas mantenido a -80°C , se descongeló un vial de 1.5 ml que contenía las células. Se depositaron en una botella de 25 cm para cultivo celular, agregando 5 ml de DMEM a pH 7.2 al 8% de suero fetal bovino. Una vez confluentes, se realizó pase celular a botellas de 75 cm para llevar a cabo la propagación de CDV (cepa Lederle). La infección se llevó a cabo una vez obtenidas 6 botellas de 75 cm (para cada línea celular), se descartó el medio y se lavaron las células con PBS, posteriormente se agregaron 4 ml de virus a cada botella, se colocaron en la incubadora a 36°C durante media hora, se adicionaron 10 ml de medio y se dejaron incubando hasta observar efecto citopático. Las células VERO también fueron infectadas bajo las mismas condiciones con PDV donado por el I.P.N .

Titulación viral

Se realizó la titulación de CDV y PDV por dosis infectiva en cultivo celular (DICC50%), llevando a cabo el mismo procedimiento con ambas líneas celulares (MDCK y VERO), como se describe en la Figura 2.3.

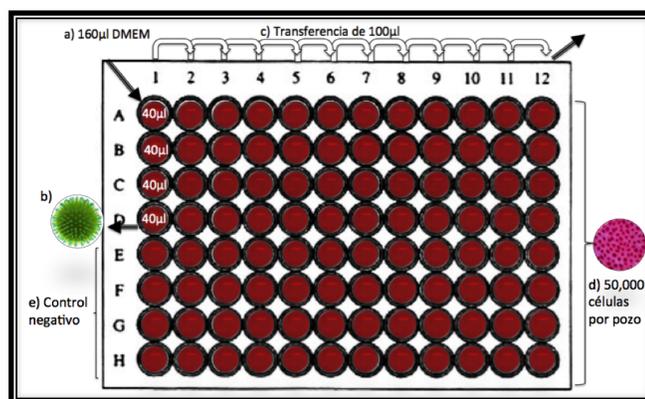


Figura 2.3: **Titulación de CDV y PDV.** En placas de 96 pozos se llevaron a cabo diluciones dobles seriadas comenzando 1:5 por cuadruplicado, se utilizó la mitad de la placa como control negativo. Las unidades de infectividad viral se calcularon mediante la técnica de Reed y Muench. Finalmente la placa se incubó a 36°C, hasta observar efecto citopático (Duignan et al., 1994).

2.6.4 Análisis serológico

Neutralización de la infectividad viral

Los sueros se inactivaron a 56°C durante media hora y se filtraron en membranas de 22 micras para evitar contaminación bacteriana.

Utilizando placas de 96 pozos para cultivo celular se llevó a cabo la neutralización con 137 sueros totales (lobos marinos, perros y 1 coyote). Después de llevar a cabo un ajuste a 300 UI, se realizaron diluciones dobles seriadas de los sueros comenzando 1:5, posteriormente se agregó el virus y las placas se incubaron 36°C durante media hora para permitir la reacción antígeno- anticuerpo. Finalmente se adicionaron aproximadamente

50,000 células por pozo (Figura 2.4). El medio utilizado se trató con antibiótico para mitigar la contaminación por bacterias que hayan quedado en las muestras de suero. Las placas se incubaron a 36°C hasta observar efecto citopático. La técnica se realizó con CDV y PDV, tanto en células MDCK como en células VERO.

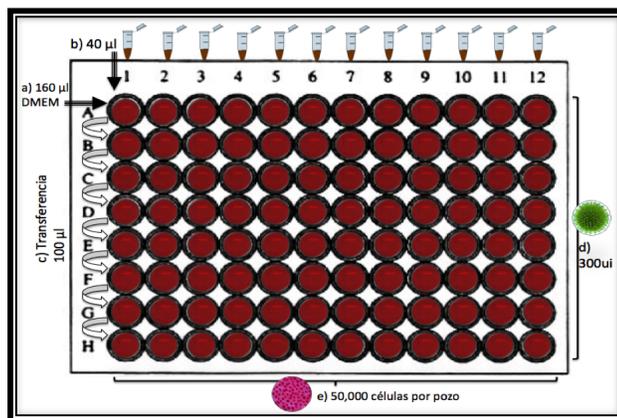


Figura 2.4: **Ensayo de seroneutralización.** Se llevaron a cabo diluciones doble seriadas de las muestras serológicas, realizando transferencias de 100µl(a, b y c). Se utilizó una placa completa como control negativo.

Las células MDCK se utilizaron para los ensayos de neutralización viral, a partir de sueros obtenidos durante el 2011 (39 sueros) y 2012 (9 sueros), procesando un total de 48 muestras. Se llevó a cabo utilizando únicamente CDV.

En el ensayo de neutralización con células MDCK, se observaron alteraciones a la monocapa de células a las 24 hrs de tratamiento, el cual no correspondía con el efecto citopático ocasionado por distemper. Se ha sugerido que en ocasiones las muestras de suero pueden ocasionar cierto grado de citotoxicidad, por lo que se consideró trabajar este procedimiento con células VERO, línea celular en la que no se observó dicho efecto y que se ha reportado de manera más frecuente en análisis de neutralización viral para diagnóstico de morbilivirus en mamíferos marinos (Clancy et al., 2013; Nielsen et al., 2000; Duignan et al., 1994). Por lo anterior, se probaron los ensayos por neutralización en células VERO para llevar a cabo las neutralizaciones de 89 sueros obtenidos durante el 2013, asimismo fue posible repetir las neutralizaciones de 29 muestras del año 2011

y 6 del 2012, procesando un total de 124 muestras de suero con esta línea celular para CDV y 103 muestras para PDV.

También se obtuvo la seroprevalencia tomando el nivel de anticuerpos de cada muestra positiva, esto se llevó a cabo por localidad y por especie viral (CDV y PDV). Se estableció el nivel de protección (nulo, bajo, medio y alto) de acuerdo a la dilución de los sueros en el que aún no se presentaba efecto citopático, estableciéndolo de acuerdo al título de anticuerpos:

- en todas las diluciones o en 1:5 - nulo
- de 1:10 a 1:40 - bajo
- de 1:80 a 1:160 - medio
- de 1:320 a 1:640 - alto

2.7 Análisis estadístico

Con base en el conocimiento de la biología, ecología y epidemiología del agente viral, se analizó el efecto del periodo de muestreo, tipo de ecosistema, localidad, familia muestreada, especie, sexo, edad, condición de vivo o muerto y tipo de muestra obtenida, sobre la probabilidad de infección. Estas variables fueron analizadas con el apoyo del software MATLAB. Mediante el método denominado Minimum Description Length (MDL), se agruparon los datos categóricos en bloques de atributos que tienen mayor interacción entre ellos (Mampaey & Vreeken, 2010). Los datos mejor agrupados se analizaron usando tablas de contingencia, con la prueba estadística de independencia χ^2 de Pearson para determinar si la proporción de resultados positivos y negativos difieren entre las categorías de cada una de las variables anteriores. Posteriormente se utilizó la corrección de Yates que aporta una corrección del 5% a aquellas variables que

presentan frecuencias inferiores a 5. Se consideró dependencia cuando el valor de χ^2 era mayor que el valor del intervalo (que es la máxima cota inferior de la región de rechazo) (Vidakovic, 2011). Los resultados se interpretaron como significativos cuando el valor de P fue menor al valor de alfa= 0.05 (Vidakovic, 2011). Una vez obtenidos los resultados de la prueba de independencia, se llevó a cabo un análisis de probabilidad condicionada con las variables en las cuales se encontró dependencia para la presencia viral y se realizaron gráficas que indicaron la probabilidad de encontrar un resultado positivo o negativo bajo la influencia de cada variable (Vidakovic, 2011).

Asimismo, se llevó a cabo una correlación de Pearson para determinar la influencia en la distancia geográfica de las localidades con la seroprevalencia. Estas distancias se calcularon con las coordenadas geográficas de cada isla usando la librería fossil (Vavrek, 2011) implementada en R (*R: A language and environment for statistical computing*, 2008).

3. Resultados

3.1 Obtención de muestras

Se obtuvieron 293 muestras totales de 192 individuos pertenecientes a diferentes especies (Cuadro 3.1). Las muestras obtenidas se clasificaron de acuerdo al estado en el que se encontraron los tejidos (Como se menciona en materiales y métodos) (Cuadro 3.2). Las muestras se procesaron por RT-PCR, sin embargo, en algunos estudios ha sido necesario acudir a otras técnicas diagnósticas cuando el grado de descomposición del ejemplar muestreado es de moderado a avanzado. (grado 3 a grado 5; (Lipscomb et al., 1996)).

	Zc	Pv	Dd	Dc	Tt	Gg	Sl	Pm	Er	Cl	Cf
2012	21	0	3	2	6	1	2	1	0	1	8
2013	120	4	6	0	1	0	0	0	14	0	2
Total	141	4	9	2	7	1	2	1	14	1	10

Cuadro 3.1: **Cantidad de individuos muestreados por especie durante el 2012 y 2013.** (Zc) *Zalophus californianus*, (Pv) *Phoca vitulina*, (Dd) *Delphinus delphis*, (Dc) *Delphinus capensis*, (Tt) *Tursiops truncatus*, (Gg) *Grampus griseus*, (Sl) *Stenella longirostris*, (Pm) *Physeter macrocephalus*, (Er) *Eschrichtius robustus*, (Cl) *Canis latrans*, (Cf) *Canis familiaris* .

Calidad de las muestras	Zc	PV	Dd	Dc	Tt	Gg	Sl	Pm	Er	Cl	Cf
Grado 1	126	0	0	0	0	0	0	0	3	1	10
Grado 2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Grado 3	2	1	0	0	0	0	0	1	6	0	0
Grado 4	9	3	9	2	7	1	2	0	5	0	0
Grado 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Cuadro 3.2: **Identificación de las muestras con base a la condición en la que se encontraron los tejidos**, desde los individuos vivos (grado 1), hasta los individuos muertos que se encontraron en descomposición avanzada (grado 4). No se realizó el muestreo de ningún ejemplar en estado de momificación (grado 5). (Zc) *Zalophus californianus*, (Pv) *Phoca vitulina*, (Dd) *Delphinus delphis*, (Dc) *Delphinus capensis*, (Tt) *Tursiops truncatus*, (Gg) *Grampus griseus*, (Sl) *Stenella longirostris*, (Pm) *Physeter macrocephalus*, (Er) *Eschrichtius robustus*, (Cl) *Canis latrans*, (Cf) *Canis familiaris*.

3.2 Análisis molecular (RT-PCR)

3.2.1 Estandarización de la técnica

La Figura 3.1 muestra el producto de amplificación de tres bandas de 429 pb al mantener una temperatura de alineamiento de 50°C a partir de una cepa vacunal Bayovac protect 3 (cepa Lederle), otro virus igualmente cepa Lederle proporcionado en el laboratorio de virología y una muestra de una cría de lobo marino perteneciente a la Isla Granito en el Golfo de California.

3.2.2 Diagnóstico molecular

Año 2012

Se obtuvieron en total 65 muestras (tejido, sangre e hisopados), pertenecientes a 45 individuos de las siguientes especies: 1) lobo marino (*Zalophus californianus*), 2) delfín común de rostro corto (*Delphinus delphis*), 3) delfín común de rostro largo (*Delphinus*

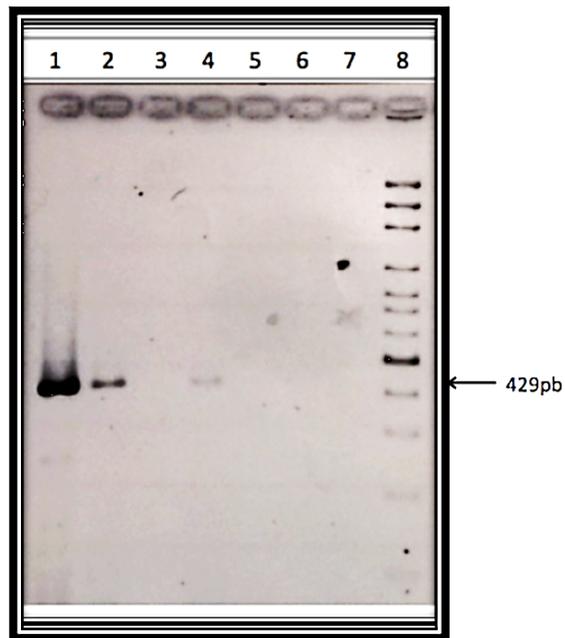


Figura 3.1: Imagen de gel de agarosa de la técnica estandarizada para la detección de un fragmento del gen P de morbilivirus. En el carril 1 y 2 es posible observar bandas intensas obtenidas a partir de muestras de vacuna, el carril 3 pertenece al control negativo, en el carril 4 se observa la primera muestra positiva obtenida de una cría de lobo marino durante el 2012. En la columna 8 se muestra el marcador de 100 pb de Invitrogen. Las columnas 5, 6 y 7 se encuentran vacías.

capensis), 4) tonina (*Tursiops truncatus*), 5) calderón gris (*Grampus griseus*), 6) delfín tornillo (*Stenella longirostris*), 7) cachalote (*Physeter macrocephalus*), 8) coyote (*Canis latrans*) y 9) perro doméstico (*Canis lupus familiaris*), de las cuales se obtuvo el producto de amplificación de 429 pb en 5 muestras de sangre de individuos vivos. Las especies positivas fueron tres crías de lobo marino localizadas en la Isla Granito que forma parte de las Islas del Golfo de California, así como un coyote y un perro doméstico de la Isla Magdalena ubicada sobre la vertiente del Pacífico, como se muestra en la Figura 3.2, donde se observa en el gel de agarosa la amplificación de productos de 429 pb que corresponden al tamaño esperado del fragmento del gen de la fosfoproteína. Una de las crías pertenecientes a Isla Granito (carril 3 del gel de agarosa), resulto positiva tanto para la muestra sanguínea como para el hisopado nasal.

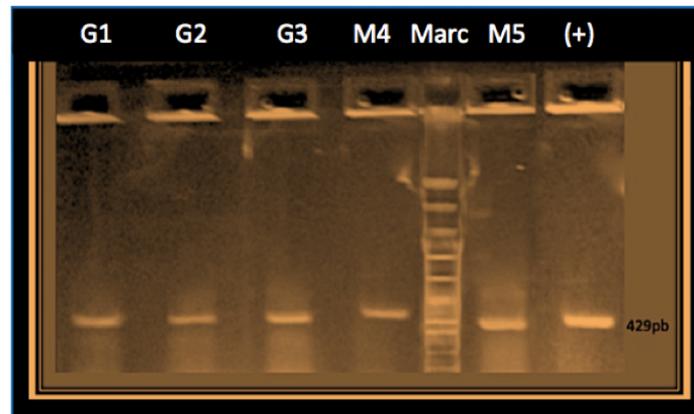


Figura 3.2: Foto de gel de agarosa de las muestras positivas mediante RT-PCR. Las primeras tres muestras (G1, G2 y G3) corresponden a crías de lobos marinos de la Isla Granito, el carril M4 corresponde a un perro de Isla Magdalena en el Pacífico y el carril M5 corresponde a la cría de coyote de la misma localidad. "Marc" corresponde al marcador de 100 pb de Invitrogen y (+) es el control positivo a partir de la cepa vacunal Lederle de distemper canino.

Año 2013

Durante este periodo se obtuvieron 228 muestras (tejido, sangre e hisopado) pertenecientes a 147 individuos, las especies identificadas fueron: 1) lobo marino, 2) ballena gris (*Es-*

Especie	Localidad	No de muestras	+	Prevalencia
Lobo marino	Isla Granito	141	3	2.12
Perro doméstico	Isla Magdalena	10	1	10
Coyóte	Isla Magdalena	1	1	*100
Promedio				37.37

Cuadro 3.3: **Prevalencia de morbilivirus por especie, en porcentaje.** Tomando en cuenta el número de muestras obtenidas para ambos años, se obtuvo una prevalencia promedio del 37.37%, con 5 individuos positivos (+). La prevalencia del coyote se señala con un asterisco ya que se obtuvo la muestra de un solo individuo.

chrichtius robustus), 3) delfín común de rostro corto, 4) delfín nariz de botella, 5) foca de puerto (*Phoca vitulina*), y 6) perro doméstico. No se identificó ninguna muestra positiva a morbilivirus mediante la técnica de RT-PCR.

En el Cuadro 3.3, se muestra la prevalencia de morbilivirus por especie, considerando el tamaño de muestra de ambos años (2012-2013). En la Figura 3.3 se muestra la prevalencia de morbilivirus por orden y familia, identificando al virus por RT-PCR.

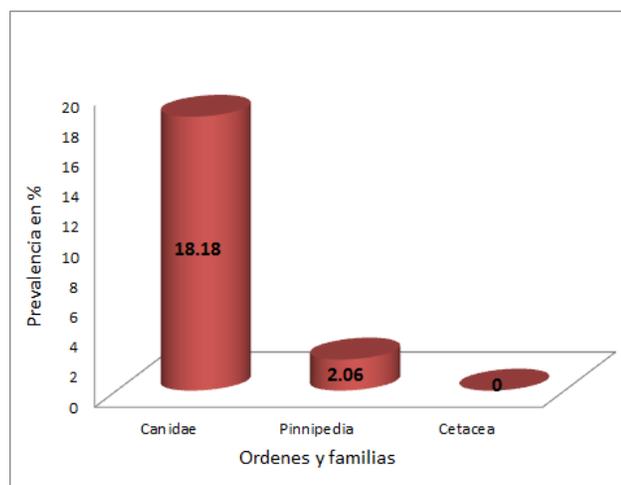


Figura 3.3: **Prevalencia de morbilivirus por orden y familia (2012-2013).** Se obtuvieron 3 individuos positivos pertenecientes a la superfamilia *pinnipedia* y 2 individuos de la familia *canidae*. No se obtuvo ningún individuo positivo del orden de los cetáceos.

Prevalencia de morbilivirus en crías de lobo marino en Islas del Golfo de California (2012-2013)

Durante ambos periodos se capturaron un total de 74 crías de lobo marino de la región de las Islas del Golfo de California. En 3 muestras sanguíneas de lobos marinos pertenecientes a Isla Granito, se obtuvo el amplificado de 429 pb. La prevalencia correspondió a 4.05% entre todas las islas; en la Figura 3.4, se muestra la cantidad de individuos positivos por isla.

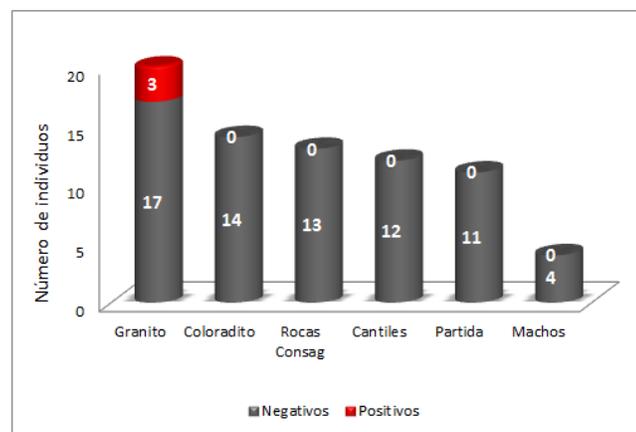


Figura 3.4: Número de individuos positivos a morbilivirus en las Islas del Golfo de California (lobos marinos). La prevalencia para Isla Granito fue del 15% y para las demás islas del 0%.

3.3 Secuenciación y análisis filogenético

Se encontró mayor similitud con una cepa vacunal Onderstepoort de CDV, un aislado de CDV de Tailandia y CDV de hurón al analizar el porcentaje de identidad de las secuencias obtenidas con otras secuencias del gen que codifica para la fosfoproteína de morbilivirus, adquiridas del GenBank (Cuadro 3.4). En la Figura 3.5 se muestra el árbol filogenético construido para el análisis de secuencias del GenBank y de las secuencias obtenidas en el presente trabajo.

num. de acceso GenBank	G1	G2	G3	M4	M5
Onderstepoort AB250735	96.4	93.8	99.7	99.7	65.60
THAICDV JX886798	96.4	93.8	99.7	99.7	65.60
HurónCDV AB606409	96.4	93.8	99.7	99.7	65.60
MapacheCDV AY263373	94.8	92.5	98.0	98.1	64.60
FocaSCDV AF259551	94.2	91.9	97.4	97.4	64.0
VisónCDV AY130856	94.2	91.9	97.4	97.4	64.0
Lederle AY286480	93.8	91.6	97.1	97.0	63.60
FocaEUCDV 787987	93.8	90.0	96.1	96.1	63.60
LinceCDV GU001865	93.2	90.3	95.5	95.4	63.30

Cuadro 3.4: **Porcentaje de identidad de las secuencias obtenidas con secuencias del GenBank.** El análisis mostró similitudes de más del 95% con diferentes variantes virales de distemper canino. G1, G2 y G3 son las muestras de crías de lobos marinos pertenecientes a la Isla Granito, M4 es la muestra del perro doméstico y M5 la muestra de la cría de coyote de Isla Magdalena.

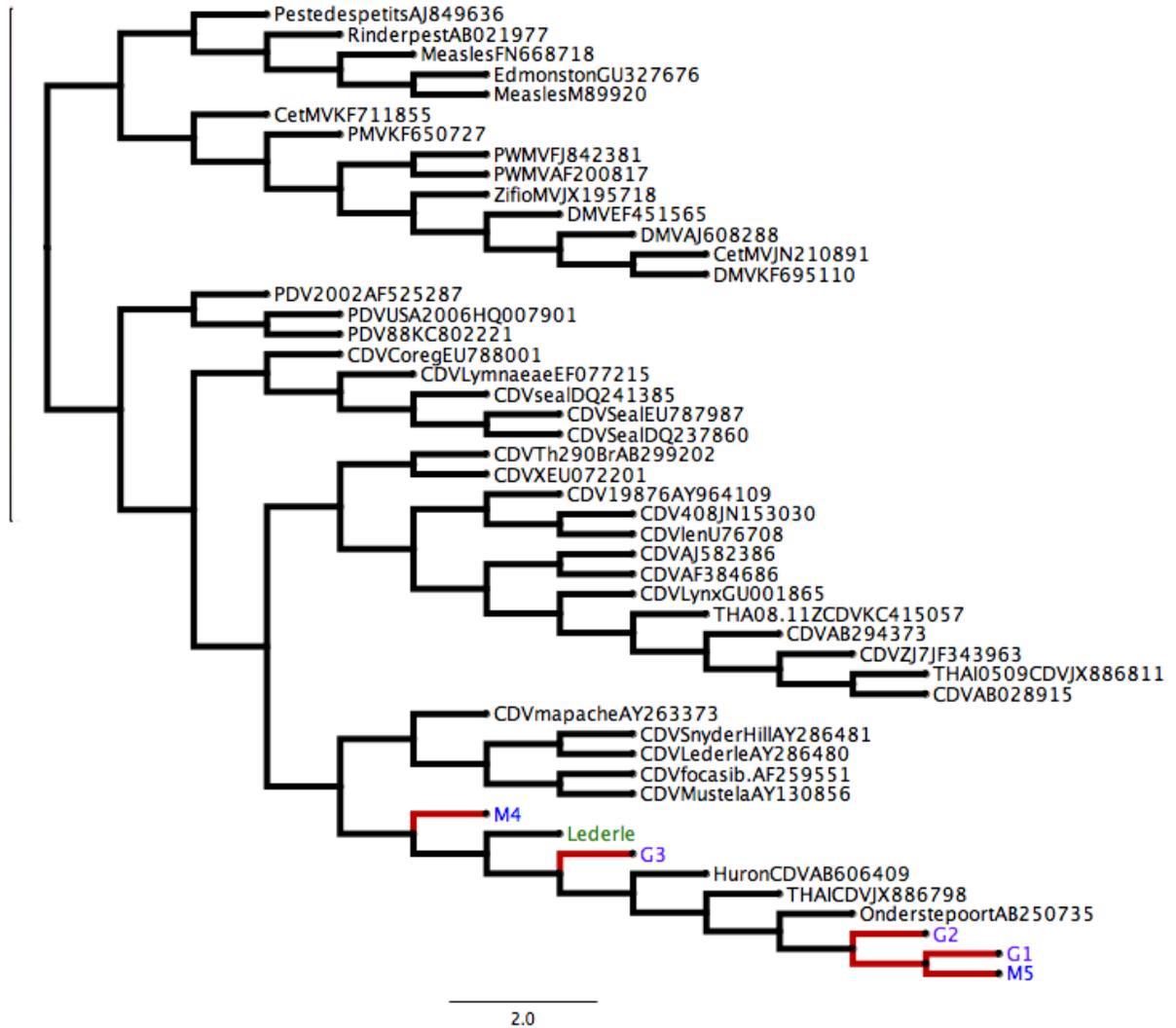


Figura 3.5: **Árbol filogenético construido con base al método de unión de vecinos.** Las ramas del árbol que se encuentran en color rojo corresponden a las muestras positivas obtenidas en el presente trabajo: G1, G2 y G3 corresponden a las muestras de crías de lobo marino pertenecientes a la Isla Granito y M4 y M5 corresponden al perro y a la cría de coyote (respectivamente) de Isla Magdalena.

3.4 Titulación viral

El título obtenido para los virus utilizados fue de 10^4 DICC50% para CDV con células MDCK y de $10^{3.7}$ DICC50% para CDV y $10^{3.1}$ DICC50% para PDV con células VERO. En la Figura 3.6 se muestra el efecto citopático producido por CDV en células MDCK, en la Figura 3.7 se muestra el efecto citopático producido por el mismo virus en células VERO y en la Figura 3.8 se observa el efecto citopático en células VERO ocasionado por PDV. Cada imagen con el respectivo control negativo, que se muestra a la derecha. El efecto observado fue muerte celular con desprendimiento, dicho efecto se muestra como un patrón no uniforme de células adheridas en la base del pozo, con zonas vacías.

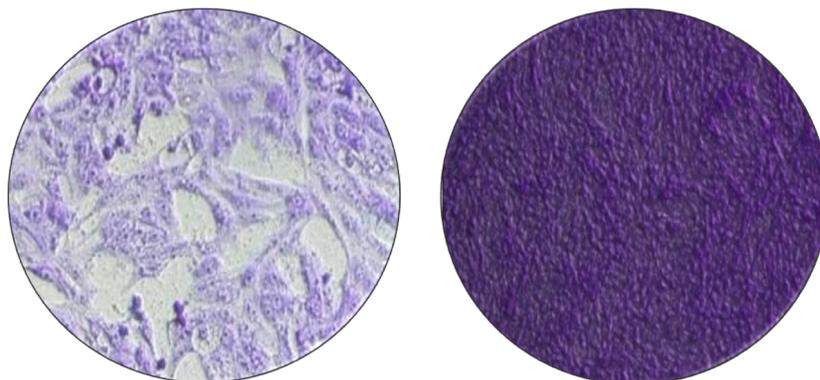


Figura 3.6: **Efecto citopático de CDV, cepa Lederle en células MDCK.** En la imagen del lado izquierdo se observan los huecos en la base del pozo, debido a la muerte y desprendimiento celular. El efecto se presentó a las 72 hpi. En el lado derecho se muestra el control negativo de células MDCK, donde no se distingue ningún efecto y se observa una capa homogénea de células. Las células se tiñeron con cristal violeta para una mejor observación del efecto citopático.

3.5 Análisis serológico

De un total de 137 muestras de suero procesadas (2011, 2012 y 2013) se obtuvieron 30 muestras positivas para CDV. Para PDV se procesaron 103 muestras obteniendo 9 muestras positivas. El ensayo de neutralización se realizó únicamente con sueros

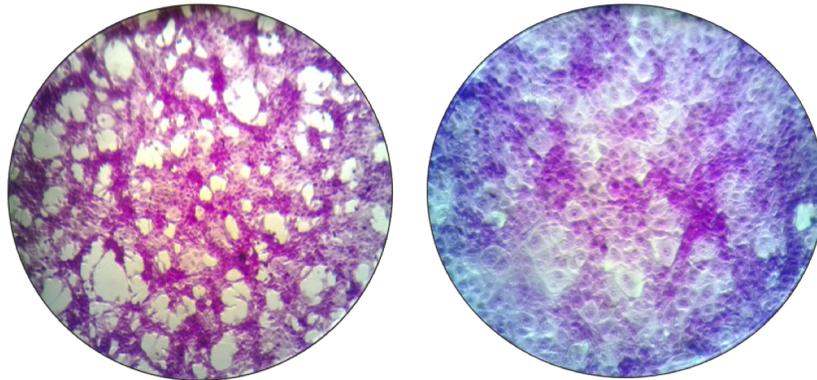


Figura 3.7: **Efecto citopático de CDV, cepa Lederle en células VERO.** En la imagen del lado izquierdo se observan los huecos en la base del pozo, debido a la muerte y desprendimiento celular. El efecto se observó a las 96 hpi. En el lado derecho se muestra el control negativo de células VERO, donde no se distingue ningún efecto y se observa una capa homogénea de células. Las células se tiñeron con cristal violeta para una mejor observación de las mismas.

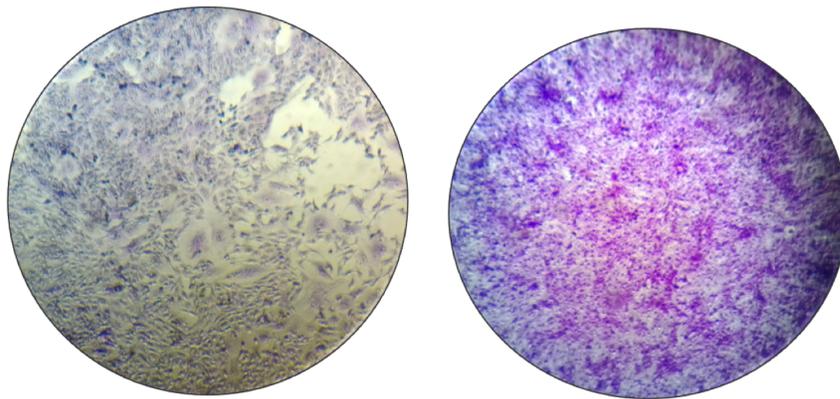


Figura 3.8: **Efecto citopático ocasionado por PDV en células VERO.** En la imagen del lado izquierdo se observan los huecos en la base del pozo, debido a la muerte y desprendimiento celular. El efecto se presentó a las 96 hpi. En el lado derecho se muestra el control negativo de células VERO, donde no se distingue ningún efecto y se observa una capa homogénea de células.

de individuos vivos pertenecientes a las especies de *Canis lupus familiaris* y crías de *Zalophus californianus*.

3.5.1 Neutralización con células MDCK (2011-2012)

De las 48 muestras procesadas con células MDCK para la neutralización de CDV, se identificó efecto neutralizante en: 1) una muestra perteneciente a un perro doméstico no vacunado de la localidad de Isla Magdalena en B.C.S., en donde se observó el efecto citopático con desprendimiento celular hasta la dilución 1:40 y 2) en una muestra de cría de lobo marino de Rocas Consag en las Islas del Golfo de California, presentando efecto citopático hasta la dilución 1:80, en ambas muestras el efecto se observó a las 48 hrs post infección, obteniendo una seroprevalencia para perros domésticos del 50% y para lobos marinos del 2.22% (Figura 3.9).

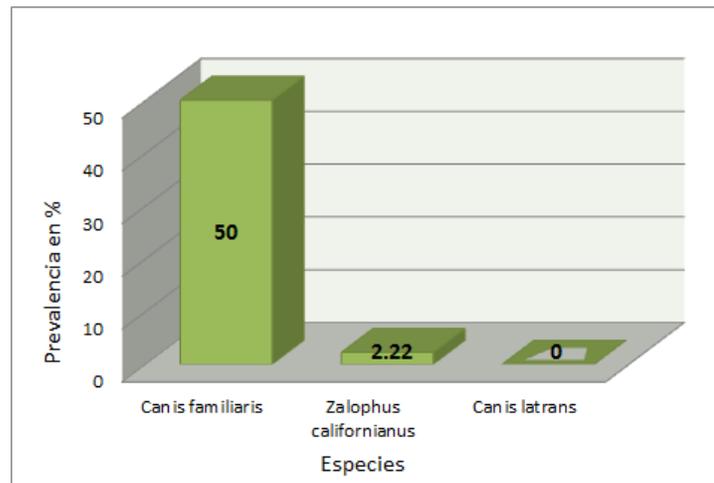


Figura 3.9: Seroprevalencia de morbilivirus por especie utilizando células MDCK. Se obtuvo una seroprevalencia promedio de 17.40%.

3.5.2 Neutralización con células VERO (2011, 2012 y 2013)

Se obtuvo una seroprevalencia del 100% para perros domésticos (considerando que únicamente fueron dos individuos) y una seroprevalencia de 23.14% para lobos marinos, neutralizando la cepa de CDV, Lederle. Para las neutralizaciones con PDV se obtuvo una seroprevalencia de 8.82% en lobos marinos (Figura 3.10), con ambos virus se observó efecto citopático a las 96 hpi.

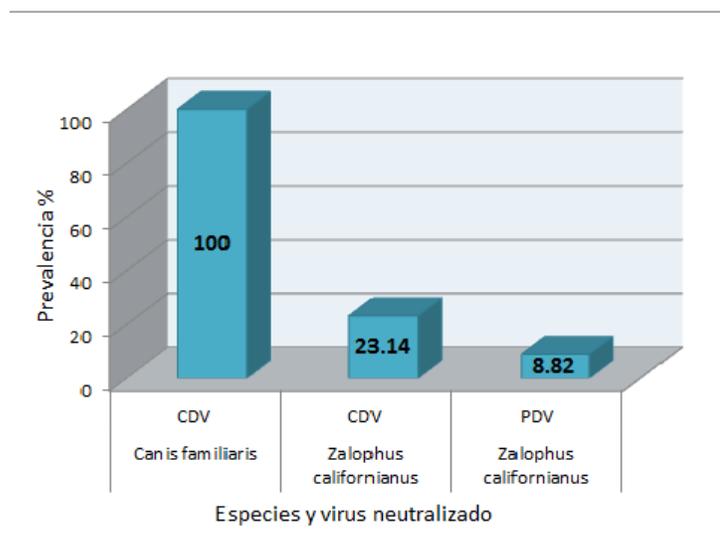


Figura 3.10: **Seroprevalencia de morbilivirus por especie utilizando células VERO.** Se obtuvo una prevalencia de 100% para *Canis familiaris* y de 23.14% para *Zalophus californianus*, neutralizando CDV. Se obtuvo una prevalencia de 8.82% para *Zalophus californianus* y 0% para *Canis familiaris*, neutralizando PDV. No se realizó la neutralización con sueros de coyotes.

3.5.3 Seroprevalencia en lobos marinos

Golfo de California: se encontró seropositividad tanto para CDV como para PDV en lobos marinos de cada una de las islas de donde fue posible obtener muestra serológica en el Golfo de California, entre ellas: Cantiles, Granito, Rocas Consag, Coloradito, Luis Gonzaga, Rasito y Partida. Con una seroprevalencia de 22.91% para CDV y de 13.23% para PDV (Figura 3.11).

Islas de la vertiente del Pacífico: se encontró una seropositividad del 15.78% para CDV en lobos marinos pertenecientes a Isla Natividad, Isla Asunción e Isla Cedros. No se encontró seropositividad para PDV en esta región (Figura 3.12) .

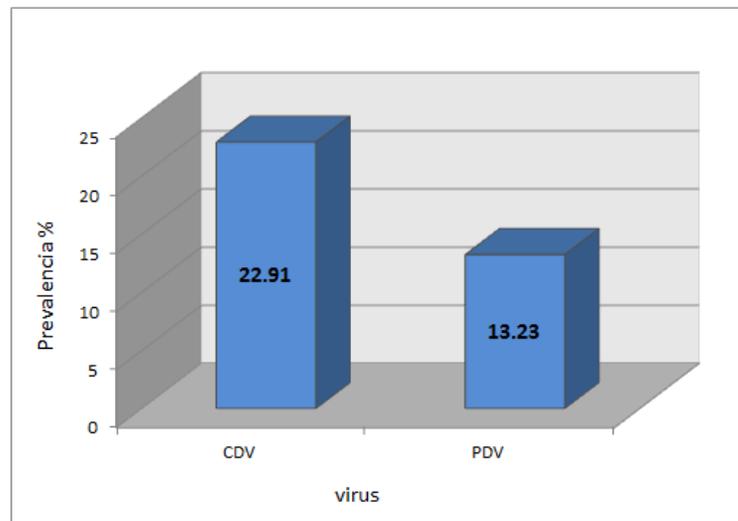


Figura 3.11: Seroprevalencia de morbilivirus en lobos marinos pertenecientes a las Islas del Golfo de California. Se obtuvo una seroprevalencia de 22.91% para CDV y de 13.23% para PDV, en crías de lobo marino, en la totalidad de localidades de muestreo en las Islas del Golfo de California.

3.5.4 Seroprevalencia por localidad

Se obtuvo la seroprevalencia para cada localidad, tanto de la región del Pacífico como para las Islas del Golfo de California. En el Cuadro 3.5 se presentan los porcentajes y en la Figura 3.13 se muestran gráficamente con un mapa las prevalencias obtenidas para CDV. En el Cuadro 3.6 se presentan los porcentajes y en la Figura 3.14 se muestran gráficamente con un mapa las prevalencias obtenidas para PDV .

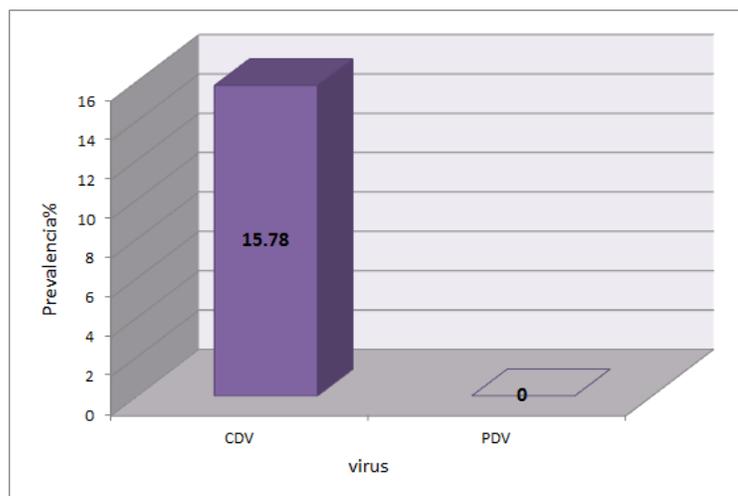


Figura 3.12: Seroprevalencia de morbilivirus en lobos marinos pertenecientes a las Islas de la vertiente del Pacífico. Se obtuvo una seroprevalencia de 15.78% para CDV en la totalidad de localidades de muestreo en las Islas de la vertiente del Pacífico.

	Localidad	Especie	Prevalencia de CDV
Golfo de California			
	Isla Rasito	<i>Zalophus californianus</i>	80
	Isla Coloradito	<i>Zalophus californianus</i>	33.33
	Rocas Consag	<i>Zalophus californianus</i>	33.33
	Luis Gonzaga	<i>Zalophus californianus</i>	25
	Isla Cántiles	<i>Zalophus californianus</i>	11.76
	Isla Partida	<i>Zalophus californianus</i>	5.88
	Isla Granito	<i>Zalophus californianus</i>	0
Vertiente del Pacífico			
	Isla Magdalena	<i>Canis familiaris</i>	100
	Isla Magdalena	<i>Canis latrans</i>	0
	Isla Natividad	<i>Zalophus californianus</i>	27.27
	Isla Asunción	<i>Zalophus californianus</i>	12.50
	Isla Cedros	<i>Zalophus californianus</i>	10.52

Cuadro 3.5: Seroprevalencia obtenida para CDV por especie de acuerdo a la localidad de muestreo. (se muestran los porcentajes).

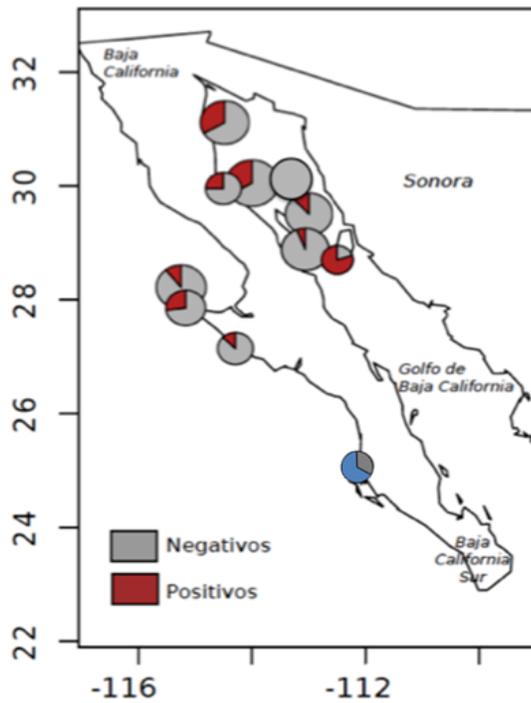
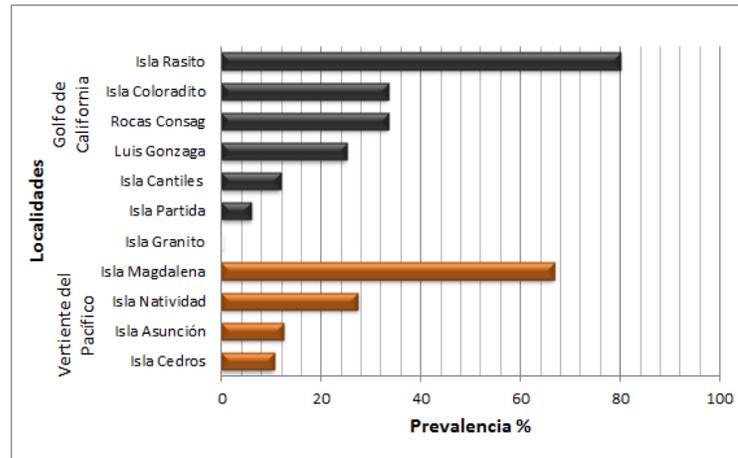


Figura 3.13: Seroprevalencia de CDV en las diferentes localidades de muestreo. Arriba: Gráfica de prevalencias. Rasito fue la localidad con el porcentaje más elevado al obtener 80%. Abajo: mapa que representa la prevalencia de morbilivirus en cada localidad. El tamaño de cada gráfica de pay constituye el tamaño de muestra. En los pays con color rojo se observa la seroprevalencia de los lobos marinos por localidad y con color azul se observa la seroprevalencia en cánidos de Isla Magdalena.

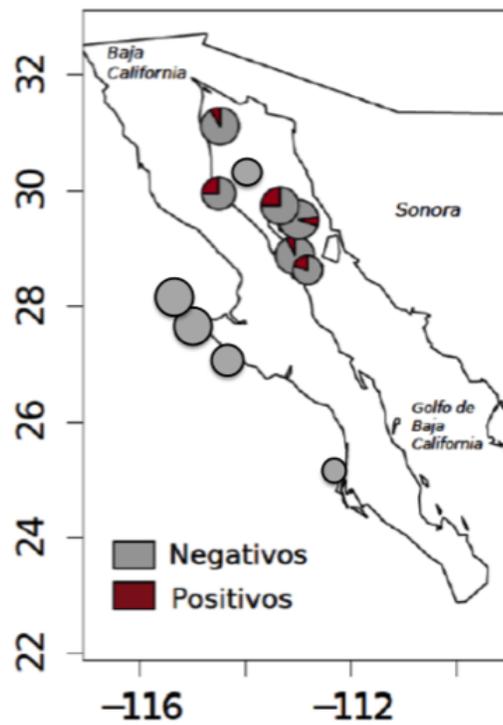
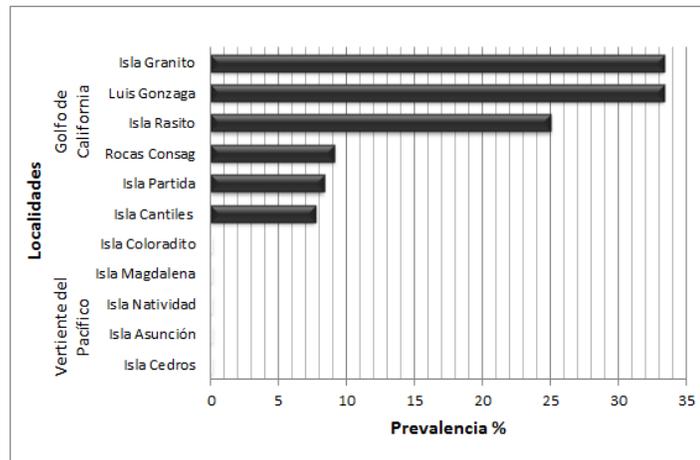


Figura 3.14: Seroprevalencia de PDV en las diferentes localidades de muestreo. Arriba: gráfica de prevalencias. Granito y Luis Gonzaga fueron las localidades con el porcentaje más elevado al obtener 33.33%. No se obtuvieron resultados positivos en las regiones ubicadas en la vertiente del Pacífico. Abajo: mapa donde se muestra la prevalencia de cada localidad. Cada gráfica de pay con color rojo representa la seroprevalencia en lobos marinos y el tamaño de cada uno representa el tamaño de muestra.

	Localidad	Especie	Prevalencia de PDV
Golfo de California			
	Isla Rasito	<i>Zalophus californianus</i>	25
	Isla Coloradito	<i>Zalophus californianus</i>	0
	Rocas Consag	<i>Zalophus californianus</i>	9.09
	Luis Gonzaga	<i>Zalophus californianus</i>	33.33
	Isla Cántiles	<i>Zalophus californianus</i>	7.69
	Isla Partida	<i>Zalophus californianus</i>	8.33
	Isla Granito	<i>Zalophus californianus</i>	33.33
Vertiente del Pacífico			
	Isla Magdalena	<i>Canis familiaris</i>	0
	Isla Natividad	<i>Zalophus californianus</i>	0
	Isla Asunción	<i>Zalophus californianus</i>	0
	Isla Cedros	<i>Zalophus californianus</i>	0

Cuadro 3.6: Seroprevalencia obtenida para PDV por especie de acuerdo a la localidad de muestreo (se muestran los porcentajes).

3.5.5 Seroprevalencia de CDV y PDV por localidad, de acuerdo al título de anticuerpos

De acuerdo al nivel protector de anticuerpos establecido por la máxima dilución en la que no se presentó efecto citopático, se obtuvo un mayor porcentaje de células con efecto citopático a partir de diluciones bajas, indicando nula protección de anticuerpos en la mayoría de las localidades. El nivel protector de anticuerpos con mayor número de repeticiones después del nulo fue un nivel bajo en las que se mostró efecto citopático en diluciones de 1:10 a 1:40 (Figura 3.15).

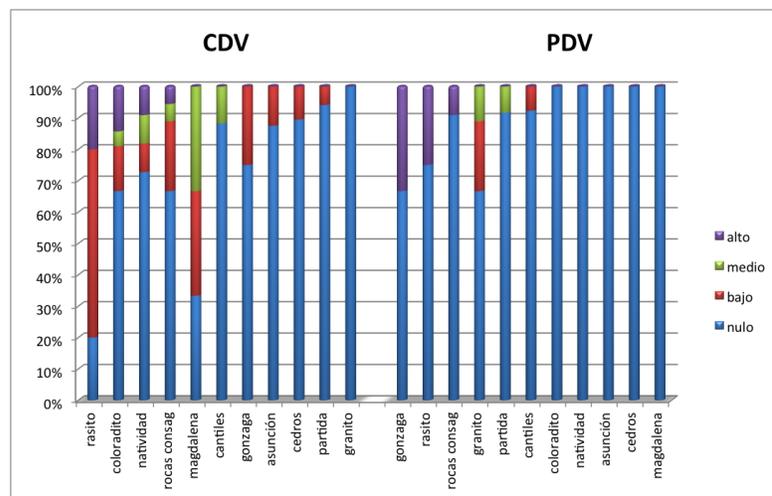


Figura 3.15: **Seroprevalencia de acuerdo al título de anticuerpos.** Se consideraron los siguientes niveles de anticuerpos con base en la dilución en la que no se presentó efecto citopático: alta de 1:320 a 1:640, media de 1:80 a 1:160, baja de 1:10 a 1:40 y nula en 1:5 o presentando efecto en todas las diluciones. Exceptuando a la Isla Rasito con una seroprevalencia para CDV del 60% con un nivel protector bajo, en todas las localidades dominó un título de anticuerpos nulo tanto para CDV como para PDV.

3.6 Análisis estadístico

3.6.1 Relación entre las distancias geográficas de las localidades y la seroprevalencia

No se observó correlación entre la distancia geográfica de las localidades y la seroprevalencia para ambos virus. Siendo para CDV $r = -0.176$, $P = 0.199$ y para PDV $r = 0.052$ y $P = 0.706$

Variable	χ^2	Valor P	Valor alfa	Intervalo	
Tipo de ecosistema	10.36	0.001	0.05	3.84	dependencia
Grupo taxonómico (familia y orden)	10.85	0.004	0.05	5.99	dependencia
Especie	38.27	0.00001	0.05	16.91	dependencia
Meses	19.45	0.003	0.05	12.59	dependencia
Tipo de muestra	6.34	0.27	0.05	11.07	independencia
Condición (vivo o muerto)	1.70	0.19	0.05	3.84	independencia
Edad	0.16	0.91	0.05	5.99	independencia
Sexo	0.77	0.37	0.05	3.84	independencia
Localidad	14.99	0.13	0.05	18.30	independencia

Cuadro 3.7: **Resultados de la prueba de independencia χ^2 de Pearson.** Se observó dependencia de la presencia viral para el tipo de ecosistema, grupo taxonómico, especie y meses únicamente.

3.6.2 Factores geográficos, ambientales, temporales, poblacionales e individuales, asociados a la presencia de morbilivirus

De acuerdo con los datos analizados en el presente trabajo, la presencia del agente viral detectado mediante RT-PCR resultó dependiente de las variables que se muestran en el Cuadro 3.7. En las Figuras 3.16, 3.17, 3.18 y 3.19, se muestra la probabilidad de que ocurra el agente viral con las variables de las cuales se mostró dependencia.

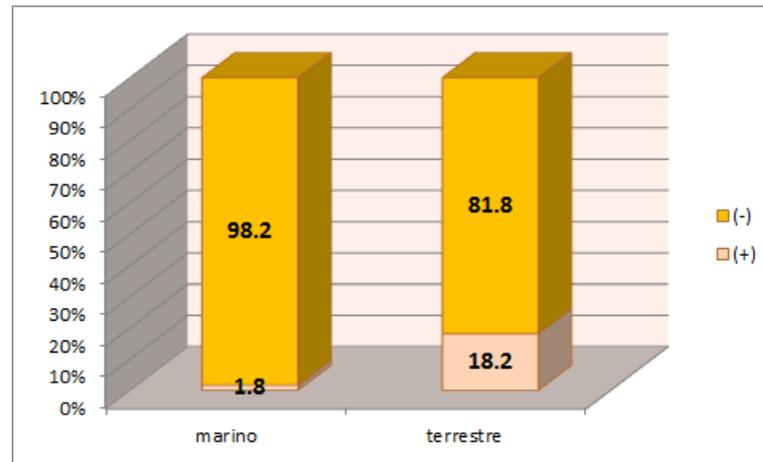


Figura 3.16: **Influencia del ecosistema sobre la presencia de morbilivirus.** Se muestra la probabilidad de que se presente el morbilivirus en cada tipo de ecosistema de los que se obtuvieron muestras. Cabe mencionar que el tamaño de población muestreada para especies del ecosistema marino fue mayor que para especies del ecosistema terrestre.

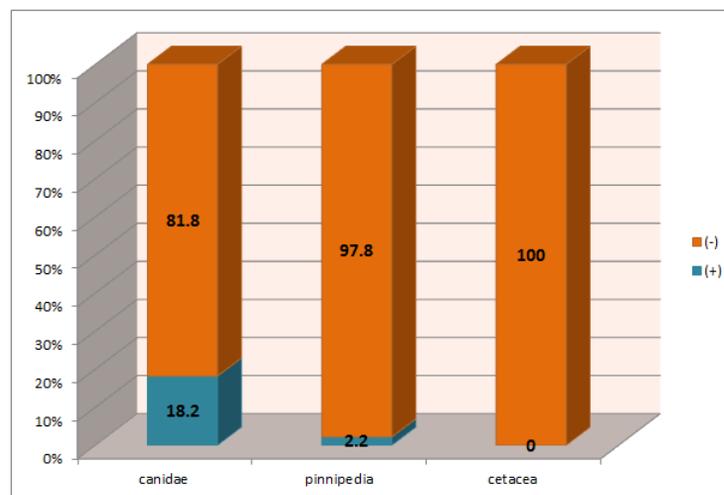


Figura 3.17: **Influencia del grupo taxonómico (orden y familia) sobre la presencia de morbilivirus.** La probabilidad de obtener un resultado negativo para cada uno de los grupos taxonómicos fue mayor. El número de pinnípedos muestreados fue mayor que de cetáceos y caninos.

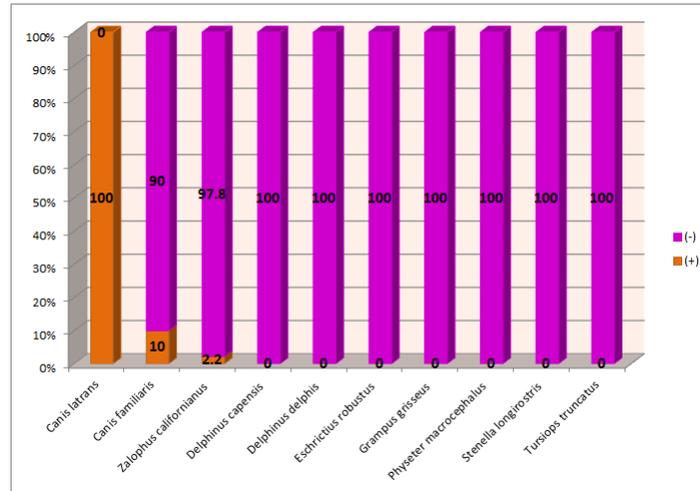


Figura 3.18: **Influencia de la especie sobre la presencia de morbilivirus.** Se muestra la probabilidad de obtener un resultado positivo de acuerdo a cada especie, donde las únicas que mostraron una influencia sobre el resultado fueron: *Zalophus californianus*, *Canis latrans* y *Canis familiaris*. Cabe notar que se obtuvo la muestra de un solo individuo de la especie *Canis latrans* y que la especie con mayor número de individuos muestreados fue *Zalophus californianus*.

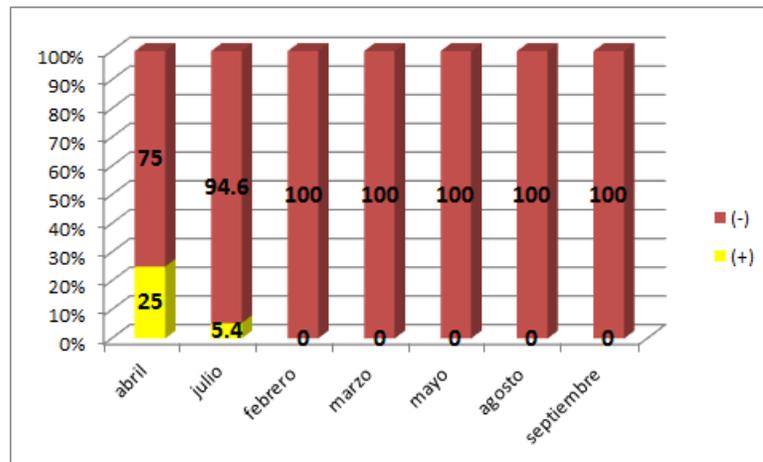


Figura 3.19: **Influencia de los meses sobre la presencia de morbilivirus.** Se muestran los meses con mayor influencia sobre los resultados, siendo estos únicamente abril y julio, ambos con mayor probabilidad de obtener un resultado negativo.

4. Discusión y Conclusiones

El efecto del cambio climático global sumado al impacto causado por las actividades humanas, está generando presiones significativas rumbo a la extinción de muchas especies y ocasionando cambios en los patrones y tasas de transmisión y propagación de enfermedades, la acumulación de toxinas contaminantes en el ambiente y la invasión de especies patógenas a nuevos ecosistemas. Los patógenos y las enfermedades infecciosas generan problemas tanto para la protección de especies en riesgo, como para el mantenimiento de la biodiversidad (Gulland & Hall, 2007).

En el presente estudio, se muestra que el morbilivirus que circula en crías de lobos marinos de las Islas del Golfo de California y en cánidos de la vertiente del Pacífico se asemeja a cepas virales de distemper canino, por homología con cepas reportadas del GenBank. El método utilizado para la construcción del árbol filogenético, analiza los datos en el área de la fenética, formando grupos aislados con base a la similitud de las secuencias, sin tomar en cuenta las relaciones evolutivas (Peña, 2011), en este caso, el árbol nos indica amplia similitud entre las secuencias obtenidas, con aquellas de CDV, manteniendo mayor porcentaje de similitud con una cepa de CDV de Tailandia, una cepa Onderstepoort y una cepa de CDV de hurón. Es importante tomar en cuenta la cercanía que el árbol muestra entre las secuencias obtenidas de dos crías de lobos marinos pertenecientes a la Isla Granito del Golfo de California (G1 y G2) con la secuencia obtenida a partir de la cría de coyote (M5), que pertenece a la Isla Magdalena en la vertiente del Pacífico. Este resultado puede indicarnos que la cepa de morbilivirus que

circula en la Península de Baja California, además de provenir de especies terrestres, se mantiene en circulación tanto en pinnípedos de la vertiente del Pacífico como en pinnípedos del Golfo de California. Sin embargo, para confirmar los resultados obtenidos, se considera conveniente realizar árboles filogenéticos utilizando otros métodos como el bayesiano o el de máxima verosimilitud, con secuencias de genes más variables como los genes que codifican para las proteínas H y F. Dichos análisis podrían indicar el ancestro al que se encuentran mayormente relacionadas las especies virales de las costas de la Península de Baja California. El fragmento del gen de la fosfoproteína amplificado en este trabajo, es una región altamente conservada entre los morbilivirus, por lo que los análisis realizados con dichas secuencias, no permiten conocer de manera precisa las diferencias evolutivas entre especies virales de carnívoros terrestres y mamíferos marinos de la zona (Earle et al., 2011). También se considera necesaria la realización de análisis que permitan la secuenciación del genoma viral completo u otros genes, tanto conservados como variables.

La calidad de las muestras obtenidas en muchos casos no fue la adecuada, principalmente en aquellos ejemplares que mostraban un cierto grado de descomposición, complicando la preservación de las muestras para poder identificar al morbilivirus, por lo que los resultados negativos no indican que el virus no se encuentre presente en las muestras procesadas y por lo tanto entre las poblaciones de mamíferos marinos. En la vertiente del Pacífico, la interacción de los mamíferos marinos con especies terrestres como coyotes y perros (Gallo-Reynoso & García-Aguilar, 2008) puede ser el factor que mantenga la presencia del virus. Por otra parte, en el Golfo de California se sugiere que la presencia de morbilivirus se mantiene en las poblaciones de lobos marinos desde hace varios años, sin que exista contacto con especies hospederas terrestres, por lo que se considera la posibilidad de que la prevalencia de morbilivirus disminuya en esta zona mientras los individuos continúen a distancia de otros hospederos (Kennedy et al., 2000). Sin embargo, la presencia ocasional de otras especies de pinnípedos que arriban desde el Pacífico a algunas Islas del Golfo de California, como ha sido reportado por

Gallo-Reynoso et al (2010), podría abrir la posibilidad de otra fuente de transmisión de morbilivirus hacia los lobos marinos de esta región.

En el análisis estadístico se muestra dependencia para la presencia de morbilivirus con el tipo de ecosistema, el grupo taxonómico (orden y familia), la especie y el mes. La dependencia del mes nos indica una variación mensual de la presencia del agente viral en las poblaciones. Por ejemplo, se lograron resultados positivos en muestras de carnívoros terrestres en el mes de abril, este resultado se puede explicar en función de la estacionalidad que se ha reportado en relación a la presencia del virus de distemper canino, reportando una alza de la infección en cánidos en los meses de abril y octubre (M. Morales et al., 1997). Sugerimos llevar a cabo estudios mas específicos que determinen las fluctuaciones en la presencia de morbilivirus durante todo el año. Por otra parte, la dependencia del grupo taxonómico para la presencia de morbilivirus resulta significativa, al observar una mayor probabilidad de encontrar morbilivirus en especies de cánidos y pinnípedos. Lo anterior se puede justificar al observar que estas son especies que residen de manera permanente en las zonas de muestreo. Esta característica permite el contacto entre especies pertenecientes a ambos ecosistemas (marino y terreste), situación que incrementa el riesgo de transmisión de morbilivirus a partir de especies hospederas. Además, al encontrarse en tierra, la obtención de muestras en estas especies se facilita, mientras que los cetáceos, al ser organismos estrictamente acuáticos y en su mayoría especies migratorias, el acceso a los individuos para la toma de muestras se dificulta. Estos factores complican el hallazgo de individuos positivos al depender prácticamente de aquellos ejemplares que varan en las costas. Esto también resulta de importancia para el tipo de ecosistema del que se obtuvo la muestra, ya que aunque la probabilidad de obtener un resultado negativo fue mayor para ambos ecosistemas, se observó una mayor posibilidad de obtener un resultado positivo en ecosistemas terrestres y en las especies marinas que interactúan con dicho entorno.

En el análisis serológico, se obtuvo un mejor resultado con células VERO en el ensayo de neutralización de la infectividad viral. Sin embargo, con ambas líneas celu-

lares se obtuvo una mayor seroprevalencia en perros domésticos. Para lobos marinos pertenecientes tanto a las Islas del Golfo de California como a las Islas de la vertiente del Pacífico se obtuvo mayor prevalencia al neutralizar CDV que PDV. Asimismo, se lograron obtener resultados positivos para CDV tanto en la región del Pacífico como del Golfo de California, mientras que para PDV únicamente se obtuvieron resultados positivos para el Golfo de California. Sería conveniente repetir un análisis molecular de muestras pertenecientes a lobos marinos de la región del Pacífico para confirmar los resultados obtenidos por serología y determinar por secuenciación que especie viral circula entre las poblaciones. No fue posible establecer que la seroprevalencia tanto para CDV como para PDV este correlacionada con la ubicación geográfica de las regiones de muestreo.

De acuerdo a los niveles (nulo, bajo, medio y alto) establecidos de anticuerpos para este trabajo, se puede concluir que en la mayor parte de las zonas muestreadas los individuos presentan protección baja o nula contra CDV y PDV. Algunos estudios en perros han determinado el título de anticuerpos protectores contra CDV en diluciones iguales o mayores a 1:96 o 1:100 mediante las técnicas de seroneutralización y en prueba de neutralización por reducción en placa (SeokYoung et al., 2009; Oyedele et al., 2004; McCaw et al., 1998). De acuerdo con otro estudio en pinnípedos en cautiverio, se consideraron positivos, títulos con intervalo de 1:16 a 1:24 en focas grises y de 1:16 a 1:1536 en focas de puerto (Clancy et al., 2013). Estos resultados pueden indicar cierto grado de protección inmunológica contra morbilivirus, (tomando en cuenta únicamente a la población de crías de lobo marino) y no exentan a las poblaciones tanto marinas como terrestres de presentar un brote epizootico o un incremento en la tasa de infección si ciertas condiciones externas, propias de los individuos o incluso del agente viral cambian, como se ha reportado en algunos estudios (Ohishi et al., 2012; Moore, 2011; Härkönen et al., 2006; de Swart et al., 1995). Se considera importante también analizar la seroprevalencia y la identificación de niveles de anticuerpos en hembras adultas para obtener resultados más completos y precisos acerca de la protección inmunológica que presentan los individuos

contra morbilivirus en las poblaciones de lobos marinos (Härkönen et al., 2006). En otros estudios se ha demostrado la seropositividad de morbilivirus en crías de foca de aproximadamente 9 a 14 días de edad sin presentar signos de la enfermedad. Asimismo se demostró que de estas crías únicamente un individuo tenía una madre virémica, por lo que es improbable que el virus se transmita vía maternal (Duignan et al., 1995). Es así como en este trabajo podemos determinar con nuestros resultados, que tanto las crías de lobo marino como los individuos adultos pueden estar en contacto con el agente infeccioso sin ser severamente afectados por el mismo (Duignan et al., 1995).

El morbilivirus es un agente infeccioso que ha demostrado presentar facilidad para transmitirse entre especies de ambientes terrestres y acuáticos (Mamaev et al., 1995). Sin embargo se considera la posibilidad de que estos virus siempre hayan circulado entre las poblaciones de mamíferos marinos y que fue posible descubrir su presencia hasta 1988 en focas del Lago Baikal debido a que las técnicas moleculares ya permitían su reconocimiento (Mamaev et al., 1995). Es necesario estudiar la dinámica de morbilivirus entre poblaciones silvestres para determinar el patrón de movimiento de la infección entre especies y regiones y así se pueda entender el riesgo hacia especies vulnerables para poder aplicar un manejo adecuado.

Este es el primer estudio llevado a cabo en la Península de Baja California en el que es posible analizar tanto en mamíferos marinos como en carnívoros terrestres la presencia de morbilivirus y la similitud de las especies virales entre ambos grupos biológicos. Se puede concluir que la infección por morbilivirus entre lobos marinos es de carácter enzoótico, siendo probable que se haya reducido la patogenicidad y virulencia de la especie de morbilivirus que circula en dichas regiones, por cuestiones evolutivas. Por ejemplo, se ha reportado que ciertas mutaciones en la proteína de matriz, producen cambios en la virulencia y patogenicidad del CDV, liberando partículas virales atenuadas, que además de no provocar infecciones severas en los individuos, pueden permitir que se monte una respuesta inmune protectora contra el agente infeccioso (Dietzel et al., 2011; Rivera-Gámez, 2010; Duignan et al., 1997). Este tipo de respuesta se presenta

con cepas virales vacunales, por lo que se considera necesario llevar a cabo estudios más detallados que confirmen que la especie de morbilivirus que circula en la región es CDV de origen terrestre y que además se determine la cepa viral. Este también es el primer reporte de la presencia de morbilivirus en coyotes de México.

La falta de información acerca de las enfermedades presentes en mamíferos marinos y la forma en como ocurren durante cierto tiempo y sus causas principales se debe principalmente a la falta de monitoreo dirigida a la salud de las especies marinas, esto puede deberse al enfoque que se ha dado a la salud de animales domésticos y a la economía de animales de producción, más que la atención que se le ha prestado a las enfermedades de la vida silvestre y a la conservación (Gulland & Hall, 2007). De manera general, se ha logrado cierto conocimiento acerca de la dinámica de morbilivirus en el ambiente acuático y terrestre, sin embargo poco es lo que se ha podido resolver al respecto, por lo que sería conveniente realizar estudios más detallados que aporten información más precisa acerca de la transmisión de este agente viral hacia mamíferos marinos o viceversa y de esta manera, proponer planes de manejo donde sea posible evitar el contacto entre especies de mamíferos marinos con mamíferos terrestres. La aparición de morbilivirus en el ambiente acuático no solo involucra el estudio del agente viral de manera aislada, llevar a cabo su estudio implica tomar en cuenta factores externos que benefician la ocurrencia de la infección entre las diferentes especies (Härkönen et al., 2006).

Sugerimos llevar a cabo proyectos que involucren principalmente la regulación de especies invasoras en las zonas costeras, como la presencia de perros ferales. Esto puede incluir informar a las personas que habitan en las regiones acerca de programas de esterilización y vacunación para sus mascotas o incluso erradicación de perros ferales que ya se encuentran en dichas regiones. Una epizootia podría poner en riesgo la viabilidad en el largo plazo de las poblaciones marinas, particularmente conforme aumente la actividad humana en el área y de cómo resultado una degradación del hábitat marino y terrestre (*Proyecto Para la Conservación, Manejo y Aprovechamiento Sustentable de los Pinnípedos en México*, 2000).

Anexo A. Reactivos

- 1 Buffer RNAlater de Qiagen: (Cat. no. 76106) se utiliza para la protección de RNA durante el almacenamiento de las muestras. Muestras de hisopados y una porción de tejido no mayor a 2 cm deben ser sumergidas en su totalidad en un contenedor con RNAlater. El reactivo conserva el RNA 1 día a 37°C, 7 días a 18–25°C o 4 semanas a 2–8°C. Las muestras pueden almacenarse a -20°C or -80°C durante periodos más largos.
- 2 DEPC, amresco: (Cat. no. E174-5G) se prepara DEPEC al 0.01%, diluyendo con agua destilada y posteriormente se debe esterilizar a 121°C a 15 libras de presión, durante 10 a 15 min.
- 3 DMEM, Gibco: (Cat. no. 12800-017) se agregan 2 L de agua destilada en un matraz y se agregan 9.6 g de MEM y 13.5 g de DMEM, se agregan 4.4 g de bicarbonato de sodio NaHCO₃ y 4.4g HEPES, se deja mezclando durante 10 a 15 min. Se debe obtener un pH de 7.2 -7.4, midiendo con el potenciómetro. El medio preparado debe ser filtrado con membranas de 0.22 micras y se puede llevar a cabo una prueba de esterilidad dejando en incubación por 24 hrs. Para su utilización con las líneas celulares MDCK y VERO, se preparó medio al 8% de suero fetal bovino.
- 4 Etanol, Merck: (Cat. no. 107017) Se prepara etanol al 75% para su utilización en la extracción de RNA

- 5 Isopropanol, J.K. Baker (Cat. no. 67-63-0).
- 6 Kit Qiagen one step: (Cat. no. 210210) Se lleva a cabo el procedimiento de acuerdo a las instrucciones del kit, que incluye el Buffer 5X, dNTP's, agua libre de RNAasas, y la enzima Qiagen que contiene la transcriptasa reversa y la Taq polimerasa.
- 7 PBS: para 1 L se agregan 8 gr de cloruro de sodio, 0.2 g de cloruro de potasio, 0.96 g de sodio fosfato dibásico, 0.2 g de fosfato de potasio monobásico, se afora a 1 L pH 7.4 y se esteriliza en autoclave.
- 8 QIAamp Viral RNA Mini Kit: (Cat. no. 52906) Se lleva a cabo el procedimiento de acuerdo a las instrucciones del kit que incluye el buffer AVL, buffer acarreador, buffer AVE, buffers AW1, AW2, así como las columnas y los tubos recolectores.
- 9 Suero fetal bovino, gibco: (Cat. no. 10437-028) Se inactiva durante 30min a °C, posteriormente se filtra utilizando membrana de 22 micras.

Anexo B. Abreviaturas

- 1 B.C: Baja California.
- 2 B.C.S: Baja California Sur.
- 3 cDNA: DNA complementario.
- 4 CDV: distemper canino, por sus siglas en ingles; canine distemper virus.
- 5 CeMV: morbilivirus de cetáceos, por sus siglas en ingles; cetacean morbillivirus.
- 6 CONANP-Apff: Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, Área de protección de flora y fauna.
- 7 DEPC: Dietilpirocarbonato.
- 8 DICC: Dosis infectantes en cultivo celular.
- 9 DMEM: por sus siglas en ingles; Dulbecco's Modified Eagle's Medium.
- 10 DMV: morbilivirus de delfines, por sus siglas en ingles; dolphin morbillivirus.
- 11 dNTP's: dinucleótidos trifosfato.
- 12 EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.
- 13 hpi: horas post infección.

- 14 LBWMV: morbilivirus del zifio de Longman, por sus siglas en ingles; Longman beaked whale morbillivirus
- 15 MDCK: línea celular de epitelio de riñón canino Madin-Darby.
- 16 pb: pares de bases
- 17 PBS: Buffer fosfato salino, por sus siglas en ingles; phosphate buffered saline.
- 18 PDV: distemper de fócidos, por sus siglas en ingles; phocine distemper virus.
- 19 PMV: morbilivirus de marsopas, por sus siglas en ingles; porpoise morbillivirus.
- 20 PWMV: morbilivirus de calderones, por sus siglas en ingles; pilot whale morbillivirus.
- 21 rpm: revoluciones por minuto
- 22 RT-PCR: Reacción en cadena de polimerasa, transcripción reversa, por sus siglas en ingles; reverse transcription polymerase chain reaction

Anexo C. Fotografías



(a) Equipo de Isla Magdalena, con mandíbula (b) Equipo de las Islas del Golfo de California de ballena azul



(c) En casa de Don Víctor, el farero de Cabo San Lázaro (d) Muestreo de crías de lobos marinos



(e) Muestreo de crías de lobos marinos



(f) Muestreo de la cría de coyote



(g) Cría de coyote capturado en Isla Magdalena



(h) Ballenato de Puerto San Carlos en B.C.S.



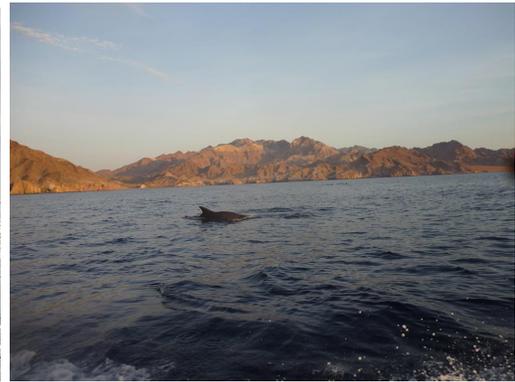
(i) Delfín varado en las costas de Isla Magdalena



(j) Ballenato varado en la Laguna Ojo de Liebre



(k) Ballena gris en la Laguna Ojo de Liebre



(l) Delfín común en el Golfo de California



(m) Lobos marinos de California en la Reserva de la Biósfera del Vizcaíno



(n) Focas de puerto de Isla Asunción

Referencias

- Alvarez-Borrego, S., & Lara-Lara, J. R. (1991). The Physical Environment and Primary Productivity of the Gulf of California. In *The gulf and peninsular province of the californias* (pp. 1–13). American Association of Petroleum. Geologists.
- Alvarez-Castañeda, S. T. (1999). Familia *Canidae*. In *Mamíferos del Noroeste de México* (Vol. II). La Paz, B.C.S, México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.
- Andelt, W. F. (1985). Behavioural Ecology of Coyotes in South Texas. In *Wildlife monographs* (Vol. 094, pp. 5–45). Wildlife Society.
- Arnaud, G. (1993). Alimentación del coyote (*Canis latrans*) en Baja California Sur, México. In *Avances en el estudio de los mamíferos de México* (Vol. I, pp. 205–215). Asociación Mexicana de Mastozoología, A.C.
- Atkinson, K. T., & Shackleton, D. (1991). Coyote, *Canis latrans*, ecology in a rural-urban environment. *Canadian Field Naturalist*(105), 49–54.
- Aurioles, D., & Llinas, J. (1987). Western Gulls as a Possible Predator of California Sea Lion Pups. *The Condor*(89), 923–924.
- Aurioles-Gamboa, D., Castro-González, I., García-Rodríguez, F., Luque-Flores, S., Godínez-Reyes, C., Brousset, D., ... Romo, F. P.-G. (2000, octubre). *Estado de salud de las poblaciones de lobos marinos (Zalophus californianus) en el Golfo de California*. Primer Congreso de Responsables de Proyectos de Investigación en Ciencias Naturales, CONACYT. Veracruz, México.

- Auriol-Gamboa, D., & González, Z. A. (1994). Algunos factores ecológicos que determinan la distribución y abundancia del lobo marino de California, (*Zalophus californianus californianus*), en el Golfo de California. *Ciencias Marinas*, 20(4), 535-553.
- Bartholomew, G. A. (1970, september). A Model for the Evolution of Pinniped Polygyny. *Evolution*, 24(3), 546-559.
- Bekoff, M. (1977, junio). *Canis latrans*. *Mammalian Species*(79), 1-9.
- Bekoff, M., & Wells, M. C. (1981). Behavioural Budgeting by Wild Coyotes: The Influence of Food Resources and Social Organization. *Animal behaviour*(29), 794-801.
- Berta, A. (2009). Pinnipedia, Overview. In *Encyclopedia of marine mammals* (pp. 861-868). Academic Press.
- Blixenkron-Möller, M., Svansson, V., Appel, M., Krogsrud, J., Have, P., & Örvell, C. (1992). Antigenic relationships between field isolates of morbilliviruses from different carnivores. *Archives of Virology*, 123, 279-294.
- Boeuf, B. J. L. (1978). Social Behaviour in Some Marine and Terrestrial Carnivores. In *Contrasts in behaviour* (pp. 251-279). Crown College, University of California, Santa Cruz.
- Bossart, G. D. (2006, junio). Marine Mammals as Sentinel Species for Oceans and Human Health. *Oceanography*, 19(2), 134-137.
- Bossart, K. N., & Broder, C. C. (2007). Paramyxovirus Entry. In *Viral entry into host cells* (pp. 1-20). Landes Bioscience.
- Bressemer, M.-F. V., Waerebeek, K. V., & Raga, J. A. (1999, october). A review of virus infections of cetaceans and the potential impact of morbilliviruses, poxviruses and papillomaviruses on host population dynamics. *Diseases of Aquatic Organisms*, 38, 53-65.
- Brillinger, D. R., & Stewart, B. S. (1998). Elephant-seal movements: Modelling migration. *The Canadian Journal of Statistics*, 26(3), 431-443.

- Burek, K. A., Gulland, F. M. D., & O'Hara, T. M. (2008, april). Effects of Climate Change on Arctic Marine Mammal Health. *Ecological Applications*, 18(2), 126–134.
- Butler, J., du Toit, J., & Bingham, J. (2004, february). Free-ranging domestic dogs (*Canis familiaris*) as predators and prey in rural zimbabwe: threats of competition and disease to large wild carnivores. *Biological Conservation*, 115(3), 369–378.
- Ceballos, G., & Arroyo-Cabrales, J. (2012). Lista Actualizada de los Mamíferos de México 2012. *Revista Mexicana de Mastozoología Nueva época*(1), 27-80.
- Clancy, M. M., Gamble, K. C., & Travis, D. A. (2013). Detection of Canine Distemper Virus Serum Neutralizing Antibodies in Captive U.S. Phocids. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 44(1), 70–78.
- Cosby, S., McQuaid, S., Duffy, N., Lyons, C., Rima, B., Allan, G., . . . Örvell, C. (1988, november). Characterization of a seal morbillivirus. *Nature*, 336, 115–116.
- Cypher, B. L., Spencer, K. A., & Scrivner, J. H. (1994, march). Food–Item Use by Coyotes at the Naval Petroleum Reserves in California. *The Southwestern Naturalist*, 39(1), 91–95.
- Delahay, R. J., Smith, G. C., & Hutchings, M. T. (2009). The Science of Wildlife Disease Management. In *Management of disease in wild mammals* (pp. 1–8). Springer.
- de Swart, R. L., Harder, T. C., Ross, P. S., Vos, H. W., & Osterhaus, A. (1995). Morbilliviruses and Morbillivirus Diseases of Marine Mammals. *Infectious Agents and Disease*, 4(3), 125–130.
- Dietzel, E., Anderson, D. E., Castan, A., von Messling, V., & Maisner, A. (2011, july). Canine Distemper Virus Protein Influences Particle Infectivity, Particle Composition, and Envelope Distribution in Polarized Epithelial Cells and Modulates Virulence. *Journal of Virology*, 85(14), 7162-7168.
- Duignan, P. J., Nielsen, O., House, C., Kovacs, K. M., Duffy, N., Early, G., . . . Geraci, J. R. (1997, january). Epizootiology of Morbillivirus Infection in Harp, Hooded,

- and Ringed Seals From the Canadian Arctic and Western Atlantic. *Journal of Wildlife Diseases*, 33(1), 7-19.
- Duignan, P. J., Saliki, J. T., Aubin, D. J. S., Early, G., Sadove, S., House, J. A., . . . T, J. R. G. (1995, october). Epizootiology of Morbillivirus Infection in North American Harbor Seals (*Phoca vitulina*) and Gray Seals (*Halichoerus grypus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 31(4), 491–501.
- Duignan, P. J., Saliki, J. T., Aubin, D. J. S., House, J. A., & Geraci, J. R. (1994, january). Neutralizing antibodies to Phocine Distemper virus in Atlantic Walruses (*Odobenus rosmarus rosmarus*) from Arctic Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, 30(1), 90–94.
- Earle, J. P., Melia, M. M., Doherty, N. V., Nielsen, O., & Cosby, S. L. (2011, february). Phocine Distemper Virus in Seals, East Coast, United States, 2006. *Emerging Infectious Diseases*, 17(2), 215–220.
- Estudio previo justificativo para el establecimiento de la Reserva de la Biósfera del Pacífico de California.* (2005). Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, México D.F.
- Farooq, U., Khan, Q. M., & Barrett, T. (2008). Molecular Diagnosis of Rinderpest and Peste Des Petits Ruminants Virus Using Trizol Reagent. *Pakistan Veterinary Journal*, 28(2), 63–67.
- Gallo-Reynoso, J. P., & García-Aguilar, M. C. (2008). Análisis Preliminar de la Presencia de Perros Ferales en la Isla de Cedros, Baja California. *Revista Mexicana de Mastozoología*, 12, 130–140.
- Gallo-Reynoso, J. P., Maravilla-Chávez, M. O., & Navarro-Serment, C. J. (2010). New records of non-resident pinnipeds from the Gulf of California, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 81, 209–213.
- García-Aguilar, M. C., & Auriolos-Gamboa, D. (2003, diciembre). Cuidado materno en el lobo marino de California de Los Islotes, Golfo de California, México. *Ciencias Marinas*, 29(4), 573–583.

- García-Aguilar, M. C., & Gallo-Reynoso, J. P. (2012). Perros ferales en la isla de Cedros, Baja California, México: una posible amenaza para los pinnípedos. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 83, 785–789.
- García-Rodríguez, F. (1995). *Ecología alimentaria del lobo marino de California, *Zalophus californianus californianus* en Los Islotes, B.C.S., México* (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, B.C.S.
- García-Rodríguez, F., & Aurióles-Gamboa, D. (1997). Contribución al conocimiento de la diversidad íctica en la Bahía de La Paz por medio del análisis coprológico en el lobo marino de California, *Zalophus californianus californianus*. In *La Bahía de La Paz. Investigación y conservación*. Universidad Autónoma de Baja California Sur. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. Scripps Institution of Oceanography: La Paz, B.C.S.
- Gese, E. M., Schultz, R. D., Rongstad, O. J., & Andersen, D. E. (1991, april). Prevalence of Antibodies against Canine Parvovirus and Canine Distemper Virus in Wild Coyotes in Southeastern Colorado. *Journal of Wildlife Diseases*, 27(2), 320-323.
- Gámiz, C., Martella, V., Ulloa, R., Fajardo, R., Quijano-Hernandéz, I., & Martínez, S. (2011, june). Identification of a new genotype of canine distemper virus circulating in America. *Veterinary Research Community*, 35, 381–390.
- Godínez-Reyes, C., del Prado Gasca, K. S., López, H. Z., Aguirre, A., Anderson, D. W., González, A. P., . . . González, A. Z. (2006). Monitoreo de Poblaciones y Condición de Salud de Aves Marinas y Lobos Marinos en Islas del Norte del Golfo de California, México. *Gaceta Ecológica, Instituto Nacional de Ecología*(081), 31–45.
- Goldstein, T., Mazet, J. A., Gill, V. A., Doroff, A. M., Burek, K. A., & Hammond, J. A. (2009, june). Phocine Distemper Virus in Northern Sea Otters in the Pacific Ocean, Alaska, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 15(6), 925–927.
- Green, J. S., & Gipson, P. S. (1994). Feral Dogs. In *Prevention and control of wildlife* (pp. 77–82). University of Nebraska–Lincoln.

- Guerrero-Ruiz, M., Ramírez, J. U., & Bracho, L. R. (2006). *Las Ballenas del Golfo de California* (Vol. 1). Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), Instituto Nacional de Ecología (INE).
- Gulland, F. M., & Hall, A. J. (2007, april). Is Marine Mammal Health Deteriorating? Trends in the Global Reporting of Marine Mammal Disease. *EcoHealth*, 4, 135–150.
- Guo, W., Evermann, J., Foreyt, W., Knowlton, F., & Windberg, L. (1986, november). Canine distemper virus in coyotes: A serologic survey. *Journal of American Veterinary Association*, 189(9), 1099-1100.
- Hamlin, K., & Schweitzer, L. (1979). Cooperation by coyote pairs attacking mule deer fawns. *Journal of Mammalogy*(60), 849–850.
- Hernández, C., & Auriolos-Gamboa, G. (1997, abril-mayo). *Fecundidad Tardía en hembras marcadas de lobo marino de California (Zalophus californianus californianus), de Los Islotes, Bahía de La Paz, México*. XXII Reunión Internacional para el Estudio de los Mamíferos Marinos.
- Hernández, L., Delibes, M., & Hiraldo, F. (1994, february). Role of reptiles and arthropods in the diet of coyotes in extreme desert areas of northern Mexico. *Journal of Arid Environments*, 26(2), 165–170.
- Härkönen, T., Dietz, R., Reijnders, P., Teilmann, J., Harding, K., Hall, A., . . . Thompson, P. (2006, january). A review of the 1988 and 2002 phocine distemper virus epidemics in European harbour seals. *Diseases of Aquatic Organisms*, 68, 115–130.
- Hutcheson, J., Walsh, P., & Given, D. (1999). Potential value of indicator species for conservation and management of new zealand terrestrial communities. In *Science for conservation:109* (pp. 5–90). Department of Conservation.
- Jensen, T., van de Bildt, M., Hans Henrik Dietz, Andersen, T. H., Hammer, A. S., Kuiken, T., & Osterhaus, A. (2002, july). Another Phocine Distemper Outbreak in Europe. *SCIENCE*, 297, 209–.

- Kennedy, S., Kuiken, T., Jepson, P. D., Deaville, R., Forsyth, M., Barrett, T., ... Wilson, S. (2000, november-december). Mass Die-Off of Caspian Seals Caused by Canine Distemper Virus. *Emerging Infectious Diseases*, 6(6), 637–639.
- King, J. (1983). Seals of the World. In (pp. 240–). British Museum and Cornell University Press.
- Kruuk, H., & Snell, H. (1981, april). Prey Selection by Feral Dogs From a Population of Marine Iguanas (*Amblyrhynchus cristatus*). *Journal of Applied Ecology*, 18(1), 197–204.
- Leopold, A. S. (1959). The Game Birds and Mammals. In *Wildlife of Mexico* (pp. 568–). Berkeley: University of California Press.
- Lipscomb, T. P., Kennedy, S., Moffett, D., Krafft, A., Klaunberg, B. A., Lichy, J. H., ... Taubenberger, J. K. (1996). Morbilliviral epizootic in bottlenose dolphins of the Gulf of Mexico. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8, 283–290.
- Lluch-Cota, S. E. (2007, april). The Gulf of California: Review of ecosystem status and sustainability challenges. *Progress in Oceanography*, 73, 1–26.
- Maldonado, J. E., Davila, F. O., Stewart, B. S., & Geffen, E. (1995, january). Intra-specific Genetic Differentiation in California Sea Lions (*Zalophus Californianus*) From Southern California and the Gulf of California. *Marine Mammal Science*, 11(1), 46-58.
- Mamaev, L., Denikina, N., Belikov, S., Volchkov, V., Visser, I., Fleming, M., ... Barrett, T. (1995). Characterisation of morbilliviruses isolated from Lake Baikal seals (*Phoca sibirica*). *Veterinary Microbiology*, 44, 251–259.
- Mampaey, M., & Vreeken, J. (2010). *Summarizing Categorical Data by Clustering Attributes*. Advanced Database Research and Modelling, Department of Mathematics and Computer Science.
- Maravilla-Chávez, M. O., & Gallo-Reynoso, J. P. (1999). Familia *Otariidae*. In *Mamíferos del noroeste de México* (Vol. II). La Paz, B.C.S, México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

- McCaw, D., Thompson, M., Tate, D., Bonderer, A., & Chen, Y. (1998, July). Serum distemper virus and parvovirus antibody titers among dogs brought to a veterinary hospital for revaccination. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 1(213), 72-75.
- Mellink, E. (1993). Biological conservation of Isla Cedros, Baja California Sur, Mexico: assessing multiple threats. *Biodiversity and Conservation*, 2, 62-69.
- Mellink, E., & Saavedra, A. L. R. (2005, junio). Dieta del Lobo Marino de California, *Zalophus Californianus*, en la Isla San Jorge, en el Norte del Golfo de California, México, 1998-1999. *Ciencias Marinas*, 31(002), 369-377.
- Mitchell, B. D., & Banks, P. (2005, July). Do wild dogs exclude foxes? Evidence for competition from dietary and spatial overlap in the Greater Blue Mountains region of New South Wales. *Austral Ecology*, 30(5), 581-591.
- Müller, G., Wohlsein, P., Beineke, A., Haas, L., Greiser-Wilke, I., Siebert, U., ... Baumgärtner, W. (2004, April). Phocine Distemper in German Seals, 2002. *Emerging Infectious Diseases*, 10(4), 723-725.
- Moore, T. T. (2011, May). *Climate Change and Animal Migration*. Gal. Moore.Doc.
- Morales, B. (1990). *Parámetros reproductivos del lobo marino de la Isla Ángel de la Guarda, Golfo de California, México*. (Tesis de maestría). Facultad de Ciencias, UNAM.
- Morales, M., Mora, L., & Salazar, J. (1997). Distemper Canino: Sobrevida por Edad, Sexo, Raza y Estación. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 12(1), 41-44.
- Morbillivirus infection in dolphins, porpoises, and whales*. (2013, August). U.S. Department of Commerce National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA), National Marine Fisheries Service.
- Nielsen, O., Stewart, R. E. A., Measures, L., Duignan, P., & House, C. (2000, July). A Morbillivirus Antibody Survey of Atlantic Walrus, Narwhal and Beluga in Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, 36(3), 508-517.
- Nix, R. (2010, April). *The Gulf of California: A physical, geological and biological study*.

- University of Texas at Dallas.
- Ohishi, K., Suzuki, R., & Maruyama, T. (2012). Host-Virus Specificity of the Morbillivirus Receptor, SLAM, in Marine Mammals: Risk Assessment of Infection Based on Three-Dimensional Models. In *New approaches to the study of marine mammals* (pp. 183–204). INTECH.
- Olesiuk, P. (1993). Annual prey consumption by harbor seals (*Phoca vitulina*) in the Strait of Georgia, British Columbia. *Fishery Bulletin*, *91*, 491-515.
- Ortega, J. C. (1988, november). Activity Patterns of Different- Aged Coyote (*Canis latrans*) Pups in Southeastern Arizona. *Journal of Mammalogy*, *69*(4), 831–835.
- Osterhaus, A., Groen, J., Vries, P. D., Uytdehaag, F., Klingeborn, B., & Zarnke, R. (1988, september). Canine distemper virus in seals. *Nature*, *335*, 403–404.
- Oyedele, O., Oluwayelu, D., Cadmus, S., Odemuyiwa, S., & Adu, F. (2004). Protective levels of canine distemper virus antibody in an urban dog population using plaque reduction neutralization test. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, *71*, 227–230.
- Peña, C. (2011, agosto). Métodos de inferencia filogenética. *Revista peruana de biología*, *18*(2), 265–267.
- Peterson, R., & Bartholomew, A. (1967). The natural history and behaviour of the California sea lion. *Am. Soc. Mammal. Spec. Pub.*(1), 79-.
- Proyecto Para la Conservación, Manejo y Aprovechamiento Sustentable de los Pinnípedos en México*. (2000, mayo). Secretaria del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, Instituto Nacional de Ecología.
- Pugliares, K. R., Bogomolni, A., Touhey, K. M., Herzig, S. M., Harry, C. T., & Moore, M. J. (2007). *Marine mammal necropsy: An introductory guide for stranding responders and field biologists*. Woods hole Oceanographic Institution.
- Qiagen. (2002, may). *OneStep RT-PCR Kit Handbook*.
- Raga, J.-A., Banyard, A., Domingo, M., Corteyn, M., Bressemer, M.-F. V., Fernández, M., ... Barrett, T. (2008, march). Dolphin Morbillivirus Epizootic Resurgence,

- Mediterranean Sea. *Emerging Infectious Diseases*, 14(3), 471–473.
- R: *A language and environment for statistical computing*. (2008). R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Riedman, M. (1990). *Seals, sea lions and walruses*. Oxford University Press. Oxford.
- Rivera-Gómez, N. Y. (2010). *Identificación por Técnicas de Biología Molecular de Morbillivirus en Lobos Marinos (Zalophus californianus) del Golfo de California* (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional.
- Rzeżutka, A., & Mizak, B. (2003, june). Sequence analysis of the fragment of the phosphoprotein gene of Polish distemper virus isolates. *Archives of Virology*, 148, 1623–1631.
- Schramm, Y., Mesnick, S., de la Rosa, J., Palacios, D., Lowry, M., Aurióles-Gamboa, D., ... Escorza-Treviño, S. (2009, march). Phylogeography of California and Galápagos sea lions and population structure within the California sea lion. *Marine Biology*, 156, 1375–1387.
- SeokYoung, J., SoJeo, A., KwonSik, C., Sonll, P., & Doo, K. (2009). Canine distemper virus neutralizing antibodies of adult dogs in Korea. *Journal of veterinary clinics*, 26(5), 423–428.
- Servín, J., & Huxley, C. (1995). Coyote home range size in Durango, Mexico. *Zeitschrift fuer Säugetierkunde*, 60(2), 119–120.
- Sánchez, R. (1987). *Observaciones sobre el comportamiento durante el periodo reproductivo del lobo marino común Zalophus californianus en la lobera Morro Santo Domingo, B.C. México* (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sánchez-Pacheco, J. ., Tershy, B., & Aguilar, J. L. (2000). Acciones de conservación de las islas de México. *Gaceta Ecológica*(56), 41–45.
- Stern, S. J. (2002). Migration and Movement Patterns. In *Encyclopedia of marine mammals* (pp. 742–748). Academic Press.
- Szteren, D., & Aurióles, D. (2006). *Population Status and Trends of the California*

- Sea Lion (Zalophus californianus californianus) in the Gulf of California, Mexico.*
Alaska Sea Grant Program.
- Taubenberger, J. K., Tsai, M. M., Atkin, T. J., Fanning, T. G., Krafft, A. E., Moeller, R., ... Lipscomb, T. P. (2000, January–February). Molecular Genetic Evidence of a Novel Morbillivirus in a Long-Finned Pilot Whale (*Globicephalus melas*). *Emerging Infectious Diseases*, 6(1), 42–45.
- Torres, A., Esquivel, C., & Ceballos, G. (1995, julio). Diversidad y conservación de los mamíferos marinos de México. *Revista Mexicana de Mastozoología*, 1, 22–43.
- Vaughan, T., Ryan, J. M., & Czaplewski, N. (2000). *Mammalogy* (Vol. 4th ed.). Saunders College Publishing, Fort Worth, Texas.
- Vavrek, M. J. (2011). Palaeoecological and palaeogeographical analysis tools. In *fossil* (p. 14:1T). Paleontología Electrónica.
- Vidakovic, B. (2011). *Statistics for bioengineering sciences*. Springer.
- West, K. L., Sanchez, S., Rotstein, D., Robertson, K. M., Dennison, S., Levine, G., ... Jensen, B. (2013, October). A Longman's beaked whale (*Indopacetus pacificus*) strands in Maui, Hawaii, with first case of morbillivirus in the central Pacific. *Marine Mammal Science*, 29(4), 767–776.
- Zacharias, M. A., & Roff, J. C. (2001). Use of focal species in marine conservation and management: a review and critique. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 11, 59–76.