



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

Evidencia de *Toxoplasma gondii* en el lobo marino de California (*Zalophus californianus*) de la Península de Baja California, México

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

JOSÉ OCTAVIO LÓPEZ FERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL

Irene Cruz Mendoza – FMVZ

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Gerardo Suzán Azpiri - FMVZ

Matilde Jiménez Coello – PMCPA (UADY)

México, D.F.

Octubre, 2015



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.

DEDICATORIA

A Sofía, un paso más en esta aventura que decidimos vivir juntos, gracias por estar siempre ahí y vamos por más.

A mis padres, por todo el esfuerzo y apoyo para lograr esta meta y por siempre creer en mí a pesar de la distancia.

AGRADECIMIENTOS

Al personal del Área de Protección de Flora y Fauna Islas del Golfo de California (APFF-IGC): Carlos Godínez, David Ramírez, Hugo, Rito, Joel y Lalo, sin quienes este proyecto en sus varias etapas de campo no hubiera sido posible, gracias por compartir su experiencia marítima, sus conocimientos, las comidas y las sonrisas. También gracias a los voluntarios que nos apoyaron en las salidas de campo: Vanessa, Erika, Jorge, Nathan y Mili.

A mis compañeras del proyecto PAPIIT IN229111: Liliana y Rosalía.

A Osvaldo Martínez (F5) por su invaluable ayuda y trasmisión de conocimientos para el manejo y la anestesia de los lobos marinos.

A Gerardo Suzán por su apoyo y confianza para realizar este proyecto.

A la Dra. Irene Cruz, por aceptar ser mi tutora, por su apoyo para todos los trámites y por su confianza.

Al personal del Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi” de la Universidad Autónoma de Yucatán en Mérida: Antonio Ortega, Karla Acosta, Eugenia Guzmán y en especial a la Dra. Matilde Jiménez por permitirme realizar las pruebas diagnósticas en las instalaciones de su laboratorio, brindarme su confianza y por compartir sus conocimientos en el área y a Ivonne, quien dedicó parte de su tiempo para asesorarme en las diferentes técnicas y por su apoyo en la realización del PCR.

A Antonio Gómez Ríos, por su invaluable ayuda y compañía en el laboratorio.

A mis ex-compañeros de laboratorio: Carlos, Alejandro, Lizbeth y Ana, por sus consejos y conocimientos del Toxo-mundo.

A CONACyT y al personal de posgrado de la FMVZ, UNAM.

Al DEFSAL por su apoyo para poder realizar el posgrado y seguir siendo parte del Departamento.

A mis amig@s, que siempre me apoyaron: Blanca, Adriana, Luisa, Laura, Marcela, Luis, Toño y Alejandro.

RESUMEN

México alberga un importante número de mamíferos marinos, de los cuales el lobo marino de California (*Zalophus californianus*) es la especie de pinnípedo de mayor distribución, considerándose prioritaria para la conservación y “centinela” de la salud del ecosistema marino. La aparición de enfermedades emergentes en mamíferos marinos es cada vez más frecuente, una de ellas es la toxoplasmosis, que ha causado importantes mortalidades en la nutria marina y varias especies de delfines, reflejando el grado de contaminación del ambiente marino con ooquistes del parásito. El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de *Toxoplasma gondii* en crías de lobo marino de California de la Península de Baja California por técnicas serológicas y moleculares. Se capturaron 216 individuos para toma de muestra de sangre en 10 loberas de reproducción, a ambos lados de la Península en un periodo de 4 años (2011-2014). La seroprevalencia por ELISA fue del 6%, siendo más alta en el Pacífico 21.6% que en el Golfo 2.8%. Para determinar la carga parasitaria se realizó una PCR en tiempo real (sólo para muestras de 2014 del Golfo), resultando el 11.9% positivos, con cargas parasitarias de 0.66 ± 0.253 , 1.42 ± 1.065 y 0.39 ± 0.111 parásitos/ml para las loberas de El Coloradito, El Partido y Los Machos respectivamente. Los resultados sugieren que las crías infectadas podrían tener anticuerpos propios por una pronta exposición o podrían provenir de la madre, ya sea transmitidos vía transplacentaria o por calostro, por lo que estarían actuando como indicadores de exposición de las madres al parásito. Las posibles causas de infección en los lobos marinos pudieran estar asociadas con la presencia de gatos ferales en algunas islas, el consumo de presas migratorias que pudieran mantener los ooquistes viables (peces y cefalópodos) o el arrastre de contaminación de las principales ciudades por las corrientes marinas. Este estudio constituye el primero que se realiza en México para el diagnóstico de *T. gondii* en las poblaciones silvestres de lobo marino de California y el primero que lo diagnostica por PCR en sangre en mamíferos marinos.

Palabras clave: *Toxoplasma gondii*, mamífero marino, *Zalophus californianus*, seroprevalencia, qPCR, México

ABSTRACT

Mexico has an important number of marine mammal species, being the California sea lion (*Zalophus californianus*) the most widely distributed pinniped specie in our territory. It is considered as a priority species for conservation and it's also a sentinel species for the ocean's health. Emerging diseases, like toxoplasmosis in marine mammals, cause several mortalities in sea otters and in many dolphin species, indicating serious contamination of the oceans of the world with oocysts from cat feces. The aim of this study was to determine the presence of *Toxoplasma gondii* in California sea lion pups from the Baja California Peninsula using serological and molecular techniques. 216 animals were captured and sampled, in 10 reproduction rookeries located both sides of the Peninsula in a 4-year period of time (2011-2014). The seroprevalence by ELISA was 6%, being higher for the Pacific (21.6%) than for the Gulf (2.8%). Real time PCR was performed (only for the 2014 Gulf samples) to determine the parasite load, resulting 11.9% positive with loads of 0.66 ± 0.253 , 1.42 ± 1.065 y 0.39 ± 0.111 parasites/ml for El Coloradito, El Partido and Los Machos rookeries respectively. Results suggest that the infected pups could have their own antibodies from an exposition in the early life or those could be transferred from their mothers by the placenta or the calostrum, so pups could be acting as indicators of their mother's exposure to *T. gondii*. The way sea lions acquire the infection is not clear, it could be related with the presence of feral cats in some of the islands, consumption of migratory preys that carry and maintain viable oocysts from nearshores to pelagic environments (fishes and cephalopods), or contamination runoff from the main coastal cities by the sea currents. This is the first report of *T. gondii* in free-ranging California sea lions from Mexico, and also the first report using blood PCR technique in a marine mammal.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, marine mammal, *Zalophus californianus*, seroprevalence, qPCR, Mexico

CONTENIDO

	Página
INTRODUCCIÓN	1
La Península de Baja California	1
El Golfo de California	1
Islas del Pacífico	3
El lobo marino de California (<i>Zalophus californianus</i>)	5
<i>Toxoplasma gondii</i>	12
Generalidades y ciclo de vida	12
Diagnóstico de <i>Toxoplasma gondii</i> en mamíferos marinos	14
<i>Toxoplasma gondii</i> en mamíferos marinos	19
Posibles fuentes de infección en el ambiente marino	27
Potencial zoonótico	29
<i>Toxoplasma gondii</i> en lobo marino de California	30
El lobo marino de California como especie centinela	33
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	38
HIPÓTESIS	40
OBJETIVO GENERAL	40
MATERIAL Y MÉTODOS	41
RESULTADOS	49
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES	63
REFERENCIAS	64
ANEXOS	78
Anexo 1 - ELISA indirecto	78
Anexo 2 - Extracción de DNA de sangre	79
Anexo 3 - Histopatología	80

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Loberas en la Región de las Grandes Islas y el Norte del Golfo de California	2
FIGURA 2. Macrolocalización de las islas del Pacífico	3
FIGURA 3. Ejemplar hembra de lobo marino de California en el Golfo de California	6
FIGURA 4. Distribución mundial de <i>Toxoplasma gondii</i> en mamíferos marinos	19
FIGURA 5. Posibles rutas de transmisión de <i>Toxoplasma gondii</i> en la nutria marina	27
FIGURA 6. Mapa indicando los lugares de los casos positivos a <i>T. gondii</i> en lobo marino de California	32
FIGURA 7. Mapa de la Península de Baja California donde se muestran las 10 loberas de reproducción donde se realizaron los muestreos de crías de lobo marino de California	42
FIGURA 8. Resultados de Western Blot de lobos marinos seropositivos por ELISA	50
FIGURA 9. Gráfica en la que se indican los lobos marinos positivos por alguna de las pruebas (serológica y molecular) y su relación con la presencia o ausencia de gatos en las loberas	52

LISTA DE CUADROS

CUADRO 1. Presas principales del lobo marino de California a lo largo de su distribución	9
CUADRO 2. Seroprevalencia histórica de <i>Toxoplasma gondii</i> en mamíferos marinos	20
CUADRO 3. Especies de mamíferos marinos en las que se han reportado hallazgos clínicos de <i>Toxoplasma gondii</i>	26
CUADRO 4. Muestras de sangre colectadas en la Península de Baja California (2011-2014)	44
CUADRO 5. Lobos marinos seropositivos en la Península de Baja California (2011-2014)	49
CUADRO 6. Análisis univariado de seroreactividad por ELISA en lobos marinos de la Península de Baja California	49
CUADRO 7. Lobos marinos del Golfo de California positivos por PCR del 2014	51
CUADRO 8. Localización, información general y carga parasitaria de los casos positivos a <i>T. gondii</i> por qPCR	51

INTRODUCCIÓN

La Península de Baja California

El Golfo de California

Es también conocido como Mar de Cortés o Mar Bermejo, tiene una importancia económica, natural y geopolítica para México. Internacionalmente se le reconoce como una región de alta especiación, de gran riqueza biológica y con un elevado número de endemismos. Su historia geológica se remonta hace 6 millones de años, cuando comenzó a separarse la península de Baja California del continente, lo que dio origen a un mar interior que se fue transformando hasta tomar la forma que tiene ahora, y que cuenta con aproximadamente 900 accidentes insulares (islas, islotes, rocas e isletas) (Mellink, 2001).

El territorio insular del Golfo de California representa ecosistemas con un notable aislamiento geográfico, con rarezas biológicas e importantes endemismos, por lo que son sitios estratégicos para la reproducción de tortugas marinas, aves marinas y mamíferos marinos, entre otros (Mellink, 2001). Muchas islas han sido reconocidas como Áreas de Importancia para la Conservación de Aves (AICA), debido a que en ellas se realizan la reproducción, anidación, descanso, alimentación o invernación de importantes poblaciones de aves migratorias y/o residentes (Arizmendi y Márquez, 2000).

El lobo marino de California (*Zalophus californianus*) encuentra en las islas el sustrato sólido para su reproducción, es el pinnípedo más abundante y de mayor distribución en costas mexicanas. Se le puede observar a lo largo de toda la costa occidental e islas de la Península de Baja California y en todo el Golfo de California, principalmente durante los meses de reproducción (Zavala, 1999; Godínez et al., 2006).

En la parte norte del Golfo de California, incluida la Región de las Grandes Islas, se conocen alrededor de 22 áreas de agrupación de lobos marinos o “loberas”, como se les conoce localmente. Once de ellas presentan actividad reproductiva y concentran al mayor número de animales del Golfo (Figura 1). Las loberas de reproducción del extremo norte son la isla San Jorge, las Rocas Consag y la isla El Coloradito. En la Región de las Grandes Islas, las loberas están en las islas Granito, Ángel de la Guarda (con dos loberas: Los Cantiles y Los Machos), San Esteban, San Pedro Mártir y San Pedro Nolasco, así como los islotes El Rasito y El Partido (Zavala, 1999).

El clima en la región es árido y muy extremoso, influenciado por la parte desértica de la península. Se presenta una alta radiación solar y poca precipitación pluvial, 60.5 mm al año, siendo los meses con mayor precipitación de julio a octubre. La temperatura media anual es de 22.7 °C, siendo enero y febrero los meses más fríos (<11 ° C) y julio y agosto los más calientes (>35 ° C) (Cabazos, 2008).



FIGURA 1. Loberas en la Región de las Grandes Islas y el Norte del Golfo de California (Tomado de Godínez et al., 2006)

Islas del Pacífico

El Pacífico de la península de Baja California está conformado por 16 islas principales (Figura 2), que son consideradas áreas críticas para la reproducción de 59 especies de aves, 39 de anfibios y reptiles, 18 de mamíferos terrestres y 4 de pinnípedos (Case et al., 2002).

Las aguas adyacentes a las islas de la región son también ricas en cuanto a productividad biológica, y de gran valor económico y social para el país. Las islas de la región son ricas en recursos pesqueros y son elementos clave para la soberanía del país. Además presentan un valor paisajístico único de naturaleza silvestre, con elementos estéticos naturales de gran valor para el ecoturismo. Por su extraordinario valor en términos de biodiversidad y productividad natural, la mayoría de estas islas están en proceso de ser decretadas áreas naturales protegidas (ANP). Las que ya forman parte de algún ANP son isla Guadalupe (Reserva de la Biosfera Isla Guadalupe) y las islas Natividad, San Roque y Asunción (Reserva de la Biosfera El Vizcaíno) (Samaniego et al., 2007).



FIGURA 2. Macrolocalización de las islas del Pacífico (Tomado de Samaniego et al., 2007)

A continuación se describen 3 de las islas del Pacífico en las que se tienen colonias de reproducción de lobo marino de California y son importantes para el presente estudio:

Isla Cedros

Se ubica frente al Desierto Central, municipio de Ensenada, Baja California. No se encuentra bajo alguna categoría de protección. Es una isla grande con una extensión de 34,827 ha y se encuentra poblada por aproximadamente 4500 habitantes. En ella habitan 3 especies de pinnípedos: elefante marino del norte (*Mirounga angustirostris*), foca común (*Phoca vitulina richardii*) y lobo marino de California, 14 especies de reptiles, 5 especies de mamíferos terrestres y anidan 17 especies de aves, entre las cuales se presentan algunos endemismos (Samaniego et al., 2007).

Isla Asunción

Se encuentra ubicada frente a la Punta Asunción, Municipio de Mulegé, Baja California Sur y forma parte de la Reserva de la Biósfera El Vizcaíno. Está conformada por un área de 43 ha y en ella habitan 3 especies de pinnípedos (elefante marino del norte, foca común y lobo marino de California) y anidan 10 especies de aves (Samaniego et al., 2007).

Isla Natividad

Ubicada frente a Punta Eugenia, Municipio de Mulegé, Baja California Sur y forma parte de la Reserva de la Biósfera El Vizcaíno. Está conformada por un área de 728 ha y habitada por al menos 200 personas. En ella habitan 3 especies de pinnípedos (elefante marino del norte, foca común y lobo marino de California), 2 especies de reptiles, una especie de ratón endémica y anidan 11 especies de aves (Samaniego et al., 2007).

El lobo marino de California (*Zalophus californianus*)

El término “pinnípedo” se refiere al grupo de mamíferos marinos del Orden Carnívora, que se distinguen por presentar miembros anteriores y posteriores en forma de aleta y un cuerpo fusiforme que facilita su desplazamiento en el agua (Tollu, 1986).

Las tres familias de pinnípedos: Otariidae, Odobenidae y Phocidae están distribuidas en aguas polares, subpolares y templadas. Existen 34 especies: 14 de otáridos (lobos marinos y lobos finos); 19 de fócidos (focas verdaderas) y una sola especie de odobénido (la morsa) (King, 1983).

Los otáridos están cubiertos por pelaje de mayor o menor espesor según las especie, tienen una capa de tejido adiposo subcutáneo y presentan pabellón auditivo externo, su estructura pélvica es móvil, lo que les permite apoyar las extremidades posteriores para desplazarse en tierra (Reindjers et al., 1994).

El lobo marino de California se distribuye a lo largo de las costas orientales del Pacífico Norte. Se han distinguido tres subespecies, una extinta que habitaba el mar de Japón (*Zalophus japonicus*), una que habita las Islas Galápagos (*Zalophus wollebacki*) y la subespecie que se reproduce a lo largo de la costa occidental de Norte América, desde las Islas Tres Marías en Puerto Vallarta, México hasta el Golfo de Alaska, así como dentro del Golfo de California (*Zalophus californianus*) (Mate y DeMaster, 1986; Aurióles y Trillmich, 2008).

Esta especie se caracteriza por tener un cuerpo robusto, un cuello alargado y un rostro estrecho. Las crías al nacer son de un color oscuro, casi negro mientras que los adultos varían de un café claro cuando están secos, hasta uno negro cuando están mojados. En México, las hembras son más claras que los machos (Figura 3) (Mate y DeMaster, 1986).

Los machos alcanzan una longitud de 2.4 m y un peso de aproximadamente 363 kg; mientras que las hembras miden alrededor de 1.5 m de largo, con un peso de

113 kg. Las crías nacen midiendo 80 cm y pesando 4.5-6 kg (Mate y DeMaster, 1986).

Los machos adultos se distinguen por la presencia de una cresta sagital que se desarrolla en el cráneo, la cual puede medir casi 4 cm de alto. Esta cresta comienza a crecer cuando los machos alcanzan los 5 años de edad y se desarrolla completamente cuando llegan a los 10 años (Orr et al., 1970). Algunos machos pueden presentar una coloración clara en el pelaje que cubre la cresta (King, 1983).



FIGURA 3. Ejemplar hembra de lobo marino de California en el Golfo de California

Es una especie costera, raramente distribuida más allá de los 16 km de la costa (King, 1983). Auriolles (1989) encontró que esta especie prefiere islas de tamaño pequeño-mediano, de 1 a 7 km de longitud máxima para su reproducción.

El lobo marino, como mamífero, es una especie vivípara y homeoterma, regularmente se le encuentra formando grupos pequeños de algunos cientos o incluso hasta miles en tierra (especie gregaria). Las hembras paren una cría después de un período de gestación de aproximadamente de 11 meses, más tres de implantación retardada. Tienen una sola cría por temporada. Las hembras son fértiles y capaces de iniciar su reproducción a partir de los 4 años de edad y

aproximadamente hasta los 14. La cría es destetada después de 1 año. El macho dominante defiende activamente su territorio acuático-terrestre y se aparea, preferentemente en tierra con las hembras que ya han parido y están en celo o con aquellas que no presentan cría y que están receptivas (Mate y DeMaster, 1986).

La esperanza de vida reportada para el Golfo de California es de 19 años para los machos y 25 años para las hembras (Aurioles y Trillmich, 2008).

Es una especie que no se caracteriza por realizar migraciones, sin embargo suele efectuar desplazamientos locales estacionales relacionados con la reproducción y la distribución de sus presas (Mate y DeMaster, 1986).

Le Boeuf et al. (1983) clasifican a los lobos marinos en machos adultos (los lobos más grandes de color café oscuro que presentan una cresta dorsal en la cabeza y que tienen cuellos anchos); machos subadultos (animales de menor tamaño, de color café oscuro, con cuellos angostos y un escaso desarrollo de la cresta sagital); hembras y jóvenes (individuos de tamaño pequeño, de color café claro, que presentan cuellos angostos), los jóvenes incluyen aquellos animales de 1-2 años de edad y quizá de 3 años de edad; los misceláneos comprenden a cualquier animal a excepción de las crías, que no se puede colocar dentro de una categoría o clase de edad debido a la alta densidad de animales en el área estudiada o a las malas condiciones ambientales al momento de realizar el censo; y las crías. Mate y DeMaster (1986) propusieron las siguientes categorías: crías, añeros, machos y hembras no reproductores, hembras adultas y machos adultos.

Cada hembra puede llegar a tener en promedio cuatro crías en un período de 5 años (Mate y DeMaster, 1986). Las hembras entran en estro dos semanas después de haber nacido sus crías. Generalmente solicitan la atención de los machos dominantes, frotando sus cuerpos contra el de ellos y haciendo movimientos sumisos. La cópula aparentemente termina cuando la hembra muerde el cuello del macho y lo aleja (Peterson y Bartholomew, 1967).

La temporada de reproducción y de nacimientos suele presentarse en los meses de mayo a junio. Los machos establecen sus territorios y las hembras copulan con el macho dominante que cuida el harem al que ellas pertenecen, después de 10 días de haber parido a sus crías. Las hembras maduras generalmente permanecen en la vecindad de las zonas de reproducción a lo largo de todo el año, al igual que algunos subadultos. Sin embargo, después de la época de reproducción, algunos machos adultos y subadultos se mueven hacia el norte, hasta la Columbia Británica, Canadá. Los números de una población fluctúan conforme los migrantes se mueven hacia el sur y al recibir algunos otros individuos que llegan de otras zonas para pasar el invierno (Mate y DeMaster, 1986).

Se le considera una especie de alimentación oportunista, se ha estimado que consume de 100,000-300,000 toneladas de especies marinas cada año, sin embargo su dieta varía considerablemente de un área a otra. Generalmente consumen presas de 10-30 cm de largo. Es una especie de hábitos nocturnos (Mate y DeMaster, 1986). Sánchez et al. (1992) reportaron la dieta del lobo en Isla Ángel de la Guarda, e Isla Granito, en el norte del Golfo de California, encontrando que las especies consumidas son: linternilla (*Diaphus sp.*), sable del Pacífico (*Trichiurus nitens*), merluza del Pacífico (*Merluccius productus*) y granadero carepala (*Coelorhynchus scaphopsis*). Barnes et al. (1992) reportaron también el consumo de pez conejo (*Caulolatilus affinis*). El estudio realizado por Espinosa de los Reyes (2007) indica que la mayor parte de las presas son peces y en menor porcentaje cefalópodos (Ver Cuadro 1).

CUADRO 1. Presas principales del lobo marino de California a lo largo de su distribución (Tomado de Espinosa de los Reyes, 2007)

PECES

Familia	Especie	Nombre común	Ambiente
Argentinidae	<i>Argentina sialis</i>	Argentina del Pacífico	Demersal
Aulopidae	<i>Aulopus bajacali</i>	Lagarto del Pacífico oriental	Demersal
Batrachoididae	<i>Porichthys sp.</i>	Pez sapo	Bentónico
Carangidae	<i>Trachurus symmetricus</i>	Charrito chicharo	Nerítico
Clupeidae	<i>Sardinops sagax caeruleus</i>	Sardina Monterrey	Nerítico
Cynoglossidae	<i>Symphurus sp.</i>	Lengua	Bentónico
Engraulidae	<i>Cetengraulis mysticetus</i>	Anchoveta bocona	Nerítico
Engraulidae	<i>Engraulis mordax</i>	Anchoveta del Norte	Nerítico
Haemulidae	<i>Haemulopsis leuciscus</i>	Ronco ruco	Demersal
Merlucciidae	<i>Merluccius angustimanus</i>	Merluza panameña	Demersal
Merlucciidae	<i>Merluccius productus</i>	Merluza del Pacífico	Nerítico
Paralichthyidae	<i>Citharichthys sp.</i>	Lenguado	Bentónico
Sciaenidae	<i>Cynoscion parvipinnis</i>	Corvina aleta corta	Demersal
Scombridae	<i>Scomber japonicus</i>	Macarela	Nerítico
Scorpaenidae	<i>Sebastes sp.</i>	Rocote	Demersal
Serranidae	<i>Pronotogrammus multifasciatus</i>	Serrano baga	Demersal
Serranidae	<i>Serranus aequidens</i>	Serrano de agua profunda	Demersal
Stromateidae	<i>Peprilus snyderi</i>	Palometa salema	Nerítico
Trichiuridae	<i>Trichiurus lepturus</i>	Sable del Atlántico	Nerítico
Uranoscopidae	<i>Kathetostoma averruncus</i>	Miralcielo bulldog	Bentónico

CEFALÓPODOS

Familia	Especie	Nombre común	Ambiente
Enoploteuthidae	<i>Abraliopsis affinis</i>	Calamar	Epipelágico
Loliginidae	<i>Loligo opalescens</i>	Calamar	Epipelágico
Octopodidae	<i>Octopus sp.</i>	Pulpo	Bentónico

Es un excelente nadador, llegando a alcanzar velocidades de hasta 24-32 km/hr, y cuando se le persigue, suele marsoppear en la superficie del agua. Ambos sexos son capaces de realizar buceos de 20 minutos de duración, sin embargo los buceos de 2 a 5 minutos de duración son los más frecuentes. Pueden llegar a bucear a profundidades de por lo menos 137 m (Mate y DeMaster, 1986).

Su población en México consiste en aproximadamente 24,062 y 31,159 individuos distribuidos en más de 30 islas e islotes en el Golfo de California (Szteren et al., 2006) y entre 75,000 y 87,000 individuos en la costa occidental de la península de Baja California (Lowry y Maravilla-Chávez, 2005). El 82 % de la población total del

Golfo de California se concentra en la región norte (Aurioles y Zavala, 1994). Estas islas e islotes albergan 21 colonias reproductoras y el resto son sitios de descanso (Aurioles y Zavala, 1994).

El clima puede llegar a afectar tanto el nacimiento como influir en la tasa de mortalidad de los lobos marinos de California. Durante las tormentas, las crías usualmente son alejadas de las colonias y se ahogan, pero aquellos eventos a mayor escala suelen afectar drásticamente en las poblaciones de esta especie. En 1982 y 1983, debido al fenómeno de El Niño, las aguas de la porción oriental del Pacífico se calentaron más de lo normal, alterando la abundancia y distribución de los peces disponibles para los lobos marinos. Como resultado, en 1982, la producción de crías disminuyó en un 20% en algunas colonias, mientras que en 1983, las hembras pasaron períodos prolongados lejos de las colonias buscando alimento, doblando así la tasa de mortalidad de las crías a comparación de años previos. Esto demuestra que los individuos y las poblaciones de lobos marinos de California responden a variaciones ambientales a gran escala. Durante aquellos períodos en los que hay un estrés ambiental, los animales en pobres condiciones, con baja grasa corporal y escasas reservas energéticas, son más susceptibles a sufrir enfermedades, aún más cuando compiten por territorios, cuando son destetadas las crías y durante la migración (Mate y DeMaster, 1986).

Aurioles (1987) reportó que debido al fenómeno de "El Niño" 1983, la colonia ubicada en Isla Santa Margarita, en la costa del Pacífico, experimentó una reducción de 71.3% de la población reproductora y la producción de crías disminuyó un 55%, con respecto a la media de otros años.

Los primeros habitantes de Baja California, Sonora y Sinaloa capturaban lobos marinos por su carne. Entre 1860 y 1870, los balleneros capturaron miles de lobos para obtener grasa y pieles. Posteriormente se les cazaba por sus vibrisas y genitales, los cuales eran vendidos a los orientales como afrodisiacos. La matanza local por aceite y carne continuó hasta inicios de la década de 1960, en algunas islas del Golfo como Ángel de la Guarda (Lluch, 1969). Algunos ejemplares se

siguen capturando actualmente, de manera ilegal, o bien, se les mata por la competencia de estos animales con algunas pesquerías. El impacto total de esta especie con las pesquerías del Golfo de California aún se desconoce debido a los pocos censos sistemáticos que se han llevado a cabo (Le Boeuf et al., 1983). El lobo marino es una especie que estuvo sujeta a la cacería, principalmente en las islas San Pedro Mártir, Ángel de la Guarda y San Lorenzo (INE-SEMARNAP, 2000).

Por otro lado, los cambios más evidentes que han sufrido las poblaciones de lobo marino de California son resultado directo de las actividades humanas. La explotación comercial durante el siglo XIX, principalmente a lo largo de la costa sur de California, fue indispensable para reducir drásticamente las poblaciones de este pinnípedo. Muchos animales fueron cazados para obtener de ellos su aceite y piel, así como para producir a partir de ellos alimento para perros. Cientos de animales fueron capturados para ser exhibidos en zoológicos y oceanarios de todo el mundo (Mate y DeMaster, 1986).

Actualmente el lobo marino de California compite con el humano por algunas especies de peces. Han ocasionado daños en las artes de pesca del lenguado, calamar, arenque y salmón. Durante el proceso pueden llegar a quedar atrapados en los equipos de pesca, ahogándose y muriendo. Para 1980 murieron alrededor de 1,500 animales en California. Muchos pescadores actualmente piensan que el incremento en el número de lobos marinos pone en riesgo la viabilidad comercial de muchas pesquerías (Mate y DeMaster, 1986).

Se encuentra catalogado en las siguientes categorías de riesgo:

- a) NOM-059-SEMARNAT-2010 (Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo):

(Pr) Sujeta a protección especial

- b) Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN):

(LC) Preocupación menor

Toxoplasma gondii

Generalidades y ciclo de vida

Toxoplasma gondii es un parásito protozoario intracelular obligado del Filo Apicomplexa capaz de infectar a todos los vertebrados de sangre caliente (mamíferos y aves), incluyendo al humano (Tenter et al., 2000).

El amplio rango de hospederos susceptibles hace de *T. gondii* un parásito muy exitoso, considerándose de distribución mundial. Se ha estimado que un tercio de la población humana mundial está infectada (Tenter et al., 2000).

El género *Toxoplasma* está conformado por una sola especie, que es *Toxoplasma gondii*, la cual presenta tres genotipos principales denominados tipo I, II y III (> 94% de los aislamientos) (Howe y Sibley, 1995; Saeij et al., 2005). Estos fueron clasificados de acuerdo a su virulencia en ratones, siendo el tipo I el más letal en el 100% de los ratones indistintamente de la dosis y los tipos II y III más benignos (Howe et al., 1997). El tipo II es el más común en la naturaleza y se ha aislado de una gran variedad de hospederos intermediarios, principalmente humanos y animales domésticos. (Howe et al., 1997; Dardé, 2004). Recientemente se han descubierto los genotipos X y A para mamíferos marinos, particularmente nutrias marinas (Miller et al., 2004; Sundar et al., 2008).

T. gondii tiene un ciclo de vida complejo que involucra a hospederos definitivos, que diseminan los ooquistes; y a hospederos intermediarios, que mantienen la fase crónica de quiste tisular del parásito (Tenter et al., 2000). Las tres fases infectantes de *T. gondii* son los ooquistes (que contienen esporozoitos), taquizoitos y bradizoitos (Dubey, 1998).

Hasta ahora, sólo los gatos domésticos y los felinos silvestres son considerados como hospederos definitivos y en ellos se lleva a cabo la fase sexual del ciclo de vida del parásito, produciendo millones de ooquistes infectantes que se diseminan en las heces (Tenter et al., 2000; Dubey, 2009).

Los hospederos son infectados a través del consumo de quistes tisulares que se encuentran en músculo, cerebro y otros órganos del hospedero intermediario; por el consumo de hospederos infectados con ooquistes; o por el consumo accidental de los ooquistes esporulados (provenientes de heces de gatos infectados) en el suelo, el agua, la vegetación, o por vía transplacentaria (Tenter et al., 2000).

El intervalo entre la ingestión del parásito por algún felino y la excreción de ooquistes puede ser de 2 a 3 días cuando los felinos han ingerido quistes tisulares en la carne de hospederos intermediarios. Los felinos infectados que activamente están diseminando ooquistes, normalmente no presentan signos clínicos de enfermedad y pueden excretar 100 millones de ooquistes infectantes en heces en un periodo de 10 a 14 días. Una vez presentes en el medio ambiente, los ooquistes se vuelven infectantes (esporulan) en 1 a 5 días y pueden permanecer viables por meses y años bajo óptimas condiciones de humedad y temperatura. Un solo ooquiste esporulado puede ser suficiente para causar la infección (Tenter et al., 2000; Dubey, 2009).

Los hospederos intermediarios pueden ser todos los animales de sangre caliente (Tenter et al., 2000). *T. gondii* presenta dos ciclos de reproducción asexual en los hospederos intermediarios (endodigenia y endopoligenia), los cuales se infectan por consumir otros hospederos intermediarios infectados u ooquistes. Una vez ingeridos, estos parásitos abandonan el tracto intestinal y se diferencian en taquizoitos, los cuales pueden invadir cualquier célula nucleada y se dividen por endodigenia, multiplicándose de manera rápida dentro de las células hasta destruirlas e invadir nuevas células. (Dubey, 1998; Tenter et al., 2000; Dubey, 2009). Ocasionalmente estas infecciones pueden ser fatales, especialmente para fetos, individuos inmunocomprometidos, o animales altamente susceptibles, como los marsupiales australianos y los primates del Nuevo Mundo (Miller, 2007).

Al desarrollarse la inmunidad del hospedero, la conversión rápida de taquizoitos se vuelve lenta y estos cambian de forma para diferenciarse en bradizoitos, que son menos activos y forman los quistes tisulares, principalmente en cerebro, médula

espinal, músculo esquelético y miocardio. Los quistes tisulares pueden permanecer de por vida en el hospedero y la infección se vuelve crónica (Dubey, 1998; Tenter et al., 2000). Cuando hay inmunosupresión del hospedero con infección crónica, puede ocurrir una reactivación de la infección activa, con el desarrollo de taquizoitos que invadirán nuevamente tejidos de animales y humanos (Tenter et al., 2000).

Los quistes tisulares (bradizoitos) pueden sobrevivir a la digestión gástrica (pepsina) en comparación con los taquizoitos que son destruidos (Dubey, 1998) y son capaces de infectar al depredador del hospedero intermediario, que si es un felino, por ciclos sexuales producirá ooquistes, completando el ciclo. El consumo de los hospederos intermediarios por otro hospedero intermediario resulta nuevamente en la formación de nuevos quistes tisulares (Tenter et al., 2000).

Ambos hospederos se pueden infectar de manera horizontal por la ingestión de ooquistes o quistes tisulares y de manera vertical durante la gestación (Tenter et al., 2000).

Diagnóstico de Toxoplasma gondii en mamíferos marinos

Se realiza mediante métodos biológicos, serológicos, moleculares e histológicos, o por la combinación de éstos. Los signos clínicos de toxoplasmosis no son específicos y no se pueden utilizar para realizar un diagnóstico definitivo (Dubey, 2010).

Biológicos

Son los cultivos celulares y los bioensayos en animales, los cuales se utilizan para el aislamiento de *T.gondii* o para mantener organismos viables de manera indefinida en el laboratorio. Requiere la colección de tejido fresco y estéril de animales infectados, como sistema nervioso central, corazón y músculo esquelético. El tejido es picado, digerido parcialmente con enzimas y colocado en células vivas no infectadas. Los protozoarios viables presentes en el tejido infectaran las células cultivadas y se mantendrán en el laboratorio de manera indefinida. Asimismo

preparaciones similares de tejido se pueden inocular en ratones de laboratorio (Dubey et al., 2003; Miller, 2007).

Serológicos

Debido a la permanencia a largo plazo o de por vida de los quistes tisulares, la detección de anticuerpos es sugerente de infección por *T. gondii*. Una prueba positiva en serología no es sinónimo de la enfermedad, aunque se han encontrado altos títulos de anticuerpos en animales clínicamente enfermos, como es el caso de la nutria marina, especie considerada de alto riesgo (Miller, 2007).

Las pruebas serológicas para parásitos Apicomplexa pueden ser de tres tipos principales: pruebas de aglutinación, pruebas de fluorescencia y el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas o inmunoensayo en formato de placa (ELISA, por sus siglas en inglés) (Miller, 2007).

Las pruebas de aglutinación más comúnmente usadas para el diagnóstico infecciones protozoarias son la aglutinación directa (DAT por sus siglas en inglés), aglutinación modificada (MAT, por sus siglas en inglés) y la aglutinación en látex (LAT, por sus siglas en inglés). Estas pruebas comparten tres excelentes atributos: accesibilidad (en colaboración o comercial), fáciles de usar y uso para especies para las que no existe un anticuerpo especie-específico. La prueba más utilizada para el diagnóstico de *T. gondii* en mamíferos marinos es MAT, pero no ha sido validada para estos animales, sólo en cerdos (Dubey et al., 2003; Miller, 2007). Se sabe que MAT puede dar falsos positivos con muestras hemolizadas a diferencia de IFAT (Packham et al., 1998).

Las pruebas de fluorescencia indirecta de anticuerpos (IFAT, por sus siglas en inglés) se han usado para diagnosticar la exposición a *T. gondii* y *Sarcocystis neurona* en focas, lobos marinos y nutrias marinas. Además, es una prueba diagnóstica que se ha validado para el diagnóstico de *T. gondii* en nutrias marinas (Miller et al., 2002a; Hanni et al., 2003; Conrad et al., 2005). Debido al sistema basado en la fluorescencia, esta prueba es mínimamente susceptible al error

asociado a la hemólisis y detritus celulares. Sin embargo, son pruebas costosas, de labor intensiva y cualitativas en gran medida para interpretar los resultados en comparación de los ELISA o las pruebas de aglutinación, requiriendo una rigurosa estandarización e interpretación (Miller et al., 2002a; Miller, 2007).

Para el IFAT, la especificidad depende de un conjugado especie-específico y al no existir para especies silvestres se han utilizado conjugados comerciales para especies domésticas con las que comparten antecedentes filogenéticos, por ejemplo: para la nutria marina se ha empleado conjugado anti-IgG de hurón, que también es un mustélido (Miller et al., 2002a) y para la foca común del Pacífico se ha usado el conjugado anti-IgG de perro (Miller et al., 2001). El inconveniente del IFAT es que la interpretación puede ser subjetiva, ya que depende de alguien que lea cambios en el color, lo cual es difícil de estandarizar y generalmente tiene que ser el mismo lector el que interprete todas las pruebas.

Los ELISA's son eficientes para un diagnóstico rápido y para múltiples muestras, ya que demuestran alta sensibilidad y especificidad. Al igual que las pruebas de aglutinación, puede tener problemas con la sensibilidad y la especificidad cuando se usan para evaluar sueros hemolizados y con detritus celulares.

La serología por ELISA es comúnmente empleada para el diagnóstico de *T. gondii* en humanos y animales domésticos, debido a que es fácil de realizar (estandarizada en kits de diagnóstico), los reactivos son relativamente fáciles de conseguir, es repetible y la interpretación de resultados es cuantificable y automatizada (Zhang et al., 2010). Sin embargo, al igual que IFAT requiere de un conjugado especie-específico no disponible comercialmente.

El ELISA ha sido una técnica poco utilizada para el diagnóstico de *T. gondii* en mamíferos marinos, pero ha presentado resultados muy similares al MAT, DAT y LAT cuando se han realizado comparaciones en delfines (Dubey et al., 2005; Omata et al., 2005). Al requerir de un conjugado (anticuerpo secundario especie-específico para detectar las inmunoglobulinas), no disponible, se han utilizado como alternativa

proteínas de bacterias con capacidad específica para unir inmunoglobulinas, como la proteína G (producida por *Streptococcus* spp.), que se ha usado para el diagnóstico de *T. gondii* en varias especies de focas en Japón (Fujii et al., 2007); la proteína A (producida por *Staphylococcus aureus*) usada en osos polares en Canadá (Philippa et al., 2004); y la quimera de proteínas A/G propuesta para diagnóstico de toxoplasmosis multi-especie por Schaefer et al. (2012) y probada en el desarrollo de un kit comercial de ELISA multi-especie (ID Screen®, IDvet Innovative Diagnostics) con marsopas comunes en Groenlandia (Blanchet et al., 2014).

En mamíferos marinos sólo existen conjugados comerciales anti-IgG de delfines nariz de botella (Laboratorios Bethyl®, Montgomery, Texas), esto debido a que la industria de los delfinarios ha sido una de las más económicamente productivas a nivel mundial. Recientemente, Bernal-Guadarrama et al. (2014) han desarrollado su propio conjugado específico anti-IgG de delfín para poder emplear en el diagnóstico de *T. gondii* y otras enfermedades infecciosas de los cetáceos.

Una mala interpretación de los resultados puede ocurrir cuando las pruebas no han sido validadas para la especie en cuestión. En lo posible es mejor corroborar los resultados obtenidos por serología con otras pruebas diferentes (Miller, 2007). El Western Blot se ha utilizado para la confirmación de infecciones protozoarias como *Sarcocystis neurona* en foca común (Lapointe et al., 1998) y puede proveer un grado fino de discriminación de la reactividad serológica, es decir, funciona a manera de prueba confirmatoria para detectar la presencia de anticuerpos específicos anti-*T. gondii*, pero el inconveniente es que son pruebas más laboriosas para realizar y de costo elevado (Miller, 2007).

Moleculares

Para la detección de DNA de *T. gondii* se utiliza ampliamente tanto el formato de PCR en punto final (en combinación con la variante denominada anidada o PCR-nested), así como la variante cuantitativa (qPCR), esta última ha demostrado tener

la capacidad de detectar DNA de un solo taquizoito y permite, además de detectar la presencia, también cuantificar la concentración del DNA del protozooario presente en la muestra analizada, ya sea a partir de sangre y tejido (para los hospederos intermediarios) o también de heces (para los hospederos definitivos). Existen diferentes marcadores genéticos, pero el gen B1 con 35 copias y un fragmento de DNA de *T. gondii* de 529 pb con 300 copias son los más frecuentemente usados. La contaminación cruzada es un factor importante a considerar, por lo que deben extremarse cuidados y precauciones durante el procesamiento de la purificación y análisis de las muestras, a fin de obtener resultados fidedignos que reflejen información veraz de las poblaciones analizadas (Dubey, 2010).

La secuenciación y genotipificación se recomiendan cuando sea posible tener grandes cantidades del parásito, para asegurar la interpretación correcta de las bandas amplificadas de DNA y así evitar perder el descubrimiento de nuevos parásitos. La identificación de los genotipos permite establecer relaciones entre la infección y la presentación clínica en las especies marinas, haciendo posible rastrear en un momento dado las posibles fuentes de contaminación por ooquistes en el ambiente (Cole et al., 2000; Miller et al., 2004; Conrad et al., 2005). Si existe un ciclo marino para *T. gondii*, la comparación de frecuencias de los genotipos entre animales terrestres y marinos podría confirmar la existencia de genotipos únicos en el ambiente marino (Miller, 2007).

Histológicos

Consiste en la examinación al microscopio de tejidos removidos por biopsia u obtenidos a la necropsia. Es una técnica de diagnóstico rápido en la que las improntas de tejidos son teñidos con Giemsa y en la que se pueden observar las lesiones y al protozooario. La inmunohistoquímica (IHC, por sus siglas en inglés) ayuda a confirmar el diagnóstico histopatológico en pocas horas, el encontrar taquizoitos es indicador de infección activa y el encontrar quistes tisulares indica infección crónica. Para la IHC se prefieren los anticuerpos policlonales a los monoclonales (Dubey, 2010).

***Toxoplasma gondii* en mamíferos marinos**

T. gondii es una de las principales coccidias formadoras de quistes tisulares reportadas en mamíferos marinos, junto con *Sarcocystis neurona* y *Neospora caninum* (Dubey et al., 2003; Miller, 2007).

Los primeros reportes de infección por *T. gondii* en mamíferos marinos ocurrieron en pinnípedos. Ratcliffe y Worth (1951) reportaron la infección como causa de muerte en una cría de lobo marino de California que murió a los 10 días de edad en el zoológico de Philadelphia, EUA; por su parte, Van Pelt y Dieterich (1973) documentaron la presencia del parásito en el hígado de una cría de foca común en Alaska que murió de una infección de *Staphylococcus aureus* a los 23 días de nacida y que provenía de vida libre; y finalmente, Migaki et al. (1977) reportaron un caso de toxoplasmosis diseminada en un lobo marino de California de la Universidad de Hawaii, que presentaba lesiones necróticas en corazón y estómago. Desde entonces, *T. gondii* ha sido documentado en numerosas especies de mamíferos marinos silvestres y en cautiverio de América, Europa, Asia y Oceanía (Figura 4). Sin embargo, teniendo el conocimiento de la distribución mundial de *T. gondii* y de los felinos como sus hospederos definitivos, se puede asumir que los mamíferos marinos de otras regiones también están expuestos (Miller, 2007; Dubey, 2010).

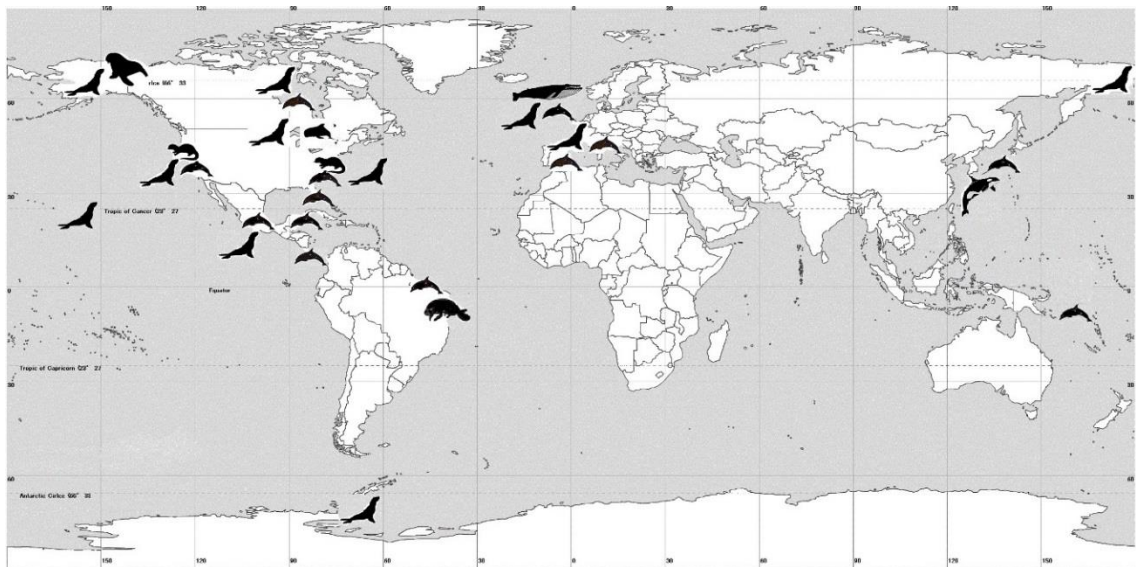


FIGURA 4. Distribución mundial de *Toxoplasma gondii* en mamíferos marinos

Se ha reportado la exposición a *T. gondii* en una amplia variedad de mamíferos marinos, incluyendo mustélidos, úrsidos, pinnípedos, cetáceos y sirénidos (Miller, 2007; Dubey, 2010) (Ver Cuadro 2).

CUADRO 2. Seroprevalencia histórica de *Toxoplasma gondii* en mamíferos marinos. Tomado, modificado y actualizado de Miller (2007) y Dubey (2010)

MAT: Aglutinación modificada, LAT: Aglutinación en látex, DAT: Aglutinación directa, IHAT: Hemaglutinación indirecta, IFAT: Fluorescencia indirecta de anticuerpos, DT: Sabin-Feldman Dye test, ELISA: Ensayo inmunoenzimático

MUSTÉLIDOS											
Especie	Ubicación	Silvestre o Cautiverio	Vivo o Muerto	No. de Muestras	(+)	% (+)	Prueba	Títulos	Referencia	Año	
Nutria marina del sur (<i>Enhydra lutris nereis</i>)	Estados Unidos	S	M	77	47	61	IFAT	≥ 1:320	Miller <i>et al.</i>	2002a	
	Estados Unidos	S	M	80	29	36	IFAT	≥ 1:320	Miller <i>et al.</i>	2002a	
	Estados Unidos	S	M	100	82	82	MAT	≥ 1:25	Dubey <i>et al.</i>	2003	
	Estados Unidos	S	M	25	13	52	MAT	≥ 1:25	Sundar <i>et al.</i>	2008	
	Estados Unidos	S	M	1	1	100	IFAT	≥ 1:320	Miller <i>et al.</i>	2008	
	Estados Unidos	S	V	77	27	35	IFAT	≥ 1:320	Hanni <i>et al.</i>	2003	
	Estados Unidos	S	M-V	33	9	27	IFAT	≥ 1:320	Hanni <i>et al.</i>	2003	
	Estados Unidos	S	V	257	98	38	IFAT	≥ 1:320	Conrad <i>et al.</i>	2005	
	Estados Unidos	S	M	305	159	52	IFAT	≥ 1:320	Conrad <i>et al.</i>	2005	
	Estados Unidos	S	M	33			IFAT	≥ 1:320	Miller <i>et al.</i>	2004	
	Estados Unidos	S	M	107	66	62	IFAT	≥ 1:320	Miller <i>et al.</i>	2002b	
	Estados Unidos	S	V	116	49	42	IFAT	≥ 1:320	Miller <i>et al.</i>	2002b	
	Estados Unidos	S	M	92	59	64	IFAT	≥ 1:320	Kreuder <i>et al.</i>	2005	
Total				1303	639	49					
Nutria marina del norte (<i>Enhydra lutris kenyoni</i>)	Estados Unidos	S	V	21	8	38	IFAT	≥ 1:320	Miller <i>et al.</i>	2002a	
	Estados Unidos	S	V	65	0	0	IFAT	≥ 1:320	Miller <i>et al.</i>	2002a	
	Estados Unidos	S	M	15	7	47	MAT	≥ 1:25	Dubey <i>et al.</i>	2003	
	Estados Unidos	S	V	30	18	60	MAT	≥ 1:25	Dubey <i>et al.</i>	2003	
	Estados Unidos	S	M	10	10	100	MAT	≥ 1:25	Sundar <i>et al.</i>	2008	
	Estados Unidos	S	V	65	0	0	IFAT	≥ 1:320	Hanni <i>et al.</i>	2003	
Total				206	43	21					
Nutria de río (<i>Lontra longicaudis</i>)	México	C	V	1	1	100	MAT	≥ 1:25	Alvarado-Esquivel <i>et al.</i>	2013	
Nutria de Canadá (<i>Lontra canadensis</i>)	Estados Unidos	S	V	103	46	45	LAT	≥ 1:16	Tocidowski <i>et al.</i>	1997	
	Estados Unidos	S	V	40	7	18	IFAT	≥ 1:320	Gaydos <i>et al.</i>	2007	
Total				143	53	37					
Nutria europea (<i>Lutra lutra</i>)	Reino Unido	S	M	271	108	40	DT	< 2 IU ml (1/8)	Chadwick <i>et al.</i>	2013	
	España	S	M	6	6	100	MAT	≥ 1:25	Sobrino <i>et al.</i>	2007	
Total				277	114	41					

ÚRSIDOS											
Especie	Ubicación	Silvestre o Cautiverio	Vivo o Muerto	No. de Muestras	(+)	% (+)	Prueba	Títulos	Referencia	Año	
Oso Polar (<i>Ursus maritimus</i>)	Rusia	S	V	109	9	8	LAT	≥ 1:64	Rah <i>et al.</i>	2005	
	Estados Unidos y Canadá	S	V	389	21	5	LAT	≥ 1:64	Rah <i>et al.</i>	2005	
	México	C	V	1	1	100	MAT	≥ 1:25	Alvarado-Esquivel <i>et al.</i>	2013	
	Noruega	S	V	228	104	46	DAT	≥ 1:40	Jensen <i>et al.</i>	2010	
	Noruega	S	V	419	86	21	MAT	≥ 1:25	Oksanen <i>et al.</i>	2009	
	Groenlandia	S	M	108	12	11	MAT	≥ 1:25	Oksanen <i>et al.</i>	2009	
	República Checa	C	V	1	1	100	IFAT	≥ 1:40	Sedlák y Bártová	2006	
	Canadá	S	V	60	0	0	ELISA		Phillippa <i>et al.</i>	2004	
	Estados Unidos	S	V	136	18	13	LAT	> 1:16	Kirk <i>et al.</i>	2010	
Total				1451	252	17					

PINNÍPEDOS										
ODOBÉNIDOS										
Especie	Ubicación	Silvestre o Cautiverio	Vivo o Muerto	No. de Muestras	(+)	% (+)	Prueba	Títulos	Referencia	Año
Morsa (<i>Odobenus rosmarus</i>)	Estados Unidos	S	V	53	3	6	MAT	≥ 1:25	Dubey et al.	2003
	Canadá	C	M	1	0	0	MAT	≥ 1:25	Dubey et al.	2009
	Total			54	3	6				
OTÁRIDOS										
Especie	Ubicación	Silvestre o Cautiverio	Vivo o Muerto	No. de Muestras	(+)	% (+)	Prueba	Títulos	Referencia	Año
Lobo marino de California (<i>Zalophus californianus</i>)	Estados Unidos	S	V	27	8	30	MAT	≥ 1:25	Dubey et al.	2003
	Estados Unidos	C	V	18	11	61	MAT	≥ 1:25	Dubey et al.	2003
	Estados Unidos	C	M-V	4	3	75	MAT	≥ 1:25	Dubey et al.	2003
	México	C	V	4	2	50	MAT	≥ 1:25	Alvarado-Esquivel et al.	2012
	México	C	V	1	1	100	MAT	≥ 1:25	Alvarado-Esquivel et al.	2013
	Estados Unidos	S	M-V	1630	46	3	IFAT	≥ 1:640	Carlson-Bremer et al.	2015
Total			1684	71	4					
León marino Sudamericano (<i>Otaria bryonia</i>)	República Checa	C	V	2	0	0	IFAT	≥ 1:40	Sedlák y Bártošová	2006
	México	C	V	2	0	0	MAT	≥ 1:25	Alvarado-Esquivel et al.	2012
	Chile	S	M	2	1	50	LAT		Sepúlveda et al.	2015
Total			6	1	17					
Lobo marino antártico (<i>Arctocephalus gazella</i>)	Antártida	S	V	165	4	2	DAT	≥ 1:25	Rengifo-Herrera et al.	2012
León marino de Steller (<i>Eumetopias jubatus</i>)	Rusia	S	V	189	26	14	ELISA		Alekseev et al.	2008
Lobo marino australiano (<i>Arctocephalus pusillus doriferus</i>)	Australia	S	V	104	0	0	MAT	≥ 64	Lynch et al.	2011
FÓCIDOS										
Especie	Ubicación	Silvestre o Cautiverio	Vivo o Muerto	No. de Muestras	(+)	% (+)	Prueba	Títulos	Referencia	Año
Foca común del Pacífico (<i>Phoca vitulina richardii</i>)	Estados Unidos	S	V	311	51	16	MAT	≥ 1:25	Dubey et al.	2003
	Estados Unidos	S	V	380	29	8	MAT	≥ 1:25	Lambourn et al.	2001
	Estados Unidos	S	M	1	1	100	IFAT		Miller et al.	2001
	Estados Unidos	S	V	75	6	8	IFAT	≥ 1:160	Greig et al.	2014
	Estados Unidos	S	V	97	7	7	IFAT	≥ 1:160	Greig et al.	2014
	Estados Unidos	S	M-V	111	1	1	IFAT	≥ 1:160	Greig et al.	2014
Total			975	95	10					
Foca común del Atlántico (<i>Phoca vitulina concolor</i>)	Canadá	S	M-V	34	3	9	MAT	≥ 1:25	Measures et al.	2004
	Canadá	S	M	9	2	22	DAT	≥ 1:40	Simon et al.	2011
Total			43	5	12					
Foca común del noreste Atlántico (<i>Phoca vitulina vitulina</i>)	Reino Unido	S	V	56	3	5	MAT	≥ 1:25	Gabezón et al.	2011
	Noruega	S	V	120	0	0	DAT	≥ 1:40	Jensen et al.	2010
Total			176	3	2					
Foca común de Kuril (<i>Phoca vitulina stejnegeri</i>)	Japón	S	M-V	322	3	1	ELISA	> 0.1 OD	Fuji et al.	2007
Foca ocelada (<i>Pusa hispida</i>)	Estados Unidos	S	V	32	5	16	MAT	≥ 1:25	Dubey et al.	2003
	Canadá	S	M	788	80	10	DAT	≥ 1:40	Simon et al.	2011
	Noruega	S	M	48	0	0	MAT	≥ 1:40	Oksanen et al.	1998
	Noruega	S	M	262	49	19	DAT	≥ 1:40	Jensen et al.	2010
Total			1130	134	12					
Foca barbuda (<i>Erignathus barbatus</i>)	Estados Unidos	S	V	8	4	50	MAT	≥ 1:25	Dubey et al.	2003
	Canadá	S	M	20	2	10	DAT	≥ 1:40	Simon et al.	2011
	Noruega	S	M-V	80	10	13	DAT	≥ 1:40	Jensen et al.	2010
	Japón	S	M	1	0	0	ELISA	> 0.1 OD	Fuji et al.	2007
Total			109	16	15					
Foca moteada (<i>Phoca largha</i>)	Estados Unidos	S	V	9	1	11	MAT	≥ 1:25	Dubey et al.	2003
	Japón	S	M-V	46	0	0	ELISA	> 0.1 OD	Fuji et al.	2007
Total			55	1	2					
Foca listada (<i>Hydrophoca fasciata</i>)	Estados Unidos	S	V	14	0	0	MAT	≥ 1:25	Dubey et al.	2003
	Japón	S	M	4	0	0	ELISA	> 0.1 OD	Fuji et al.	2007
Total			18	0	0					
Foca fraile de Hawaii (<i>Neomonachus schauinslandi</i>)	Estados Unidos	S	V	117	2	2	MAT	≥ 1:25	Aguirre et al.	2007
	Estados Unidos	S	M	1	1	100	MAT	≥ 1:25	Honnold et al.	2005
Total			118	3	3					
Foca pia (<i>Pagophilus groenlandicus</i>)	Canadá	S	M-V	112	0	0	MAT	≥ 1:25	Measures et al.	2004
	Noruega	S	M	316	0	0	MAT	≥ 1:40	Oksanen et al.	1998
Total			428	0	0					
Foca de casco (<i>Cystophora cristata</i>)	Canadá	S	M-V	60	1	2	MAT	≥ 1:25	Measures et al.	2004
	Noruega	S	M	79	0	0	MAT	≥ 1:40	Oksanen et al.	1998
Total			139	1	1					
Foca gris (<i>Halichoerus grypus</i>)	Canadá	S	M-V	122	11	9	MAT	≥ 1:25	Measures et al.	2004
	Reino Unido	S	V	32	7	22	MAT	≥ 1:25	Gabezón et al.	2011
	Francia	S	V	15	4	27	MAT	≥ 1:25	Gabezón et al.	2011
	Canadá	S-C	V-M	8	4	50	MAT	≥ 1:40	Gajadhar et al.	2004
Total			177	26	15					
Foca de Weddell (<i>Leptonychotes weddellii</i>)	Antártida	S	V	31	13	42	DAT	≥ 1:25	Rengifo-Herrera et al.	2012
Foca cangrejera (<i>Lobodon carcinophaga</i>)	Antártida	S	V	2	1	50	DAT	≥ 1:25	Rengifo-Herrera et al.	2012
Elefante marino del sur (<i>Mirounga leonina</i>)	Antártida	S	V	13	10	77	DAT	≥ 1:25	Rengifo-Herrera et al.	2012

CETÁCEOS										
ODONTOCETOS										
Especie	Ubicación	Silvestre o Cautiverio	Vivo o Muerto	No. de Muestras	(+)	% (+)	Prueba	Títulos	Referencia	Año
Delfín nariz de botella del Atlántico (<i>Tursiops truncatus</i>)	Estados Unidos	C	V	94	91	97	MAT	≥ 1:25	Dubey et al.	2003
	Estados Unidos	S	V	47	47	100	MAT	≥ 1:25	Dubey et al.	2003
	Estados Unidos	S	V	36	36	100	MAT	≥ 1:25	Dubey et al.	2005
	Estados Unidos	S	V	24	24	100	MAT	≥ 1:25	Dubey et al.	2005
	Estados Unidos	S	V	86	86	100	MAT	≥ 1:25	Dubey et al.	2005
	Estados Unidos	S	M	49	26	53	MAT	≥ 1:25	Dubey et al.	2008
	Canadá	C	M-V	8	8	100	MAT	≥ 1:25	Dubey et al.	2009
	Japón	S-C	V	40	6	15	LAT, IHAT	≥ 1:64 y ≥ 1:640	Murata et al.	2004
	España	S	M	7	4	57	MAT	≥ 1:25	Cabezón et al.	2004
	Reino Unido	S	M	1	0	0	DT	≥ 2 IU mL ⁻¹	Forman et al.	2009
	México	C	V	63	55	87	MAT	≥ 1:25	Alvarado-Esquivel et al.	2012
	Italia	S	M	3	2	67	MAT	≥ 1:20	Pretti et al.	2010
	España	C	V	9	0	0	IIF	≥ 1:160	Bernal-Guadarrama et al.	2014
	España	C	V	15	2	13	IIF	≥ 1:160	Bernal-Guadarrama et al.	2014
	Italia	S	M	1	1	100	MAT		Di Guardo et al.	2013
				Total	483	388	80			
Delfín nariz de botella del Pacífico (<i>Tursiops truncatus gilli</i>)	México	C	V	3	3	100	MAT	≥ 1:25	Alvarado-Esquivel et al.	2012
Delfín del Mar Negro (<i>Tursiops truncatus ponticus</i>)	Rusia	S	V	74	39	53	ELISA		Alekseev et al.	2009
	Rusia	C	V	57	27	47	ELISA		Alekseev et al.	2007
					Total	131	66	50		
Delfín del Indo-Pacífico (<i>Tursiops aduncus</i>)	Islas Salomón	S	V	58	8	14	LAT, ELISA	≥ 1:64 y ≥ 1:160	Omata et al.	2005
Delfín listado (<i>Stenella coeruleoalba</i>)	España	S	M	36	4	11	MAT	≥ 1:25	Cabezón et al.	2004
	Reino Unido	S	M	5	0	0	DT	≥ 2 IU mL ⁻¹	Forman et al.	2009
	Costa Rica	S	M	1	1	100	MAT	≥ 1:25	Dubey et al.	2007
	Italia	S	M	1	1	100	MAT	≥ 1:20	Pretti et al.	2010
	Italia	S	M	8	4	50	IFAT	≥ 1:40	Di Guardo et al.	2010
	Italia	S	M	2	1	50	MAT		Di Guardo et al.	2013
				Total	53	11	21			
Delfín común (<i>Delphinus delphis</i>)	España	S	M	4	2	50	MAT	≥ 1:25	Cabezón et al.	2004
	Reino Unido	S	M	21	6	29	DT	≥ 2 IU mL ⁻¹	Forman et al.	2009
					Total	25	8	32		
Delfín de costados blancos del Pacífico (<i>Lagenorhynchus obliquidens</i>)	Japón	S-C	V	5	0	0	LAT, IHAT	≥ 1:64 y ≥ 1:640	Murata et al.	2004
Delfín de costados blancos del Atlántico (<i>Lagenorhynchus acutus</i>)	Reino Unido	S	M	1	0	0	DT	≥ 2 IU mL ⁻¹	Forman et al.	2009
Delfín de Risso (<i>Grampus griseus</i>)	España	S	M	9	0	0	MAT	≥ 1:25	Cabezón et al.	2004
	Reino Unido	S	M	1	0	0	DT	≥ 2 IU mL ⁻¹	Forman et al.	2009
					Total	10	0	0		
Delfín blanco de China (<i>Sousa chinensis</i>)	Australia	S	M	1	1	100	IHAT	1:2560	Bowater et al.	2003
Delfín rosado del Amazonas (<i>Inia geoffrensis</i>)	Brasil	S	V	95	82	86	MAT	≥ 1:25	Santos et al.	2011
Marsopa común (<i>Phocoena phocaena</i>)	España	S	M	1	1	100	MAT	≥ 1:25	Cabezón et al.	2004
	Reino Unido	S	M	70	1	1	DT	≥ 2 IU mL ⁻¹	Forman et al.	2009
	Groenlandia	S	M	20	0	0	DAT, ELISA	≥ 1:40	Blanchet et al.	2014
					Total	91	2	2		
Calderón común (<i>Globicephala melas</i>)	España	S	M	1	0	0	MAT	≥ 1:25	Cabezón et al.	2004
Falsa orca (<i>Pseudorca crassidens</i>)	Japón	S-C	V	6	0	0	LAT, IHAT	≥ 1:64 y ≥ 1:640	Murata et al.	2004
Orca (<i>Orcinus orca</i>)	Japón	S-C	V	6	1	17	LAT, IHAT	≥ 1:64 y ≥ 1:640	Murata et al.	2004
	Japón	S	M	9	0	0	LAT	≥ 1:64	Omata et al.	2006
					Total	15	1	7		
Beluga (<i>Delphinapterus leucas</i>)	Canadá	S	M	22	6	27	MAT	≥ 1:25	Mikaelian et al.	2000
	Estados Unidos	C	V	3	0	0	MAT	≥ 1:25	Dubey et al.	2003
	Rusia	S	V	147	7	5	ELISA		Alekseev et al.	2009
	Noruega	S	V	12	0	0	DAT	≥ 1:40	Jensen et al.	2010
					Total	184	13	7		
Narval (<i>Monodon monoceros</i>)	Noruega	S	V	2	0	0	DAT	≥ 1:40	Jensen et al.	2010
Ballena de Cuvier (<i>Ziphius cavirostris</i>)	Reino Unido	S	M	1	0	0	DT	≥ 2 IU mL ⁻¹	Forman et al.	2009
MISTICETOS										
Especie	Ubicación	Silvestre o Cautiverio	Vivo o Muerto	No. de Muestras	(+)	% (+)	Prueba	Títulos	Referencia	Año
Ballena jorobada (<i>Megaptera novaeangliae</i>)	Reino Unido	S	M	1	1	100	DT	≥ 2 IU mL ⁻¹	Forman et al.	2009
Ballena de Minke (<i>Balaenoptera acutorostrata</i>)	Noruega	S	M	202	0	0	MAT	≥ 1:40	Oksanen et al.	1998

SIRÉNIDOS										
Especie	Ubicación	Silvestre o Cautiverio	Vivo o Muerto	No. de Muestras	(+)	% (+)	Prueba	Títulos	Referencia	Año
Manatí del Caribe (<i>Trichechus manatus manatus</i>)	México	C	V	3	0	0	MAT	≥ 1:25	Alvarado-Esquivel <i>et al.</i>	2012
	Puerto Rico	S-C	V	29	1	3	MAT	≥ 1:25	Bossart <i>et al.</i>	2012
				Total	32	1	3			
Manatí de Florida (<i>Trichechus manatus latirostris</i>)	Puerto Rico	C	V	1	0	0	MAT	≥ 1:25	Bossart <i>et al.</i>	2012
Manatí del Amazonas (<i>Trichechus inunguis</i>)	Brasil	C	V	39	23	59	MAT	≥ 1:25	Mathews <i>et al.</i>	2012
	Brasil	C	V	35	6	17	MAT	≥ 1:25	Mathews <i>et al.</i>	2012
	Perú	C	V	19	12	63	MAT	≥ 1:25	Mathews <i>et al.</i>	2013
				Total	93	41	44			

Los reportes de infecciones por *T. gondii* en mamíferos marinos varían de incidentales a severas y fatales, y se pueden apreciar diferencias importantes por grupo taxonómico, identificando la susceptibilidad de algunas especies como las nutrias marinas del sur (*Enhydra lutris nereis*) y los odontocetos (delfines), en los cuales la enfermedad asociada *T. gondii* ha sido reportada con mayor frecuencia (Miller, 2007).

La nutria marina del sur es una especie en peligro de extinción con protección federal en Estados Unidos y de distribución única en las costas centrales de California. El impacto negativo que tiene *T. gondii* para sus poblaciones está ampliamente documentado. Con base a las pruebas de diagnóstico, el 36% de las nutrias marinas examinadas a la necropsia estaban infectadas con *T. gondii*, y aproximadamente el 60% de estas resultaron seropositivas (Miller et al., 2002a; Miller et al., 2002b; Dubey et al., 2003; Conrad et al., 2005).

Las infecciones por protozoarios como *T. gondii* y *S. neurona* son la principal causa de muerte en nutrias marinas del sur, responsables del 8.5-23% de las muertes (Thomas y Cole, 1996; Kreuder et al., 2003).

Roe et al. (2013) examinaron 28 delfines de Héctor (*Cephalorhynchus hectori*) y concluyeron que 7 animales murieron de toxoplasmosis diseminada, lo cual es de importancia debido a que es una especie endémica de Nueva Zelanda y se encuentra en peligro de extinción.

En contraste, signos clínicos de la enfermedad son menos comunes en pinnípedos, y se asocian a menudo con la presentación de alguna otra enfermedad o a una

inmunosupresión (Van Pelt y Dieterich, 1973; Holshuh et al., 1985; Gulland et al., 1996; Dubey et al., 2003). Esta baja presentación de signos clínicos asociada a *T. gondii* en pinnípedos no parece ser debida a una pobre vigilancia, ya que se han llevado a cabo muchos programas de rehabilitación y necropsias en estas especies por muchos años en todo el mundo. Por lo que, infecciones leves o asintomáticas pudieran estar siendo subdiagnosticadas (Miller, 2007). La toxoplasmosis clínica en otáridos ha sido reportada recientemente, Donahoe et al., 2014 documentaron el primer caso de toxoplasmosis diseminada en un lobo marino de Nueva Zelanda (*Arctocephalus forsteri*) y Carlson-Bremer et al., 2015 reportaron que de 1152 lobos marinos de California muertos y examinados en The Marine Mammal Center, sólo 5 murieron a causa de una infección de *T. gondii*.

En mysticetos (ballenas con barbas) sólo existen 3 reportes de la presencia de *T. gondii*. Forman et al., (2009) documentaron el primer caso de seropositividad en un juvenil de ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*) varada en la costa sur del Reino Unido. Posteriormente, Mazzariol et al., 2012 y Di Guardo et al., 2013 reportaron la infección en dos ejemplares adultos de rorcual común (*Balaenoptera physalus*) varados en las costas de la Toscana en Italia y en ambos casos los animales presentaban una co-infección con morbillivirus. La falta de información en estas especies se puede deber a la dificultad que representa obtener muestras óptimas para la detección de protozoarios durante la necropsia, o bien, a la baja susceptibilidad de los mysticetos a la infección. Sin embargo, algunas especies de ballenas forrajean cerca de las orillas e ingieren grandes volúmenes de agua, presas filtradoras y sedimento, por lo que lo que están expuestos a *T. gondii* como otras especies de mamíferos marinos con hábitos costeros (Miller, 2007).

Los fócidos y las morsas (*Odobenus rosmarus*) que habitan en regiones árticas y subárticas, con baja o nula exposición a gatos presentan evidencia serológica de infección por *T. gondii*, lo cual es un problema de salud pública para los pobladores indígenas que consumen carne de mamíferos marinos sin cocinar (Dubey et al., 2003; Gajadhar et al., 2004; Measures et al., 2004). Otras especies subárticas como

las nutrias marinas de Alaska (*Enhydra lutris kenyoni*), tienen más baja seroprevalencia a *T. gondii* que la subespecie de nutria marina del sur (Miller et al., 2002a; Hanni et al., 2003).

Los hallazgos patológicos más significativos relacionados a toxoplasmosis clínica son los reportados en nutrias marinas del sur, en las que *T. gondii* puede actuar como patógeno primario (Thomas y Cole, 1996; Cole et al., 2000; Miller et al., 2002; Kreuder et al., 2003; Miller et al., 2004; Kreuder et al., 2005; Miller et al., 2008a; Sundar et al., 2008). Asimismo, existe evidencia de manifestaciones clínicas de toxoplasmosis en otras especies de mamíferos marinos, siendo las lesiones más comunes encefalitis, meningitis y miocarditis, pero en un gran número de casos *T. gondii* actúa como patógeno secundario y en animales inmunocomprometidos, como en el caso de la epizootia de morbillivirus en delfines o en casos de elevados niveles de policlorobifenilos (PCB's) (Mikaelian et al., 2000; Van Bresse et al., 2009) (Ver Cuadro 3).

Las patologías cardíacas (miocarditis), la mayoría de las veces se han asociado a más de un agente, como una co-infección entre *T. gondii* y otro protozoario; con morbillivirus, que induce inmunosupresión y reactivación clínica; o la intoxicación por ácido domoico (marea roja), que también puede presentar manifestaciones cardíacas (Kreuder et al., 2005; Miller, 2007).

La meningoencefalitis y otras enfermedades sistémicas son causas potenciales indirectas de mortalidad, que ocasionan alteraciones en la actividad mental y el comportamiento, y provocan un aumento en la susceptibilidad de los mamíferos marinos a traumatismos, por ejemplo en el caso de las nutrias marinas, estas se vuelven más vulnerables a ataques por tiburones (Bowater et al., 2003; Kreuder et al., 2003; Conrad et al., 2005). Gajadhar et al. (2004) reportó sólo alteraciones en el comportamiento de la foca gris (*Halichoerus grypus*) infectada experimentalmente por ingestión de ooquistes de *T. gondii*.

Asimismo, *T. gondii* tiene un impacto significativo en la reproducción, ya que puede provocar muerte fetal o abortos por una infección transplacentaria, lo que resulta importante para algunas poblaciones de mamíferos marinos en peligro de extinción, como algunas especies de delfines y las nutrias marinas (Jardine y Dubey, 2002; Resendes et al., 2002; Miller et al., 2008a; Roe et al., 2013). Se ha reportado transmisión vertical en foca común del Pacífico (*Phoca vitulina richardii*) (Van Pelt and Dieterich, 1973), delfín del Indo-Pacífico (*Tursiops aduncus*) (Jardine y Dubey, 2002), delfín de Risso (*Grampus griseus*) (Resendes et al., 2002), delfín de Héctor (*Cephalorhynchus hectori*) (Roe et al., 2013), nutria marina del sur (Miller et al., 2008a) y en lobo marino de California (Carlson-Bremer et al., 2015).

CUADRO 3. Especies de mamíferos marinos en las que se han reportado hallazgos clínicos de *Toxoplasma gondii*. Tomado, modificado y actualizado de Dubey (2010)

H: histología, IHQ: inmunohistoquímica, PCR: reacción en cadena de la polimerasa, ME, microscopía electrónica, A: aislamiento y G: genotipificación

Especie	Ubicación	No. de casos	Prueba(s)	Referencia(s)
MUSTÉLIDOS				
Nutria marina del sur (<i>Enhydra lutris nereis</i>)	Estados Unidos	188	H, IHQ, PCR, A, G	Thomas y Cole (1996), Cole et al. (2000), Miller et al. (2002), Kreuder et al. (2003), Miller et al. (2004), Kreuder et al. (2005), Miller et al. (2008a), Sundar et al. (2008)
Nutria marina del norte (<i>Enhydra lutris kenyoni</i>)	Estados Unidos	13	H, IHQ, A, G	Lindsay et al. (2001), Sundar et al. (2008)
PINNÍPEDOS				
Morsa (<i>Odobenus rosmarus</i>)	Canadá	1	H, PCR	Dubey et al. (2009)
Lobo marino de California (<i>Zalophus californianus</i>)	Estados Unidos	11	H, IHQ, PCR, G	Ratcliffe and Worth (1951), Migaki et al. (1977), Dubey et al. (2003), Conrad et al. (2005), Carlson-Bremer et al. (2015)
Oso marino del Ártico (<i>Callorhinus ursinus</i>)	Estados Unidos	1	H, IHQ	Holshuh et al. (1985)
Lobo marino de Nueva Zelanda (<i>Arctocephalus forsteri</i>)	Australia	1	H, IHQ, PCR, G	Donahoe et al. (2014)
León marino australiano (<i>Neophoca cinerea</i>)	Australia	1	H	Kabay (1996)
Foca común del Pacífico (<i>Phoca vitulina richardii</i>)	Estados Unidos	3	H, PCR, G	Van Pelt and Dieterich (1973), Gulland et al. (1997), Conrad et al. (2005)
Foca gris (<i>Halichoerus grypus</i>)	Canadá	7	H, IHQ	Gajadhar et al. (2004)
Foca fraile de Hawaii (<i>Neomonachus schauinslandi</i>)	Estados Unidos	1	H, IHQ, PCR, G	Honnold et al. (2005)
Elefante marino del norte (<i>Mirounga angustirostris</i>)	Estados Unidos	1	H, IHQ	Dubey et al. (2004)
CETÁCEOS				
Delfín nariz de botella del Atlántico (<i>Tursiops truncatus</i>)	Estados Unidos, Canadá, Italia	17	H, IHQ, PCR, ME, A, G	Inskoop et al. (1990), Cruickshank et al. (1990), Di Guardo et al. (1995), Schulman et al. (1997), Dubey et al. (2003), Dubey et al. (2008), Dubey et al. (2009), Pretti et al. (2010)
Delfín del Indo-Pacífico (<i>Tursiops aduncus</i>)	Australia	1	H, IHQ	Jardine and Dubey (2002)
Delfín listado (<i>Stenella coeruleoalba</i>)	Costa Rica, Italia, España	21	H, IHQ, PCR, A, G	Domingo et al. (1992), Di Guardo et al. (1995), Dubey et al. (2007), Pretti et al. (2010), Di Guardo et al. (2010), Di Guardo et al. (2011)
Delfín tornillo (<i>Stenella longirostris</i>)	Estados Unidos	1	H, IHQ	Migaki et al. (1990)
Delfín de Risso (<i>Grampus griseus</i>)	Italia, España	2	H, IHQ	Di Guardo et al. (1995), Resendes et al. (2002)
Delfín estuario (<i>Sotalia guianensis</i>)	Brasil	2	H, IHQ, ME	Bandoli y De Oliveira (1977), Gonzales-Viera et al. (2013)
Delfín de Héctor (<i>Cephalorhynchus hectori</i>)	Nueva Zelanda	7	H, IHQ, PCR, G	Roe et al. (2013)
Delfín blanco de China (<i>Sousa chinensis</i>)	Australia	4	H, IHQ, ME	Bowater et al. (2003)
Beluga (<i>Delphinapterus leucas</i>)	Canadá	2	H, IHQ	De Guise et al. (1995), Mikaelian et al. (2000)
Rorcual común (<i>Balaenoptera physalus</i>)	Italia	2	IHQ, PCR	Mazzariol et al. (2012), Di Guardo et al. (2013)
SIRÉNIDOS				
Manatí del Caribe (<i>Trichechus manatus</i>)	Estados Unidos, Puerto Rico, Guyana	6	H, IHQ, ME	Buergelt y Bonde (1983), Dubey et al. (2003), Bossart et al. (2012)

Posibles fuentes de infección en el ambiente marino

Se han propuesto diferentes hipótesis para tratar de explicar la presencia de *T. gondii* en los mamíferos marinos, pero solo algunas están respaldadas con evidencias experimentales (Massie et al., 2010; Jensen et al., 2010). La hipótesis más aceptada es que *T. gondii* se dispersa de la tierra al ambiente marino, siendo las corrientes de agua dulce (ríos) que desembocan en el mar la principal ruta de transmisión. Esta ruta de transmisión es considerada como un factor de riesgo para la infección en nutrias marinas del sur en California (Figura 5) (Miller et al., 2002b).

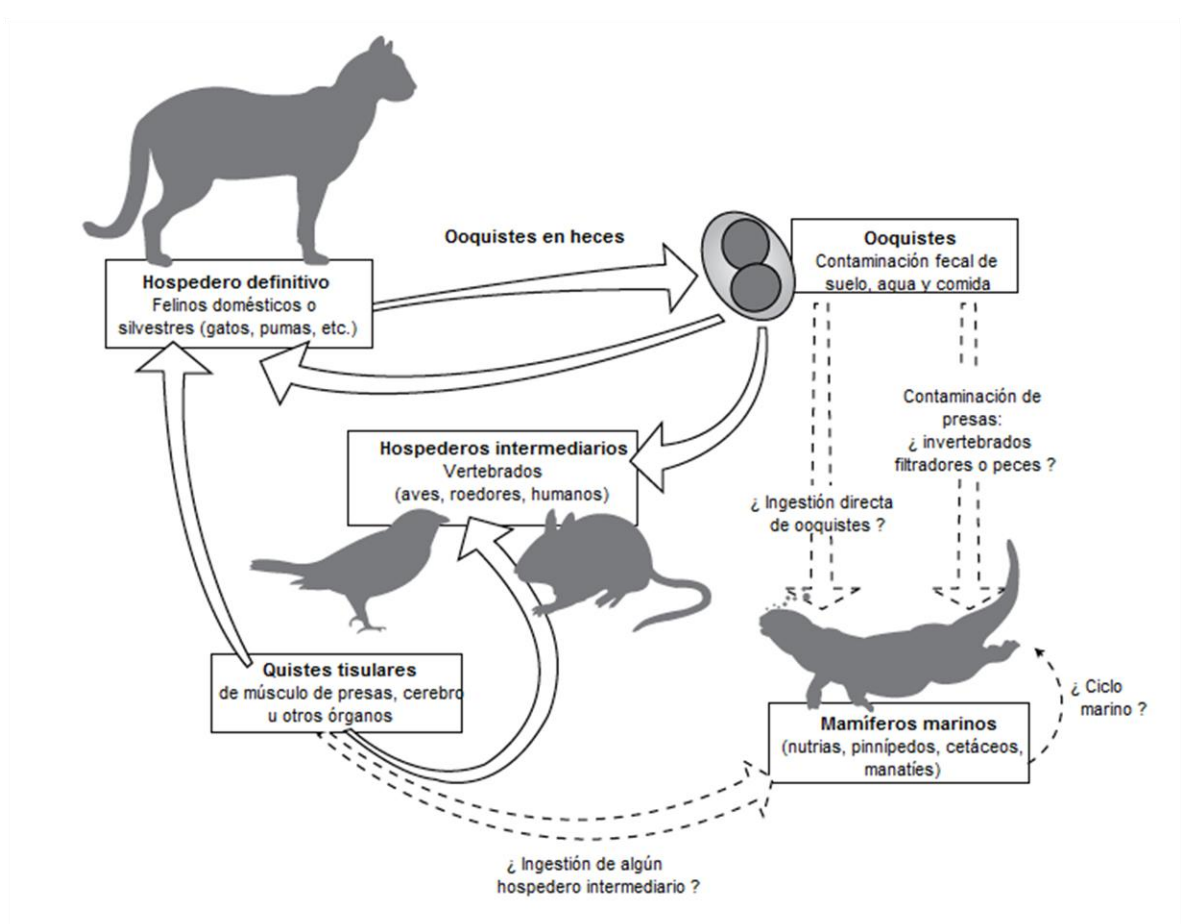


FIGURA 5. Posibles rutas de transmisión de *Toxoplasma gondii* en la nutria marina, mostrando fuentes potenciales de exposición para los mamíferos marinos (líneas punteadas). Tomado y modificado de Miller (2007)

Los ooquistes de *T. gondii* son extremadamente resistentes, se ha confirmado que sobreviven a la cloración en plantas de tratamiento de agua (Bowie et al., 1997; Isaac-Renton et al., 1998; Aramini et al., 1999; Bahia-Oliveira et al., 2003) y tienen la capacidad de mantener su infectividad en agua salada por varios meses y hasta un año (Lindsay et al., 2003; Lindsay et al., 2009).

Por otra parte, Dabritz et al. (2006) estimaron que cada gato infectado excreta 10 millones de ooquistes en un periodo de tiempo muy corto. Estos ooquistes se pueden dispersar por las lluvias y así llegar a los ambientes marinos por los ríos que desembocan en el mar (Dubey, 2010). Kreuder et al. (2003) sugieren que el crecimiento de las poblaciones de gatos domésticos y la disminución de la purificación natural en estuarios contribuyen a la diseminación de los ooquistes.

Recientemente, Rengifo-Herrera et al. (2012) reportaron la presencia de pinnípedos seropositivos en la Península Antártica, una región sin presencia de felinos, por lo que se sospecha los animales adquirieron la infección de aguas subantárticas donde si hay felinos.

Otra hipótesis menciona que la diseminación se podría estar realizando por las aguas de lastre de embarcaciones transoceánicas que pudieran estar trasladando los ooquistes a regiones pelágicas (Jensen et al., 2010).

En su ciclo regular, el felino consume al hospedero intermediario infectado con *T. gondii* e ingiere los quistes tisulares. El carnivorismo como una forma de transmisión no es viable en mamíferos marinos, ya que la mayoría se alimentan de animales de sangre fría. Sin embargo las orcas y los osos polares, son la excepción, ya que su dieta incluye varias especies de pinnípedos y cetáceos (Ford et al., 1998; Derocher et al., 2002).

Algunos organismos de sangre fría consumidos por los mamíferos marinos son capaces de concentrar ooquistes de *T. gondii*. Ejemplo de éstos organismos son los bivalvos, entre los que están el mejillón de California (*Mytilus californianus*) y el ostión americano (*Crassostrea virginica*); y los peces migratorios como la sardina

(*Sardinops sagax*) y la anchoveta (*Engraulis mordax*). Estos organismos no se infectan pero los ooquistes si se pueden concentrar en su tracto digestivo y actuar como responsables en la transmisión del parásito hacia sus depredadores (Lindsay et al., 2001; Arkush et al., 2003; Massie et al., 2010).

Las nutrias marinas consumen el 25 % de su peso de bivalvos (Riedman y Estes, 1990), lo cual coincide con la alta prevalencia de *T. gondii* reportada en esta especie. Los pinnípedos y los delfines no consumen bivalvos, pero las sardinas y las anchovetas si pueden ser parte de su dieta. Además, los delfines beben muy poca o nada de agua, lo que hace poco probable que se infecten por ingestión directa de ooquistes en el agua (Dubey et al., 2007).

Potencial zoonótico

T. gondii es un patógeno de importancia zoonótica que pudiera estar infectando al humano a través de los mamíferos marinos, por lo que es importante considerarlo dentro de temas de salud pública. Además, es un muy buen indicador de la contaminación marina con ooquistes (Moore, 2008).

La presentación de *T. gondii* en mamíferos marinos puede ser un tema de preocupación en comunidades donde se consume su carne, como las Inuit y Cree en la región Ártica. El consumo de la carne y el desollado de animales fueron considerados factores de riesgo durante un brote de toxoplasmosis en mujeres embarazadas al norte de Quebec, Canadá (McDonald et al., 1990).

Messier et al. (2009) reportaron que la seropositividad de *T. gondii* es relativamente alta (60%) en las comunidades Inuit de Nunavik, Canadá y uno de los factores de riesgo asociados fue el consumo de carne cruda de foca, morsa o beluga (*Delphinapterus leucas*). Mientras que en las comunidades Cree, que viven en la misma región geográfica y que consumen carne hervida en lugar de cruda, se reportó una seroprevalencia mucho más baja (5%).

Aún son muy pocos los estudios del efecto de *T. gondii* en mamíferos marinos y en los que se asocie su impacto hacia las poblaciones humanas (Messier et al., 2009).

***Toxoplasma gondii* en lobo marino de California**

Son pocos los reportes de caso que se tienen documentados en la especie y la mayoría han sido en animales mantenidos en cautiverio (Figura 6).

El primer reporte de infección por *T. gondii* en un mamífero marino ocurrió en 1947 en una cría de lobo marino de California de 10 días de nacido en el zoológico de Philadelphia, Pennsylvania, EUA, el cual a la necropsia presentó lesiones asociadas a toxoplasmosis en corazón, pulmón, hígado y linfonodos abdominales (Ratcliffe y Worth, 1951).

Posteriormente en 1977 se reportó otro caso de toxoplasmosis diseminada en una hembra de lobo marino de California perteneciente a la Universidad de Hawaii en Honolulu con la que se realizaban estudios de termorregulación, que vivía en una piscina con agua dulce y en la cual se reportaron lesiones necróticas por *T. gondii* en corazón y estómago (Migaki et al., 1977).

Dubey et al. (2003) reportó la seroprevalencia de varios mamíferos marinos a *T. gondii* en Estados Unidos, entre los cuales se encontraban lobos marinos de California de varias localidades. En la costa sureste de Alaska, 8 de 27 animales silvestres muestreados entre 1976-1998 resultaron positivos; en San Diego, California, 11 de 18 animales fueron positivos, los cuales estaban en cautiverio y pertenecían al Programa Naval de Mamíferos Marinos de los Estados Unidos (NMMP) por sus siglas en inglés, las muestras fueron tomadas entre 1990-2002; y en Charleston, Carolina del Sur, en 1993, 3 de 4 animales fueron positivos, también pertenecientes al NMMP y de los cuales un lobo marino murió de toxoplasmosis clínica, con muy altos títulos de anticuerpos (1:51,200) indicativo de infección activa y confirmada a la necropsia por lesiones y por la presencia de protozoarios (inmunohistoquímica) en tejidos de corazón, hígado, intestino grueso y pulmón. En

todos los casos la técnica serológica utilizada para diagnóstico fue MAT y animales con títulos $\geq 1:25$ son considerados como positivos.

Por su parte Conrad et al. (2005) realizaron la primera genotipificación de *T. gondii* en la especie para el estado de California, y lo clasificaron como perteneciente al genotipo X, el cual se ha encontrado y descrito para las nutrias marinas y la foca común en esa región.

En México existen sólo dos reportes de infección por *T. gondii* en lobo marino de California, ambos en la Ciudad de México y de animales en cautiverio, los cuales fueron diagnosticados por la técnica serológica de MAT. El primer reporte es de 2 de 4 animales positivos, muestreados durante el año 2009, los cuales pertenecen a un parque de diversiones y presentaron títulos de anticuerpos de 1:25 y 1:100 respectivamente, además de ser nacidos en el mismo lugar y encontrarse clínicamente sanos (Alvarado-Esquivel et al., 2012); y el segundo reporte es de un animal positivo perteneciente a la colección de un zoológico, muestreado entre 2010-2012, el cual presentó títulos altos de 1:3,200 y tampoco manifestaba signos de la enfermedad (Alvarado-Esquivel et al., 2013).

El estudio más reciente es el publicado por Carlson-Bremer et al. (2015), que reporta la seroprevalencia en lobos marinos de California silvestres que se han varado en las costas de California y que han ingresado al Centro de Rehabilitación de Mamíferos Marinos (TMMC) por sus siglas en inglés, durante los años de 1998-2009. La técnica utilizada para el diagnóstico fue IFAT, detectando anticuerpos en 46 de 1,630 animales (2.5 %) y encontrando mayor prevalencia asociada al aumento en la edad. También se realizó una revisión de los expedientes de patología y tejidos de 1,152 animales que murieron durante la rehabilitación entre 1975-2009 en TMMC, identificando 5 casos confirmados y 4 casos sospechosos de infección por *T. gondii*. Además se revisaron expedientes y tejidos de 10 fetos abortados colectados en la Isla de San Miguel en mayo de 2004, identificando 2 casos confirmados y 1 caso sospechoso. En los 7 casos confirmados, toxoplasmosis fue la causa principal de la muerte y las lesiones más comunes encontradas fueron

encefalitis, meningitis y miocarditis. Este es el primer reporte de transmisión vertical (toxoplasmosis diseminada en los fetos) y de aborto inducido por *T. gondii* en la especie.



FIGURA 6. Mapa indicando los lugares de los casos positivos a *T. gondii* en lobo marino de California [Imagen capturada de Google Earth 7.1.5 ®]

El lobo marino de California como especie centinela

El concepto de “medicina de la conservación” integra el punto de vista de los campos del conocimiento de la salud humana, salud animal y la ecología de las poblaciones, para estudiar la “salud” bajo la premisa de que los individuos, las poblaciones, las especies y los ecosistemas constituyen un continuo indivisible (Aguirre et al., 2002). Esta ciencia multidisciplinaria, describe mejor el reto en el área de la salud de los ecosistemas al estudiar las interacciones entre patógenos y enfermedades por un lado, y las especies y los ecosistemas por el otro, enfocándose en el contexto ecológico de la salud y la remediación de problemas de “una salud” o “salud ecológica” (Tabor et al., 2001).

Las enfermedades infecciosas generan problemas tanto para la protección de especies en riesgo, como para el mantenimiento de la biodiversidad. Hay evidencia de que la diversidad de especies, y por ende la diversidad genética pueden funcionar como un “amortiguador” que minimiza el impacto de los patógenos en un ecosistema, aunque paradójicamente, los patógenos también pueden contribuir al mantenimiento de la biodiversidad. Es por eso que el estudio de los efectos en los ecosistemas causados por las enfermedades es importante para la toma de decisiones de manejo de recursos naturales, bajo la premisa de que “la salud de los ecosistemas se refleja en la salud de los organismos que los habitan” (Tabor et al., 2001).

La presencia de enfermedades emergentes o re-emergentes en especies marinas es cada vez más frecuente, algunos ejemplos son: la epizootia de morbillivirus en cetáceos y pinnípedos; fibropapilomatosis en tortugas marinas; envenenamiento y muerte de lobos marinos en California por marea roja (ácido domoico); intoxicación con brevetoxina en manatíes en Florida; y toxoplasmosis en nutrias marinas en California (Aguirre et al., 2002; Wilcox y Aguirre, 2004).

Los cambios en el ambiente pueden ser causados por actividades antropogénicas o por eventos climáticos como lo puede ser el fenómeno de El Niño. Su efecto puede

ser directo y reflejarse en la salud de los individuos, en las poblaciones de las especies y en los ecosistemas. Manifestaciones como el aumento en la diseminación de enfermedades infecciosas y no infecciosas, que afectan la salud reproductiva, el desarrollo biológico y la respuesta inmunológica de las especies son ejemplos de estos cambios ambientales, así como también la pérdida de la biodiversidad y la modificación de los procesos ecológicos en el ecosistema. Se ha observado que muchas enfermedades están siendo causa de una simplificación ecológica al grado de la extinción de especies (Soulé, 2002).

El efecto del cambio climático global se suma al impacto causado por las actividades antropogénicas, pero los efectos son a una escala mucho mayor. El aumento drástico de las precipitaciones o de las sequías, así como el incremento en la erosión costera provocado por el aumento en el nivel del mar, dificultan la adaptación de especies de fauna silvestre a los rápidos cambios climáticos, lo que genera presiones significativas en las especies que pueden provocar extinciones masivas o un cambio en los patrones de diseminación de las enfermedades (Aguirre et al., 2002; House et al., 2002).

En el Golfo de California el impacto de las actividades antropogénicas ha aumentado con el tiempo y en algunas zonas ha sido de manera dramática (Enríquez-Andrade et al., 2005). La introducción de especies exóticas en islas, la contaminación por actividades agropecuarias, pesqueras y turísticas, la destrucción de hábitat y la perturbación en sitios de reproducción de especies nativas, particularmente de aves y lobos marinos, son sólo algunos de los problemas que se presentan en los ecosistemas insulares del Golfo de California (Zavala et al., 2004). La Región de las Grandes Islas actualmente se enfrenta a presiones existentes y potenciales, resultantes del crecimiento de la población humana en el noroeste de México durante las últimas cuatro décadas. Esto conlleva a un incremento en la demanda de recursos económicos y estéticos de la región, y un aumento en la contaminación marina derivada de dichas actividades. Se estima que la demanda de pescados y mariscos, con el consecuente desarrollo de flotas pesqueras

tecnificadas, está llevando a una rápida reducción de algunas especies de importancia comercial que afectará eventualmente la salud de los ecosistemas (Bhare y Bourillón, 2002).

La aparición de enfermedades en fauna silvestre es un problema que amenaza la supervivencia de las especies nativas y que puede afectar la salud humana. En esta región del Golfo se han encontrado enfermedades zoonóticas como la leptospirosis en el lobo marino de California, que en costas del estado de California ha causado problemas en sus poblaciones (Gulland et al., 1996; Godínez et al., 1999; Acevedo-Whitehouse et al., 2003). En un estudio más reciente realizado para medir la respuesta inmune en el lobo marino de California, se evaluó el Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) y en las comparaciones de genes del MHC entre los animales de loberas de las costas de California, Estados Unidos y las loberas del Golfo de California, se encontró que los lobos marinos del Golfo de California presentan patrones únicos de diversidad genética locales en el MHC, lo que podría significar un mayor riesgo ante la presencia de agentes infecciosos (Bowen et al., 2006).

A una especie se le considera “centinela” cuando es sensible a cambios en el ambiente que se reflejan en la salud de sus poblaciones. Además proveen información esencial y temprana que advierte de posibles daños en el ambiente, como son la presencia de patógenos infecciosos emergentes y contaminantes, que proporcionan un rápido diagnóstico de riesgo (Tabor y Aguirre, 2004; Aguirre y Tabor, 2004).

Entre las especies que responden rápidamente a los cambios en la calidad del ambiente se encuentran los mamíferos marinos y, entre ellos, los pinnípedos, ya que debido a su modo de vida en el que requieren tanto hábitat terrestre para su reproducción y crianza (principalmente insular), como hábitat marino donde obtienen su alimento, están expuestos a un mayor número de variables que afectan su supervivencia (Auriolos et al., 2010).

El lobo marino de California, el lobo fino de Guadalupe (*Arctocephalus townsendi*), la foca común (*Phoca vitulina richardsi*) y el elefante marino del norte (*Mirounga angustirostris*) son las cuatro especies que de manera regular se reproducen y mantienen poblaciones en aguas del noroeste de México. Cada una de estas especies tiene historias de declinación numérica reflejo de la explotación, deterioro ambiental y/o competencia por recursos alimentarios con el ser humano, lo que colocó a algunas de ellas al borde la extinción (Aurioles et al., 2010).

En particular, el lobo marino de California se destaca por ser la especie más abundante, tener la distribución geográfica más amplia y, por tanto, habitar un mayor número de ambientes a ambos lados de la península de Baja California. Durante varias décadas ha sido objeto de diversos estudios que sugieren que es una especie con características relevantes para el monitoreo del cambio climático y de otros cambios en el ambiente (Aurioles et al., 2010). Tiene un periodo de reproducción bien definido y se les encuentra en las islas en una alta proporción con respecto a sus poblaciones totales, lo que permite realizar conteos directos de sus colonias de reproducción en forma continua y en ciclos anuales, lo cual da la oportunidad de estimar sus tamaños poblacionales y obtener datos referentes a la producción de crías y tomar muestras biológicas de las mismas, de las cuales se puede obtener información muy valiosa de lo que acontece con los adultos (Godínez et al., 2006).

Las características que hacen del lobo marino de California una especie centinela, indicadora de la salud ambiental de los ecosistemas costeros, son:

1. Mantiene poblaciones que van de cientos a miles de individuos en cada colonia reproductora.
2. Su distribución es extensa, abarcando todo el Golfo de California y la costa occidental del Pacífico.
3. Sus colonias se ubican en la plataforma continental, excepto la colonia de la Isla Guadalupe.
4. Su talla corporal exige una demanda importante de alimento diario.
5. Especie preponderantemente costera, con un radio de alimentación que va de 17 a 50 km alrededor de sus colonias (principalmente las hembras).

6. Tanto las hembras como los machos emplean mayormente la zona costera para alimentarse. Cuando hay una baja en la productividad los machos salen de la plataforma y explotan recursos pelágicos.
7. Depende de recursos pesqueros de valor comercial, con dominancia de 4 o 5 especies, entre las que destaca como la más importante en su dieta la sardina Monterrey (*Sardinops sagax caeruleus*), lo que genera interacción con pesquerías costeras.
8. Explota la columna de agua alrededor de las islas, con consumo importante de presas de fondo. Sus presas son: 35% neríticas (en columna de agua), 35% demersales (en fondo), 23% bentónicas (viven en fondo, el lobo marino tiene que bucear). 7% epipelágicas (fuera de la plataforma continental) y 93% costeras.
9. Es sensible a cambios de productividad en el ecosistema, lo que se refleja en el número de crías (mayo, junio y julio). Los fenómenos de El Niño y la oscilación decadal del Pacífico tienen impacto en la producción y número de crías, por lo que éstas funcionan como un bioindicador de los cambios ambientales.
10. Parece haber una elevada relación entre la producción de crías y la variabilidad en la abundancia de sardina, lo cual lo hace un bioindicador de la población de sardina.
11. Su alto nivel trófico lo hace sensible a los cambios de productividad y en particular a la biomagnificación de sustancias y metales traza, por lo que funciona como bioindicador de la contaminación costera.
12. Es residente permanente, en particular las hembras, por ello son excelentes indicadores de la salud ambiental local.
13. Deposita dentina en sus dientes, por lo que la información obtenida de ellos sirve para calcular la edad y reconstruir dietas y variaciones ambientales.

(Aurioles et al., 2010)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

México es un país megadiverso y en esta diversidad se incluyen mamíferos marinos residentes y migratorios de especial interés. El lobo marino de California (*Zalophus californianus*) es la especie de pinnípedo de mayor distribución en territorio nacional, se le encuentra en la costa occidental de la península de Baja California e islas del Pacífico y en todo el Golfo de California. Se le considera una especie prioritaria para la conservación y listada en la categoría “protección especial” en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 que lista a las especies mexicanas en alguna categoría de riesgo de extinción.

En México existen sólo dos reportes serológicos de *T. gondii* en lobo marino de California, ambos en la Ciudad de México y de animales en cautiverio de un delfinario y un zoológico (Alvarado-Esquivel et al., 2012; Alvarado-Esquivel et al., 2013). Pero no se cuenta con estudios de la enfermedad en ejemplares de vida libre y en su hábitat natural, información que sería muy valiosa para el monitoreo de salud de la especie, ya que el protozooario podría estar presente y ser la causa directa o indirecta de la muerte de algunos ejemplares como se ha reportado para el estado de California en Estados Unidos (Carlson-Bremer et al., 2015).

El primer reporte de infección por *T. gondii* en un mamífero marino ocurrió en 1947 en una cría de lobo marino de California de 10 días de nacido en el zoológico de Philadelphia, Pennsylvania, EUA (Ratcliffe y Worth, 1951). Y recientemente Carlson-Bremer et al., (2015) han reportado por primera vez la transmisión vertical de *T. gondii* en dos fetos abortados de lobo marino de California. Es por esto que el presente estudio se enfoca al muestreo de crías, que se utilizarán como indicadores de la exposición a *T. gondii* por parte de las madres o bien, de la posible contaminación con ooquistes en las diferentes “loberas” de reproducción de la Península de Baja California.

El lobo marino de California se considera una especie “centinela”, ya que es sensible a cambios en el ambiente que se reflejan en la salud de sus poblaciones, esto debido a su longevidad y a su posición como depredador tope en la cadena trófica, por lo que son buenos indicadores de lo que está ocurriendo tanto en la tierra, donde se reproduce, como en el océano, donde se alimenta.

La distribución de *T. gondii* ha ido en aumento, reportándose cada vez en nuevas especies: manatí del Amazonas (*Trichechus inunguis*), delfín rosado del Amazonas (*Inia geoffrensis*) y rorcual común (*Balaenoptera physalus*); además está llegando a lugares donde no se pensaría que sobreviviera como lo son las regiones árticas y antárticas. Lo cual es un reflejo del grado de contaminación que está ocurriendo en el ambiente y abre nuevas puertas para indagar más en cuanto a lo que acontece con *T. gondii* en el ambiente marino.

Enfermedades como *T. gondii* deben ser diagnosticadas en las poblaciones de lobo marino de California, debido a que puede causar la muerte en la especie y además puede tener un impacto significativo en la reproducción, ya que puede provocar muerte fetal o abortos por una infección transplacentaria (Jardine y Dubey, 2002; Resendes et al., 2002; Miller et al., 2008a; Roe et al., 2013), lo que resulta importante para las poblaciones de éste pinnípedo sujeto a protección especial.

La contaminación del océano con ooquistes de *T. gondii* o el consumo de presas que mantienen viables los ooquistes, y que también son de consumo humano como algunas especies de peces o cefalópodos, hacen que el conocer la situación del lobo marino de California como especie centinela en la región sea relevante para la salud pública.

HIPÓTESIS

Toxoplasma gondii se encuentra presente en las poblaciones de lobo marino de California en la Península de Baja California, México.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de *Toxoplasma gondii* en crías de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) de la Península de Baja California por técnicas serológicas y moleculares.

MATERIAL Y MÉTODOS

Área de estudio

Golfo de California

Se seleccionaron siete loberas de reproducción que forman parte de la región de las Grandes Islas en el Golfo de California, específicamente en el Área de Protección de Flora y Fauna Islas del Golfo de California (APFF-IGC) y de la región centro-norte del Mar de Cortés. Estas islas e islotes fueron (de norte a sur): Rocas Consag ($31^{\circ}05'58.22''$ N, $114^{\circ}20'38.38''$ W), El Coloradito ($30^{\circ}02'55.13''$ N, $114^{\circ}29'25.06''$ W), Granito ($29^{\circ}33'51.06''$ N, $113^{\circ}32'34.70''$ W), Los Cantiles ($29^{\circ}31'25.34''$ N, $113^{\circ}28'29.55''$ W) y Los Machos ($29^{\circ}17'8.34''$ N, $113^{\circ}29'51.66''$ W) en Isla Ángel de la Guarda, y los islotes El Partido ($28^{\circ}54'43.52''$ N, $113^{\circ}2'35.95''$ W) y El Rasito ($28^{\circ}50'12.40''$ N, $112^{\circ}59'56.60''$ W) (Figura 7).

Pacífico

Se pudo tener acceso a tres loberas de reproducción ubicadas en islas de la vertiente del Pacífico (de norte a sur): Cedros ($28^{\circ}20'0.1''$ N, $115^{\circ}11'40.7''$ W) perteneciente a estado de Baja California; Natividad ($27^{\circ}53'35.7''$ N, $115^{\circ}13'20.3''$ W); y Asunción ($27^{\circ}06'46.40''$ N, $114^{\circ}17'38.58''$ W), estas últimas son pertenecientes al estado de Baja California Sur y forman parte de la Reserva de Biósfera El Vizcaíno (Figura 7).

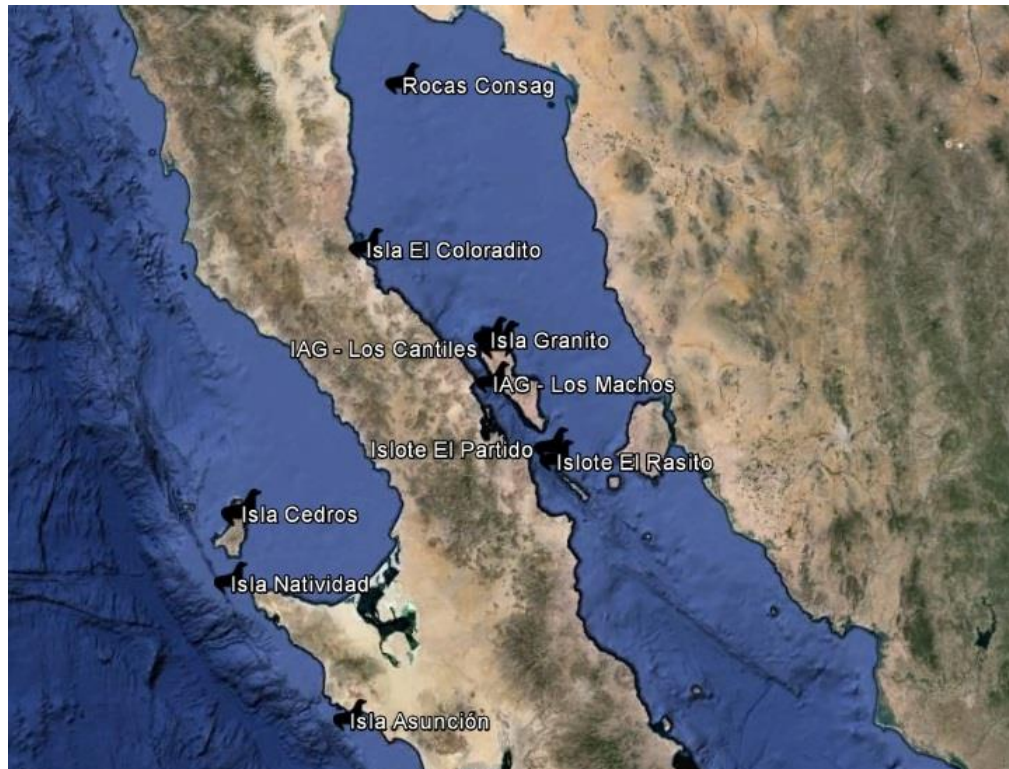


FIGURA 7. Mapa de la Península de Baja California donde se muestran las 10 loberas de reproducción donde se realizaron los muestreos de crías de lobo marino de California [Imagen capturada de Google Earth 7.1.5 ®]

Muestreo de lobos marinos

El trabajo de campo se realizó en colaboración con la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP) APFF-IGC (Golfo de California) y con el apoyo de la CONANP Reserva de Biósfera El Vizcaíno (ReBiVi) y del personal de la exportadora de sal en Guerrero Negro, BCS (Pacífico).

Se eligió tomar muestras de crías de lobo marino de California debido a que son un grupo en edad primordial para estimar el tamaño de población y por la facilidad del manejo comparado con el de los adultos. Se consideró que con 10 crías por lobera se podría estimar el estado de salud de las poblaciones de la especie en el área, sin embargo en ningún año se pudieron tener muestras de todas las loberas y

tampoco de todos los animales debido a la complejidad de acceso a las mismas cuando el clima no era favorable.

Las crías se capturaron de forma manual, sujetándolas de las aletas caudales o con redes especiales, dependiendo la dificultad de acceso a las diferentes locaciones, posteriormente se colocaban en un corral donde se mantenían húmedas mientras se realizaba el manejo. La inmovilización se realizó por contención física entre varias personas o bien con anestesia inhalada (isoflurano) suministrada por un aparato de anestesia portátil (Ohmeda ®, BOC Health Care, England) [dosis de inducción al 5% con oxígeno y de mantenimiento al 2-3%], esto con el fin de facilitar la realización de un examen físico general, tomar medidas morfométricas, pesaje, toma de muestra de sangre (obtenida de la vena yugular o de la vena glútea caudal) y toma de otras muestras biológicas para otros estudios. Asimismo, cuando se tuvo oportunidad se capturaron ejemplares juveniles y hembras adultas, con las mismas técnicas referidas anteriormente.

Los muestreos se llevaron a cabo en la temporada de nacimientos, que ocurre en los meses de mayo a agosto. Para el Golfo de California se realizaron salidas de campo anuales del año 2011 al 2014 y para las islas del Pacífico sólo se realizó una salida de campo en el año 2013.

Se colectaron un total de 216 muestras (208 crías, 3 juveniles y 5 adultos), siendo un total de 179 muestras del Golfo y 37 del Pacífico. En el año 2012 se tuvo acceso a un número muy reducido de muestras (n=7) debido a la falta de personal y por no poder contar con el aparato de anestesia portátil (Ver Cuadro 4).

CUADRO 4. Muestras de sangre colectadas en la Península de Baja California (2011-2014)
C: crías, J: juveniles y A: hembras adultas

Lobera	2011	2012	2013	2014	Total de muestras
Golfo de California					
Rocas Consag	6 C	3 C	10 C 1 A		20
El Coloradito	10 C	3 C	9 C 1 J	10	33
Granito	9 C 1 J 3 A		10 C	15 C 1 A	39
Los Cantiles	9 C		10 C	15 C 1 J	35
Los Machos				15	15
El Partido	10 C	1 C	10 C	10	31
El Rasito	6 C				6
TOTAL	54	7	51	67	179
Pacífico					
Cedros			19 C		19
Natividad			11 C		11
Asunción			7 C		7
TOTAL			37		37
TOTAL DE MUESTRAS					216

Se realizó la necropsia de un cadáver fresco de cría de lobo marino encontrado en la lobera de Los Machos en el año 2012. Se colectaron muestras de tejido de los siguientes órganos: corazón, pulmón, hígado, bazo, riñón y músculo. Los cuales se conservaron en formaldehido amortiguado al 10% hasta la realización de la histopatología en búsqueda de lesiones o presencia de parásitos compatibles con *T. gondii*.

Conservación de muestras

La sangre se colectó en el sitio de muestreo en tubos sin anticoagulante con tapón color rojo (BD Vacutainer® Serum) para todos los años y además para el año 2014 en tubos para extracción de DNA (PAXgene® PreAnalytiX GmbH by QIAGEN). El suero se obtuvo por centrifugación en centrífuga (Spectrafuge 6C®, Labnet International Inc.) a 6500 rpm por 4 minutos y se transfirió a tubos de microcentrífuga de polipropileno (Eppendorf®) para su almacenamiento. La cadena fría se mantuvo en todo momento hasta su llegada a la Ciudad de México, donde se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento.

Técnicas de laboratorio

Las muestras se procesaron en el Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi” de la Universidad Autónoma de Yucatán en Mérida.

Las técnicas de diagnóstico empleadas fueron ELISA indirecto, Western Blot, PCR en tiempo real e histopatología.

ELISA indirecto (Detección de anticuerpos IgG)

Se realizó para todos los sueros, utilizando el kit comercial “Toxo IgG” (Human®, Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica, Wiesbaden, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante y adaptado a lo descrito por Figueroa et al., 2006, utilizando un anti-IgG especie-específico, en este caso un anti IgG canino acoplado a peroxidasa de rábano (HRP).

La dilución de los sueros evaluados fue de 1:100, se utilizó como segundo anticuerpo un anti-IgG canino marcado con HRP a un dilución de 1:5000, debido a que se ha reportado que el anti-IgG canino demuestra un buen reconocimiento de los anticuerpos IgG de pinnípedos (Miller et al., 2001; Colvocoresses, 2004; Lefevre et al., 2012). Como control negativo se empleó un suero canino negativo adquirido comercialmente y un control de punto de corte (“cut off” o CC) proporcionado por el

mismo estuche comercial, el cual fue utilizado como el CC de referencia, ya que el fabricante señala que las absorbancias menores a éste son producto del fondo propio de los reactivos y soluciones utilizadas durante el ensayo. La densidad óptica (DO) fue medida en un espectrofotómetro (XMark®, Bio-Rad) a 450 nm. Los valores por encima del CC en un 15% fueron considerados como positivos. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado. Más detalles en el Anexo 1.

Western Blot

Con la finalidad de confirmar los resultados del desempeño del ELISA indirecto, algunas muestras seropositivas y seronegativas fueron evaluadas con Western Blot (WB).

Los parásitos de *T. gondii* (cepa RH) se concentraron por centrifugación (800 g durante 5 minutos a temperatura ambiente), se lavaron en PBS y se lisaron con un tampón Laemmli para re-suspender muestras en presencia de un cóctel inhibidor de las proteasas. Posteriormente, las muestras se desnaturalizaron durante 5 min (90-95°C) antes de su carga en un gel (SDS-PAGE, 10%), en donde después se realizó una electroforesis. Las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, la cual se bloqueó con TBST (Tris HCl 10 mM, NaCl 150 mM, 5 mM Tween 20, pH 8,0) - leche sin grasa (1 %) durante 30 minutos a temperatura ambiente y se cortó en tiras. Después, estas tiras se incubaron con los sueros policlonales diluidos en TBST-leche sin grasa (1: 100) a 4 °C durante toda la noche, seguido por tres lavados con TBST. Finalmente, se incubó con anti-IgG canino específico, conjugado con fosfatasa alcalina (AP), se lavó tres veces con TBST y se reveló con nitro azul tetrazolio cloruro y el 5-bromo-4-cloro-3'-indolil fosfato sal de p-toluidina (NBT y BCIP, respectivamente).

Además de los controles positivos y negativos mencionados anteriormente, se utilizó una tira control incubada únicamente con el conjugado anti-IgG canino para descartar bandas inespecíficas que éste pudiera reconocer.

Para la interpretación de resultados, una muestra de suero se consideró positiva cuando detectó al menos tres bandas antigénicas en la tira de nitrocelulosa; y fue negativa cuando la muestra de suero no mostró reactividad. Las bandas consideradas para la interpretación diagnóstica debían ser diferentes de las observadas en el control que sólo se incubó con el conjugado.

PCR en tiempo real (Detección de DNA genómico de *T. gondii* en sangre)

Se realizó para 67 muestras de sangre correspondientes al año 2014.

La extracción de DNA de sangre se llevó a cabo con el protocolo de purificación de DNA total de muestras sanguíneas (DNeasy Blood and Tissue, QIAGEN®) con las modificaciones hechas por Jalal et al., 2004 (Véase Anexo 2).

El diagnóstico molecular de *T. gondii* se realizó mediante un ensayo presencia-ausencia del gen B1 de *T. gondii* por PCR en tiempo real (qPCR) como lo describen Jalal et al., 2004 y Castillo-Morales et al., 2012. La detección y cuantificación fue realizada con el objetivo de amplificar un fragmento de 62 pb del gen B1, el cual está presente 35 veces y es conservado en el genoma de *T. gondii* (Kompalic-Cristo et al., 2007). Los iniciadores utilizados fueron el sentido 5'CTAGTATCGTGCGGCAATGT' y el antisentido 5'GGCAGCGTCTCTTCCTCTTTT3' con una sonda marcada con fluoresceína TaqMan 5' (6-FAM)-CCACCTCGCCTCTTGG-(NFQ-MGB)3'.

Para la reacción de amplificación se utilizó el TaqMan® Universal PCR Master Mix 1X (PE Applied Biosystems) con una concentración ajustada de 5 mM de MgCl₂, 0.90 µM de cada uno de los iniciadores, 0.25 µM de la sonda marcada con FAM y 4 µl de muestra de ADN (concentración µg/µl, en un volumen final de 20 µL). La contaminación por arrastre fue prevenida mediante el uso de la enzima termolábil Uracilo N-glicosilasa (UNG, AmpErase® UNG, PE Applied Biosystems), incluida en el TaqMan® Universal PCR Master Mix. La mezcla de reacción fue inicialmente incubada por 2 min a 50 °C para permitir que la enzima UNG actuara. Como controles se utilizaron por triplicado: reacciones sin ADN y reacciones con ADN de

un individuo sin contacto previo con el parásito (ADN de la sangre de un ratón de un bioterio certificado).

Las condiciones de amplificación fueron: una desnaturalización inicial a 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos y 60°C por 1 minuto en un termociclador de tiempo real (CFX96 Touch ® Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad). Una lectura simple de fluorescencia de cada muestra fue tomada en el paso de alineamiento-elongación. La curva estándar fue construida usando diluciones seriadas de cantidades conocidas de ADN de taquizoitos de *T. gondii* (1x10⁵ a 1x10⁻²), para poder determinar la cuantificación absoluta de cada muestra, la cual se llevó a cabo empleando el software del termociclador. La sensibilidad y el límite de detección de la qPCR fue evaluada en la curva control. Los resultados fueron expresados como número de taquizoitos de *T. gondii* equivalentes por mililitro de sangre.

Histopatología

Los diferentes tejidos colectados se procesaron por la técnica convencional de histopatología y posteriormente se revisaron las laminillas en búsqueda de lesiones y quistes tisulares compatibles con *T. gondii*. La descripción de la técnica se encuentra en el Anexo 3.

Análisis estadístico

La prevalencia de lobos marinos seropositivos fue calculada por ELISA para cada año de muestreo. Para determinar el riesgo por el origen de los lobos marinos (Pacífico vs. Golfo de California) se efectuó un análisis univariado (x2) utilizando una tabla de contingencia de 2x2. Los “odds ratio” [OR] (razón de oportunidades, en español) e intervalos de confianza (95%) fueron calculados usando el programa Epi Info ® 7 (CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, GA, USA), considerando un nivel de significancia de $P < 0.05$.

RESULTADOS

Serología

La prevalencia total en lobos marinos de California fue del 6% (13/216) para toda la Península, siendo de 2.8% (5/179) para las islas del Golfo y de 21.6% (8/37) para las islas del Pacífico (Ver Cuadro 5).

CUADRO 5. Lobos marinos seropositivos en la Península de Baja California (2011-2014)

Lobera	2011	2012	2013	2014	No. muestras totales	Elisa (+) n (%)
Golfo de California						
Rocas Consag	0/6	0/3	0/11		0/20	
El Coloradito	0/10	0/3	0/10	0/10	0/33	
Granito	1/13		0/10	0/16	1/39	1
Los Cantiles	0/9		0/10	0/16	0/35	
Los Machos				0/15	0/15	
El Partido	2/10	1/1	0/10	0/10	3/31	3
El Rasito	1/6				1/6	1
TOTAL	4/54	1/7	0/51	0/67	5/179	5 (2.8%)
Pacífico						
Cedros			4/19		4/19	4
Natividad			1/11		1/11	1
Asunción			3/7		3/7	3
TOTAL			8/37		8/37	8 (21.6%)
				TOTAL	216	13 (6%)

Nota: a la izquierda de la diagonal se indican los positivos y a la derecha los totales por lobera

CUADRO 6. Análisis univariado de seroreactividad por ELISA en lobos marinos de la Península de Baja California

Factor de Riesgo	Positivos	Negativos	Total	OR	P value
Pacífico	8	29	37		
Golfo	5	174	179	9.6	0.0001

Western Blot

Los resultados del Western Blot se presentan en la Figura 8.

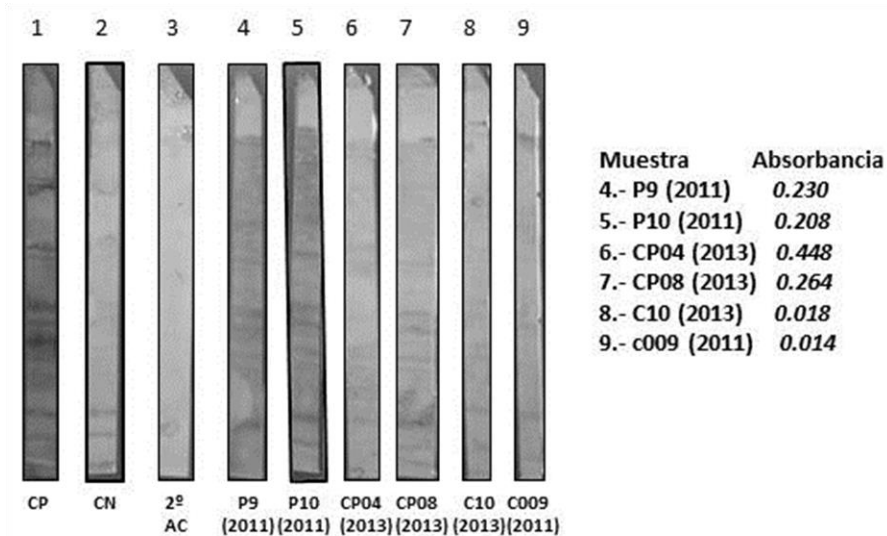


FIGURA 8. Resultados de Western Blot de lobos marinos seropositivos por ELISA

Líneas: (1) control (+) suero de lobo marino no infectado con *T. gondii*, (2) control (-) suero de perro infectado con *T. gondii*, (3) tira incubada sin anticuerpo primario, (4-7) sueros de lobos marinos positivos a ELISA indirecto, (8-9) sueros negativos a ELISA. En todas las muestras con absorbancias superiores al punto de corte, se registraron mayor número de bandas reconocidas y no presentes en el control negativo.

PCR en tiempo real (qPCR)

El 11.9% (8/67) de los lobos marinos de California resultaron positivos a *T. gondii* mediante qPCR (Ver Cuadro 7). Ninguna muestra seropositiva del 2014 resultó positiva a qPCR. Además se determinó la carga parasitaria de *T. gondii* en los individuos positivos a qPCR (Ver Cuadro 8).

CUADRO 7. Lobos marinos del Golfo de California positivos por PCR del 2014

Lobera	2014	qPCR (+) n (%)
Golfo de California		
Rocas Consag		
El Coloradito	10	5 (50%)
Granito	16	
Los Cantiles	16	
Los Machos	15	1 (6.7%)
El Partido	10	2 (6.4%)
El Rasito		
TOTAL	67	8 (11.9%)

CUADRO 8. Localización, información general y carga parasitaria de los casos positivos a *T. gondii* por qPCR

Lobera	Positivos a qPCR (n)	Edad	Sexo	Peso (kg)	Carga parasitaria (x±DE par/ml sangre)
<i>El Coloradito</i>	5	cría	M	10	0.97±0.086
		cría	H	12	0.45±0.041
		cría	H	12	0.40±0.301
		cría	M	11	0.63±0.399
		cría	M	17	0.88±0.366
Promedio				12.4	0.66±0.253
<i>Los Machos</i>	1	cría	H	11	0.39±0.111
<i>El Partido</i>	2	cría	M	13	2.17±1.029
		cría	M	7	0.67±0.697
Promedio				10	1.42±1.065

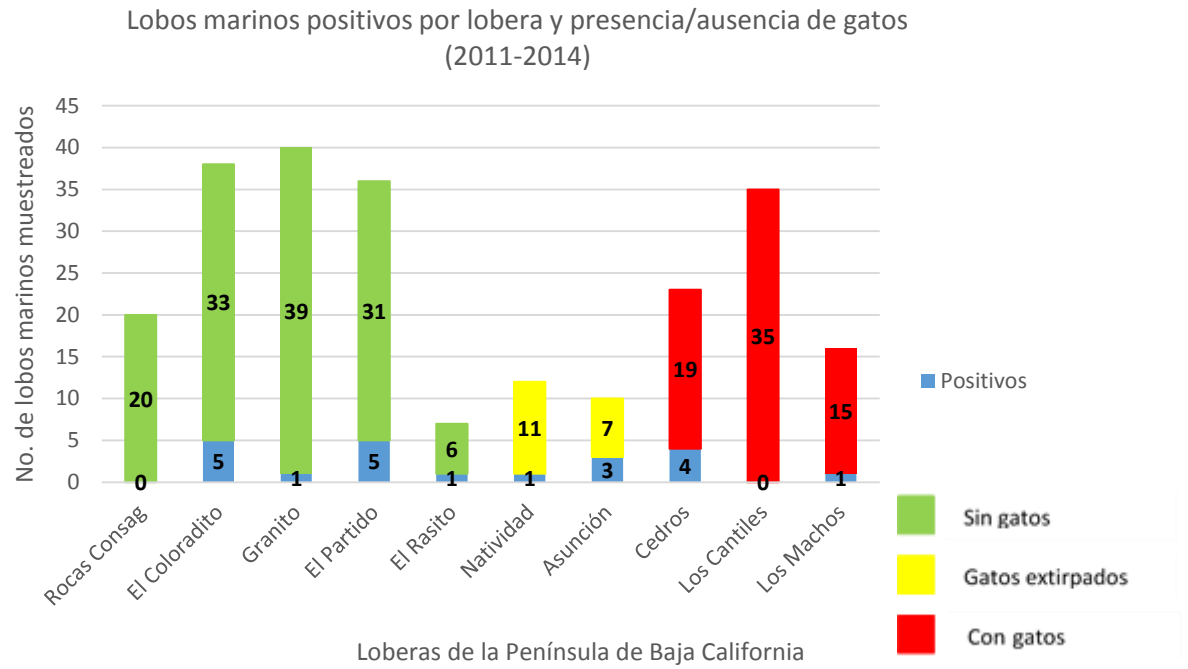


FIGURA 9. Gráfica en la que se indican los lobos marinos positivos por alguna de las pruebas (serológica y molecular) y su relación con la presencia o ausencia de gatos en las loberas

Histopatología

No se encontraron lesiones o presencia de parásitos compatibles con *T. gondii* en los diferentes tejidos colectados de la cría de lobo marino encontrada muerta en la lobera Los Machos del 2012.

DISCUSIÓN

Es el primer estudio que se realiza en México referente al diagnóstico de *T. gondii* en mamíferos marinos de vida libre, particularmente en pinnípedos. Sólo existen los reportes recientes de mamíferos marinos en cautiverio de Alvarado-Esquivel et al. (2012) que presentan una seroprevalencia por la prueba de MAT en delfinarios del 50% (2/4) para lobos marinos de California, del 87% (55/63) para delfines nariz de botella del Atlántico y del 100% (3/3) delfines nariz de botella del Pacífico; y de Alvarado-Esquivel et al. (2013) que reporta 1/1 lobo marino positivo en un zoológico.

La seroprevalencia del 6% (13/216) reportada en este estudio para costas del Pacífico mexicano es 2.4 veces mayor a la reportada por Carlson-Bremer et al. (2015) del 2.5% (46/1,630) en lobos marinos de California de vida libre de las costas del Pacífico de California, Estados Unidos.

En un sentido más estricto y comparando sólo las poblaciones del Pacífico de ambos países, sin tomar en cuenta las poblaciones aisladas del Golfo de California, la seroprevalencia es aún mayor en costas mexicanas (8.6 veces), siendo de 21.6% (8/37). Sin embargo, no se pueden realizar comparaciones directas entre ambos estudios debido al número de animales muestreados, los periodos de estudio, las edades de los animales y el uso de diferentes pruebas diagnósticas con un punto de corte diferente. En el estudio de Carlson-Bremer et al. (2015) se utilizó la prueba de IFAT y en el presente estudio se utilizó el ELISA indirecto, ambas para detectar anticuerpos (IgG) para *T. gondii*. Ninguna de las dos pruebas se ha validado para la especie, IFAT está validado sólo para nutrias marinas, debido a que se tienen numerosos animales positivos por más de una técnica diagnóstica (histología e inmunohistoquímica) para usar como controles (Miller et al., 2002a).

Este estudio nos permitió tener una primera aproximación para entender la presencia de *T. gondii* en los lobos marinos de California, mediante la utilización del conjugado comercial anti-IgG de perro, especie filogenéticamente emparentada con los pinnípedos (suborden caniforme) (Miller et al., 2001) y como una muy buena

opción al no existir conjugados o kits comerciales para mamíferos marinos (sólo existen para delfines), a pesar de la importancia que tiene el diagnóstico de enfermedades en la conservación de estas especies, en su mayoría amenazadas (Bernal-Guadarrama et al., 2014).

Asimismo, también es el primer reporte de detección molecular de *T. gondii* en sangre de crías de lobo marino de California. La qPCR es una prueba altamente sensible y capaz de detectar el DNA de un solo taquizoito (Dubey, 2010). En este estudio, la qPCR permitió identificar un mayor número de casos positivos, lo que complementa los hallazgos serológicos y es indicador de que el contacto y distribución del parásito puede ser de proporciones aún mayores en la zona de estudio. El encontrar crías positivas a *T. gondii* en sangre es sugerente de que tenían una infección activa, lo cual indica que se estarían infectando en las primeras semanas de vida en las loberas por la presencia de ooquistes en el agua, debido a que aún son lactantes y no ingieren otro alimento que no sea leche materna, además de no poder nadar a muy lejos de la orilla por su inexperiencia; en el caso de las crías muestreadas cercanas al nacimiento, la infección podría tener origen transplacentario. Blanchet et al. (2014) mencionan que el aislamiento o la detección de DNA de *T. gondii* son los únicos diagnósticos seguros de que la infección está presente. Es interesante que ningún animal positivo por PCR lo fue por serología, lo cual no es raro debido a que una prueba detecta anticuerpos propios o maternos y otra el DNA del parásito.

La carga parasitaria encontrada por qPCR fue de media a baja, con un promedio de 0.82 parásitos/ml con intervalos entre 0.39-2.17, lo cual es similar a lo reportado en humanos por Costa et al. (2013), que registraron cargas parasitarias promedio de 0.133 parásitos/ml con intervalos entre 0.005-6.140 para bebés con toxoplasmosis congénita a partir del análisis de muestras también de sangre.

La evaluación de los diferentes tejidos de la cría de lobo marino encontrada muerta por histopatología no permitió identificar lesiones o protozoarios asociados a infección aguda o crónica por *T. gondii*, lo cual no es indicativo de que el animal esté

libre de la infección, ya que el no encontrar evidencia del protozooario no es raro, en el estudio de Carlson-Bremer et al. (2015) sólo se identificaron protozoarios en 9 de 1152 lobos marinos examinados en “The Marine Mammal Center”. La histopatología no se considera una técnica altamente sensible para confirmar la infección, debido a que los protozoarios son difíciles de observar, distribuidos muy ampliamente y la mayoría de las veces no se observan en las porciones de tejido en donde se encuentran o no se toma muestra del tejido lesionado (Carlson-Bremer et al., 2015). Para descartar una infección por *T. gondii* en este ejemplar se recomienda realizar pruebas complementarias como inmunohistoquímica o PCR de los diferentes tejidos. Finalmente, se debe destacar la importancia que tienen los varamientos de mamíferos marinos, ya que son excelentes oportunidades para la realización de necropsias y la toma de muestras biológicas para el diagnóstico de enfermedades conocidas o de nuevas enfermedades que pudieran estar afectando la salud de los mismos (Greig et al., 2005).

El presente estudio fue enfocado al diagnóstico de *T. gondii* en crías y sólo se muestrearon muy pocos ejemplares juveniles y hembras adultas cuando se tuvo oportunidad. El encontrar crías seropositivas, así como la detección del protozooario en sangre por qPCR sugiere que la infección se pudo haber dado por tres vías: a) vía transplacentaria por hembras infectadas en alguna etapa de la gestación, b) vía calostro o leche materna con la transmisión de anticuerpos por madres expuestas al protozooario y c) exposición de las crías a ooquistes en sus primeros meses de vida en las loberas. Omata et al. (1994) reportaron que los anticuerpos IgG para *T. gondii* en suero de crías de gatas infectadas se elevan significativamente para el día 7 post nacimiento y disminuyen hasta no ser detectados por serología entre los 2 y 3 meses de edad a pesar de seguir mamando leche materna. Las crías del presente estudio tenían desde 1 día hasta 3 meses de edad, ya que fueron muestreadas en el mes de julio, sabiendo que la época de nacimientos abarca de mayo a junio, pudiendo encontrar a las últimas crías de la temporada recién nacidas en julio. La lactación en el lobo marino de California dura aproximadamente un año

(Mate y DeMaster, 1986), por lo que se puede asegurar que todas las crías muestreadas se encontraban lactando.

No hay mucha información referente a la inmunidad en mamíferos marinos; en un estudio realizado por Ross et al. (1994), se menciona que las crías de foca común (*Phoca vitulina*) al nacimiento tienen un sistema inmune competente, con muy bajos niveles de anticuerpos IgG que aumentan rápidamente después del calostro y la lactación. Se sabe que la transmisión de anticuerpos en los mamíferos varía de acuerdo al tipo de placentación, la transferencia transplacentaria de IgG en la foca común aparentemente es mínima, consistente con su placentación endoteliocorial, la cual es impermeable a la IgG, al igual que los perros y gatos, que nacen con 5-10% de IgG de la madre. El lobo marino también presenta placentación endoteliocorial (Steward y Steward, 2009), por lo que se esperaría también una mínima transmisión transplacentaria de anticuerpos y más bien se adquieren mayormente por calostro y lactancia. Sin embargo, la lactación en pinnípedos también es muy variable dependiendo el grupo taxonómico, por lo que especies como la foca común sólo lactan por 24 días (Ross et al., 1994) y transfieren anticuerpos más rápidamente que el lobo marino de California que lacta por un año, por lo que la transmisión de anticuerpos maternos para *T. gondii* por leche sería viable. Asimismo, Ross et al. (1994), sugieren que los anticuerpos detectados en las crías (transplacentarios, calostrales o ambos) son un reflejo directo de los anticuerpos presentes en el suero de la madre. Por lo cual, en el presente estudio las crías seropositivas podrían estar reflejando la exposición a *T. gondii* de sus madres y estarían sirviendo como indicadores para la población.

T. gondii tiene un impacto significativo en la reproducción, ya que puede provocar muerte fetal o abortos por una infección transplacentaria, lo que resulta importante para algunas poblaciones de mamíferos marinos en peligro de extinción, como algunas especies de delfines y las nutrias marinas en las que se ha reportado transmisión vertical (Jardine y Dubey, 2002; Resendes et al., 2002; Miller et al., 2008a; Roe et al., 2013). Para los pinnípedos existen reportes de transmisión

vertical en foca común y en lobo marino de California (Van Pelt and Dieterich, 1973; Carlson-Bremer et al., 2015). Por lo que el aporte de este estudio al detectar crías positivas a *T. gondii* es muy valioso para la especie.

Se desconoce el mecanismo a través del cual los lobos marinos silvestres podrían adquirir la infección; en los reportes previos de la especie en cautiverio (Dubey et al., 2003; Alvarado-Esquivel et al., 2012; 2013), los animales positivos no presentaron signos clínicos y se asume que el origen de la infección es la contaminación del agua de los estanques con ooquistes, debido a la presencia de gatos en las instalaciones y descartando la contaminación por comida, debido a que la alimentación es a base de pescado congelado, proceso que inactiva los ooquistes (Dubey et al., 2003).

Las posibles rutas de infección en el lobo marino de California en vida libre serían por la ingestión directa de ooquistes diluidos en el agua o bien por el consumo de organismos filtradores como los bivalvos y algunos peces. Sin embargo, se sabe que los bivalvos no forman parte de su dieta, ya que ésta se conforma principalmente por una gran variedad de peces y algunos cefalópodos (Espinosa de los Reyes, 2007). En un estudio experimental se infectaron peces con ooquistes de *T. gondii*, de las especies sardina (*Sardinops sagax*) y anchoveta (*Engraulis mordax*), demostrando que los ooquistes permanecieron viables e infectantes por al menos 8 horas en el sistema digestivo de los peces (Massie et al., 2010). Por lo que estas especies de peces pudieran ser una de las fuentes de infección de *T. gondii* en lobos marinos, ya que son parte principal de su dieta, además de ser especies migratorias que pudieran estar sirviendo como medio de transporte para los ooquistes de zonas costeras contaminadas a zonas pelágicas. Fujii et al. (2007) menciona que la foca común de Kuril (*Phoca vitulina stejnegeri*) se podría infectar de forma secundaria por el consumo del pulpo gigante del Pacífico norte, que a su vez se alimenta de varios organismos filtradores como los bivalvos, por lo que se podría evaluar esa posibilidad en el lobo marino de California.

La presencia potencial de gatos en las islas, que son los hospederos definitivos de *T. gondii*, puede explicar la presencia del parásito en los lobos marinos y ayudaría a entender la epidemiología de la enfermedad en las islas del Golfo y Pacífico de California, sin embargo esto no explica absolutamente el cómo lobos marinos de otras loberas más alejadas de las islas con presencia de gatos se estarían infectando, al menos que hubiera una contaminación importante del océano con ooquistes provenientes de las principales ciudades costeras de la región.

Varias de las islas del Golfo y Pacífico están catalogadas como Áreas Naturales Protegidas, por lo que no están habitadas y sólo ocasionalmente se utilizan como campamento para pescadores regionales, turistas e investigadores. Los gatos fueron introducidos hace varias décadas por los mismos pescadores y turistas, quienes los bajaban de sus embarcaciones mientras acampaban y muchos de éstos escapaban o no regresaban a tiempo, por lo que se ha mantenido una población residente de gatos ferales desde hace varias décadas (Comunicación personal, CONANP APFF-IGC). En México se han realizado varios esfuerzos por erradicar gatos, teniendo éxito en varias islas del Pacífico y del Golfo (Donlan et al., 2000; Wood et al., 2002). De algunas de estas islas se tomaron muestras de crías de lobos marinos para este estudio, en Natividad y Asunción para el Pacífico y de la lobera Granito que está muy cerca a la isla Mejía para el Golfo. También se tienen registros de la presencia de gatos ferales en la isla Ángel de la Guarda (en la cual se encuentran las loberas de Machos y Cantiles, además de estar muy cercana a la lobera Granito), por la instalación de cámaras trampa (Comunicación personal, Instituto de Ecología, UNAM-CONBIODES-CONANP), por lo que para futuras investigaciones se podría considerar realizar la captura y muestreo de los gatos y realizar pruebas diagnósticas para enfermedades de felinos, como *T. gondii* y evaluar el riesgo epidemiológico de su presencia en las islas, además del ya conocido riesgo ecológico por la depredación de roedores, reptiles y aves endémicas.

Para otro estudio llevado a cabo en la región, se capturó y muestreo un individuo de gato feral en la Isla Ángel de la Guarda, el cual resultó serológicamente positivo a *T. gondii* con absorbancia de 1.45, siendo la del control negativo de 0.51 (CONANP APFF-IGC, datos sin publicar), lo que sugiere que el protozoario está presente y pudiera ser una de las fuentes de infección para los lobos marinos de la región. Se ha reportado presencia de *T. gondii* en gatos, humanos, aves y otros animales, solo en los atolones (islas de origen coralino y en forma de anillo) con presencia de gatos, en comparación con atolones libres de gatos, en los cuales no se encuentra presente, por lo cual se asume que los gatos tienen un importante papel en el mantenimiento del ciclo en ecosistemas delicados y de mucha importancia ecológica como lo son las islas (Wallace et al., 1972). Por lo que algo similar pudiera estar ocurriendo en islas del Pacífico y del Golfo de California.

El riesgo asociado de animales seropositivos con la localización de las loberas en la Península fue mayor para el Pacífico comparado con el Golfo [OR 9.6, IC 2.9-30, $P < 0.0001$] (Ver Cuadro 6). Para el Pacífico, la isla Cedros tuvo mayor número de animales seropositivos, lo cual estaría relacionado con que es la única isla de este estudio con presencia humana (4500 habitantes) y presencia de animales domésticos, incluyendo a los gatos (Samaniego et al., 2007), que serían la fuente de contaminación del ambiente terrestre y marino con los ooquistes. Las islas Asunción y Natividad, también con animales positivos, forman parte de la Reserva de la Biósfera El Vizcaíno, no se encuentran habitadas y se encuentran libres de la presencia de gatos por campañas de erradicación de especies invasoras en los años 1995 y 2000, respectivamente (Donlan et al., 2000; Wood et al., 2002). Para estos casos, la infección podría estar ocurriendo por contaminación marina con ooquistes proveniente de las ciudades cercanas o arrastrados del norte por la corriente de California (Figura 9).

Para el Golfo, el lobo marino positivo en la lobera Los Machos podría estar relacionado con la presencia de gatos ferales en la isla Ángel de la Guarda; y para el caso del animal positivo de la isla Granito también podría deberse a la cercanía

con las islas Ángel de la Guarda y Mejía, esta última con historial de presencia de gatos que se erradicaron en el año 2001 (Donlan et al., 2000; Wood et al., 2002). Sin embargo para el resto de las islas la contaminación con ooquistes tendría que provenir de las ciudades cercanas de ambos lados del Golfo (Figura 9).

La contaminación de las aguas se pudiera deber a que en varias ciudades costeras del Golfo de California se continúan descargando aguas residuales sin previo tratamiento, siendo las principales ciudades costeras más contaminadas: Guaymas, Sonora; Mazatlán, Sinaloa; Bahía de Banderas y San Blas, Jalisco-Nayarit (SEMAR, 2003). El alto Golfo de California presenta también elevada contaminación, la cual se puede deber a la presencia de pocas poblaciones humanas de tamaño considerable como Puerto Peñasco en Sonora y San Felipe, Baja California, así como a descargas del río Colorado y a descargas de los ríos Concepción y Yaqui en México (Arellano y Medrano, 2013). Por lo que cualquiera de estas ciudades costeras y ríos que atraviesan varias ciudades pudieran una posible causa de la diseminación de los ooquistes de *T. gondii* del continente al mar del Golfo de California.

Las corrientes marinas también tienen un papel importante en la diseminación de los ooquistes de *T. gondii*; para el Pacífico, la corriente de California arrastra masas de agua subárticas hacia el Ecuador, movilizando grandes cantidades de agua de ciudades costeras de Estados Unidos hacia México; y en México de importantes ciudades como Ensenada, Tijuana y Rosarito hacia el sur de la Península. Del lado del Golfo, las corrientes que pudieran estar arrastrando los ooquistes serían las del Golfo de California y Costera Mexicana, ambas en dirección de sur a norte, de las costas de Nayarit hacia el norte del Golfo (Durazno et al., 2010; Pantoja et al., 2012).

Existen estudios que confirman el aislamiento genético en lobos marinos del Golfo de California por DNA mitocondrial y por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), que con la mayor diversidad genética encontrada podría significar un mayor riesgo ante la presencia de agentes infecciosos (Maldonado et al., 1995; Bowen et al., 2006; Schramm et al., 2009). Se sabe que las poblaciones de “Golfo norte” y

“Golfo centro” son más vulnerables a desarrollar osteoartritis temporo-mandibular y osteomielitis mandibular comparados con las colonias del Pacífico (Datos sin publicar, Aurióles et al., 2009). También se han reportado altas frecuencias de leptospirosis en el Golfo norte de California (Acevedo-Whitehouse et al., 2003) y para el Pacífico hay una mayor susceptibilidad al nemátodo *Uncinaria spp.*, que se ha considerado una importante causa de mortalidad en crías en la Isla San Miguel (Acevedo-Whitehouse et al., 2006), que es una de las dos loberas más grandes de California y que produce el 42% de las crías de la población en Estados Unidos. Por lo que, el presente estudio es un aporte importante para el entendimiento de los patógenos que circulan en las poblaciones de vida libre de la especie y para tratar de establecer el impacto del parásito en las mismas. Aurióles y Zavala (1994) mencionan que, se debe poner más atención a los estudios referentes a los lobos marinos en el Golfo de California debido a su baja abundancia (31,393 individuos) comparada con las poblaciones del Pacífico.

Con la baja seroprevalencia para *T. gondii* encontrada en este estudio (6%) se puede decir que la enfermedad parece no tener un impacto negativo en las poblaciones de lobo marino de la Península de Baja California. Sin embargo, los casos positivos podrían estar pasando desapercibidos, debido a que los animales muestreados son principalmente crías, ya que como lo reportó Carlson-Bremer et al. (2015), la exposición aumenta con la edad de los individuos.

Sería conveniente en un futuro poder realizar un estudio para evaluar la presencia/ausencia de *T. gondii* en peces y cefalópodos que conforman la dieta del lobo marino (sardinias, anchovetas y pulpo), ya que además son de consumo humano y podrían ser una fuente de transmisión del parásito a ambas especies. También se recomendaría evaluar si los gatos ferales presentes en las islas (Ángel de la Guarda en el Golfo y Cedros en el Pacífico) mantienen un ciclo silvestre de *T. gondii* en la región y lo pudieran estar diseminando. Además, se podría realizar un estudio molecular más completo para determinar los genotipos presentes tanto en los lobos marinos como en los gatos ferales, y así poder rastrear si el origen de la

infección en los lobos marinos está relacionado a la presencia de felinos, similar a lo reportado por Miller et al. (2008b), quienes han rastreado el genotipo X presente en las nutrias marinas en varios felinos cercanos a las costas y en los bivalvos de California, Estados Unidos.

T. gondii es un patógeno zoonótico que pudiera estar infectando al humano a través de los mamíferos marinos, por lo que puede ser un tema de preocupación para la salud pública en comunidades donde se consume su carne, como la Inuit y la Cree en el Ártico (McDonald et al., 1990; Messier et al., 2009). En México, en la actualidad no es muy común el consumo de carne de lobo marino, que solía llevarse a cabo tiempo atrás, por lo que los estudios se deben enfocar al entendimiento de la enfermedad en la especie y el ecosistema marino, para así poder desarrollar planes de manejo de las diferentes poblaciones.

Haciendo referencia al concepto de “Una Salud” (salud humana, de los mamíferos marinos y gatos, así como del ambiente marino), la presencia de *T. gondii* debería de ser monitoreada rutinariamente en las diferentes poblaciones de lobo marino de la Península de Baja California. Además, se debería regular y reglamentar el manejo adecuado de las aguas residuales en las principales ciudades y comunidades costeras de la región y realizar una campaña de educación ambiental para que las poblaciones, principalmente costeras aprendan como hacer la disposición correcta de las heces de sus gatos y así prevenir la contaminación ambiental terrestre y marina con los ooquistes.

CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio sugieren que existe una exposición a *T. gondii* de las crías de lobo marino de California en la Península de Baja California, las cuales están funcionando como centinelas de la salud del ecosistema marino y podrían estarse infectando por transmisión vertical o por la ingesta de los ooquistes presentes en las loberas y provenientes de la contaminación del mar asociada a la presencia de gatos en las islas o ciudades costeras, mayormente del lado del Pacífico.

Este estudio constituye el primer reporte para el diagnóstico de *T. gondii* en las poblaciones silvestres de lobo marino de California que se realiza en México; de igual manera es el primero que lo diagnostica por qPCR en sangre en mamíferos marinos, prueba que demostró ser de mucho valor para mejorar el entendimiento de la distribución del DNA de *T. gondii* en la población estudiada.

REFERENCIAS

- Acevedo-Whitehouse, K., De la Cueva, H., Gulland, F.M.D., Aurióles, G.D., Arellano, C.F., Suárez-Güemes, F. (2003). Evidence of *Leptospira interrogans* infection in California sea lion pups from the Gulf of California. *Journal of Wildlife Diseases*, 39(1), 145-151.
- Acevedo-Whitehouse, K., Spraker, T.R., Lyons, E., Melin, S.R., Gulland, F., DeLong, R.L., Amos, W. (2006). Contrasting effects of heterozygosity on survival and hookworm resistance in California sea lion pups. *Molecular Ecology*, 15, 1973-1982.
- Aguirre, A.A., O'Hara, T.M., Spraker, T.R., Jessup, D.A. (2002). *Monitoring the health and conservation of marine mammals and sea turtles and their ecosystems*. In: Aguirre, A.A., Ostfeld, R.S., Tabor, G.M., House, C.A., Pearl, M.C. (Eds.). *Conservation Medicine: Ecological Health in Practice* (pp. 79-94). New York: Oxford University Press.
- Aguirre, A.A. and Tabor, G.M. (2004). Introduction: Marine vertebrates as sentinels of marine ecosystem health. *EcoHealth*, 1(3), 236-238.
- Aguirre, A.A., Keefe, T.J., Reif, J.S., Kashinsky, L., Yochem, P.K., Saliki, J.T., Stott, J.L., Goldstein, T., Dubey, J.P., Braun, R., Antonelis, G. (2007). Infectious disease monitoring of the endangered Hawaiian monk seal. *Journal of Wildlife Diseases*, 43(2), 229-241.
- Alekseev, A.Y., Rozanova, E.I., Ustinova, E.N., Tumanov, Y.I., Kuvshinova, I.N., Shestopalov, A.M. (2007). The prevalence of antibodies to morbilliviruses, *Brucella*, and *Toxoplasma* in the Black Sea bottlenose dolphin *Tursiops truncatus ponticus* maintained in captivity. *Russian Journal of Marine Biology*, 33(6), 425-428.
- Alekseev, A.Y., Ustinova, E.N., Tumanov, Y.V., Zasytkin, M.Y., Burkanov, V.N., Kuvshinova, I.N., Shestopalov, A.M. (2008). Detection of specific antibodies to morbilliviruses, *Toxoplasma*, and *Brucella* species in eared seals in North-West of Pacific Ocean. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii*, 1, 63-65.
- Alekseev, A.Y., Reguzova, A.Y., Rozanova, E.I., Abramov, A.V., Tumanov, Y.V., Kuvshinova, I.N., Shestopalov, A.M. (2009). Detection of specific antibodies to morbilliviruses, *Brucella* and *Toxoplasma* in the Black Sea dolphin *Tursiops truncatus ponticus* and the beluga whale *Delphinapterus leucas* from the sea of Okhotsk in 2002-2007. *Russian Journal of Marine Biology*, 35(6), 494-497.
- Alvarado-Esquivel, C., Sánchez-Okrucky, R., Dubey, J.P. (2012). Serological evidence of *Toxoplasma gondii* infection in captive marine mammals in Mexico. *Veterinary Parasitology*, 184, 321-324.
- Alvarado-Esquivel, C., Gayosso-Domínguez, E., Villena, I., Dubey, J.P. (2013). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in captive mammals in three zoos in Mexico City, Mexico. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 44(3), 803-806.
- Aramini, J.J., Stephen, C., Dubey, J.P., Engelstoft, C., Schwantje, H., Ribble, C.S. (1999). Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Epidemiology & Infection*, 122(2), 305-315.
- Arellano, P.V.A. y Medrano, G.L. (2013). *Mamíferos marinos en el Golfo de California: macroecología, impacto humano y su perspectiva hacia la conservación* (pp. 97-127). México: UNAM, Coordinación de Estudios de Posgrado.

Arizmendi, M.C. y Márquez, V. (Eds.). (2000). *Áreas de Importancia para la Conservación de las Aves en México* (pp. 440). México: FMCN-CCA-CONABIO-National Fish and Wildlife Foundation-Bird Life International-SEMARNAP-American Bird Conservancy-National Audubon Society-UBIPRO. Iztacala-Natur-UNAM-USAID-The David and Lucille Packard Foundation.

Arkush, K.D., Miller, M.A., Leutenegger, C.M., Gardner, I.A., Packham, A.E., Heckerroth, A.R., Tenter, A.M., Barr, B.C., Conrad, P.A. (2003). Molecular and bioassay-based detection of *Toxoplasma gondii* oocyst uptake by mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *International Journal for Parasitology*, 33, 1080-1097.

Aurioles, G.D. (1987). *Efecto de El Niño 1983 en la población de lobo marino de California en Baja California, México*. XII Reunión Internacional para el Estudio de los Mamíferos Marinos. La Paz, B.C.S.

Aurioles, G.D. (1989). *Mortalidad diferencial por sexo en el lobo marino de California: causas y valor selectivo*. XIV Reunión Internacional para el Estudio de los Mamíferos Marinos. La Paz, B.C.S.

Aurioles, G.D. y Zavala, G.A. (1994). Ecological factors that determine distribution and abundance of the California sea lion *Zalophus californianus* in the Gulf of California. *Ciencias Marinas*, 20, 535-553.

Aurioles, G.D., Godínez, R.C., Hernández, C.C., Santos, P.G.K. (Eds.). (2010). *Taller de análisis del estado de la población de lobo marino de California (Zalophus californianus) en México* (pp. 15-19). La Paz, B.C.S.: CICIMAR-CONANP-INE. (25 y 26 de noviembre de 2010).

Aurioles, G.D. and Trillmich, F. *Zalophus californianus* (IUCN SSC Pinniped Specialist Group 2008). In: IUCN 2015. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. Available from: <www.iucnredlist.org>.

Bahia-Oliveira, L.M., Jones, J.L., Azevedo-Silva, J., Alves, C.C., Oréface, F., Addiss, D.G. (2003). Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 9(1), 55-62.

Bahre, C.J. and Bourillón, L. (2002). *Human impact in the Midriff Islands*. In: Case, T.J., Cody, M.L., Ezcurra, E. (Eds.). *A New Island Biogeography of the Sea of Cortés*, 2nd Ed. (pp. 383-406). New York: Oxford University Press.

Bandoli, J.G. y De Oliveira, C.A.B. (1977). Toxoplasmosis em *Sotalia guianensis* (Van Beneden, 1863) Cetacea-Delphinidae. *Folha Médica*, 75, 459-468.

Barnes, J., Booher, J., Grantham, H., Weylman, B. (1992). *Especies de peces en las aguas circundantes a las Islas Espíritu Santo, La Partida y Los Islotes y su importancia relativa para el lobo común de California y los pescadores de La Paz*. XVII Reunión Internacional para el Estudio de los Mamíferos Marinos. La Paz, B.C.S.

Bernal-Guadarrama, M.J., Salichs, J., Almunia, J., García-Parraga, D., Fernández-Gallardo, N., Santana-Morales, M.A., Pacheco, V., Alfonso-Lehman, R.N., Déniz, D., Lorenzo-Morales, J., Valladares, B., Martínez-Carretero, E. (2014). Development of an indirect immunofluorescence technique for the diagnosis of toxoplasmosis in bottlenose dolphins. *Parasitology Research*, 113, 451-455.

Blanchet, M.A., Godfroid, J., Breines, E.M., Heide-Jorgensen, M.P., Nielsen, N.H., Hasselmeir, I., Iversen, M., Jensen, S.K., Asbakk, K. (2014). West Greenland harbour porpoises assayed for antibodies against *Toxoplasma gondii*: false positives with the direct agglutination method. *Diseases of Aquatic Organisms*, 108, 181-186.

- Bossart, G.D., Mignucci-Giannoni, A.A., Rivera-Guzman, A.L., Jimenez-Marrero, N.M., Camus, A.C., Bonde, R.K., Dubey, J.P., Reif, J.S. (2012). Disseminated toxoplasmosis in Antillean manatees *Trichechus manatus manatus* from Puerto Rico. *Diseases of Aquatic Organisms*, 101, 139-144.
- Bowater, R.O., Norton, J., Johnson, S., Hill, B., O'Donoghue, P., Prior, H. (2003). Toxoplasmosis in Indo-Pacific humpbacked dolphins (*Sousa chinensis*), from Queensland. *Australian Veterinary Journal*, 81(10), 627-632.
- Bowen, L., Aldridge, B.M., DeLong, R., Melin, S., Godínez, C., Zavala, A., Gulland, F., Lowenstine, L., Stott, J.L., Johnson, M.L. (2006). MHC gene configuration variation in geographically disparate populations of California sea lions (*Zalophus californianus*). *Molecular Ecology*, 15(2), 529-533.
- Bowie, W.R., King, A.S., Werker, D.H., Isaac-Renton, J.L., Bell, A., Eng, S.B., Marion, S.A. (1997). Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *The Lancet*, 350(9072), 173-177.
- Buergelt CD and Bonde RK. (1983). Toxoplasmic meningoencephalitis in a West Indian manatee. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 183(11), 1294-1296.
- Cabazos, T. (2008). *Clima*. En: Danemann, G.D. y Ezcurra, E. Bahía de los Ángeles: Recursos Naturales y Comunidad, (pp.67-72). México: Línea Base.
- Cabezón, O., Resendes, A.R., Domingo, M., Raga, J.A., Agustí, C., Alegre, F., Mons, J.L., Dubey, J.P., Almería, S. (2004). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild dolphins from the Spanish Mediterranean Coast. *The Journal of Parasitology*, 90(3), 643-644.
- Cabezón, O., Hall, A.J., Vincent, C., Pabón, M., García-Bocanegra, I., Dubey, J.P., Almería, S. (2011). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in North-eastern Atlantic harbor seal (*Phoca vitulina vitulina*) and grey seal (*Halichoerus grypus*). *Veterinary Parasitology*, 179, 253-256.
- Carlson-Bremer, D., Colegrove, K.M., Gulland, F.M.D., Conrad, P.A., Mazet, J.A.K., Johnson, C.K. (2015). Epidemiology and pathology of *Toxoplasma gondii* in free-ranging California sea lions (*Zalophus californianus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 51(2), 362-373.
- Case, T.J., Cody, M.L., Ezcurra, E. (Eds.). (2002). *A New Island Biogeography of the Sea of Cortés*, 2nd Ed. (pp. 690). New York: Oxford University Press.
- Castillo-Morales, V.J., Acosta, V.K.Y., Guzmán-Marín, E., Jiménez-Coello, M., Segura-Correa, J.C., Aguilar-Caballero, A.J., Ortega-Pacheco, A. (2012). Prevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in domestic cats from the tropics of Mexico using serological and molecular tests. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2012, Article ID 529108.
- Chadwick, E.A., Cable, J., Chinchén, A., Francis, J., Guy, E., Kean, E.F., Paul, S.C., Perkins, S.E., Sherrard-Smith, E., Wilkinson, C., Forman, D.W. (2013). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in the Eurasian otter (*Lutra lutra*) in England and Wales. *Parasites & Vectors*, 6(75), 1-5.
- Cole, R.A., Lindsay, D.S., Howe, D.K., Roderick, C.L., Dubey, J.P., Thomas, N.J., Baeten, L.A. (2000). Biological and molecular characterizations of *Toxoplasma gondii* strains obtained from southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *The Journal of Parasitology*, 86(3), 526-530.
- Colvocoresses, J.A. (2004). *Characterization of the humoral immune system of the Steller sea lion, Eumetopias jubatus, and development of reagents and assays for quantitative measure of humoral immunity*. (178 p). Dissertation Archive. Paper 1901. The University of Southern Mississippi.

- Conrad, P.A., Miller, M.A., Kreuder, C., James, E.R., Mazet, J., Dabritz, H., Jessup, D.A., Gulland, F., Grigg, M.E. (2005). Transmission of *Toxoplasma*: clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. *International Journal for Parasitology*, 35, 1155-1168.
- Costa, J.G., Carneiro, A.C., Tavares, A.T., Andrade, G.M., Vasconcelos-Santos, D.V., Januário, J.N., Menezes-Souza, D., Fujiwara, R.T., Vitor, R.W. (2013). Real-time PCR as a prognostic tool for human congenital toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 51(8), 2766-2768.
- Cruikshank, J.J., Haines, D.M., Palmer, N.C., St. Aubin, D.J. (1990). Cysts of a *Toxoplasma*-like organism in an Atlantic bottlenose dolphin. *The Canadian Veterinary Journal*, 31, 213-215.
- Dabritz, H.A., Atwill, E.R., Gardner, I.A., Miller, M.A., Conrad, P.A. (2006). Outdoor fecal deposition by free-roaming cats and attitudes of cat owners and nonowners toward stray pets, wildlife, and water pollution. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 229(1), 74-81.
- Dardé, M.L. (2004). Genetic analysis in the diversity in *Toxoplasma gondii*. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, 40(1), 57-63.
- De Guise, S., Lagacé, A., Béland, P., Girard, C., Higgins, R. (1995). Non-neoplastic lesions in beluga whales (*Delphinapterus leucas*) and other marine mammals from St Lawrence Estuary. *Journal of Comparative Pathology*, 112, 257-271.
- Derocher, A.E., Wiig, Ø., Andersen, M. (2002). Diet composition of polar bears in Svalbard and the western Barents Sea. *Polar Biology*, 25, 448-452.
- Di Guardo, G., Agrimi, U., Morelli, L., Cardeti, G., Terracciano, G., Kennedy, S. (1995). *Post mortem* investigations on cetaceans found stranded on the coasts of Italy between 1990 and 1993. *The Veterinary Record*, 136(17), 439-442.
- Di Guardo, G., Proietto, U., Di Francesco, C.E., Marsilio, F., Zaccaroni, A., Scaravelli, D., Mignone, W., Garibaldi, F., Kennedy, S., Forster, F., Iulini, B., Bozzetta, E., Casalone, C. (2010). Cerebral toxoplasmosis in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) stranded along the Ligurian Sea coast of Italy. *Veterinary Pathology*, 47(2), 245-253.
- Di Guardo, G., Di Cesare, A., Otranto, D., Casalone, C., Iulini, B., Mignone, W., Tittarelli, C., Meloni, S., Castagna, G., Forster, F., Kennedy, S., Traversa, D. (2011). Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates in meningo-encephalitis affected striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from Italy. *Veterinary Parasitology*, 183, 31-36.
- Di Guardo, G., Di Francesco, C.E., Eleni, C., Cocumelli, C., Scholl, F., Casalone, C., Peletto, S., Mignone, W., Tittarelli, C., Di Nocera, F., Leonardi, L., Fernández, A., Marcer, F., Mazzariol, S. (2013). *Morbillivirus* infection in cetaceans stranded along the Italian coastline: pathological, immunohistochemical and biomolecular findings. *Research in Veterinary Science*, 94, 132-137.
- Domingo, M., Visa, J., Pumarola, M., Marco, A.J., Ferrer, L., Rabanal, R., Kennedy, S. (1992). Pathologic and immunocytochemical studies of Morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Veterinary Pathology*, 1, 1-10.
- Donahoe, S.L., Rose, K., Slapeta, J. (2014). Multisystemic toxoplasmosis associated with type II-like *Toxoplasma gondii* strain in a New Zealand fur seal (*Arctocephalus forsteri*) from New South Wales, Australia. *Veterinary Parasitology*, 205, 347-353.

- Donlan, C.J., Tershy, B.R., Keitt, B.S., Wood, B., Sánchez, J.A., Weinstein, A., Croll, D.A., Aguilar, J.L. (2000). *Island conservation action in northwest Mexico*. In: Browne, D.H., Chaney, H., and Mitchell, K. (Eds.). *Proceedings of the Fifth California Islands Symposium* (pp. 330–338). Santa Barbara, California: Santa Barbara Museum of Natural History.
- Dubey, J.P. (1998). Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 28, 1019-1024.
- Dubey, J.P., Zarnke, R., Thomas, N.J., Wong, S.K., Van Bonn, W., Briggs, M., Davis, J.W., Ewings, R., Mense, M., Kwok, O.C.H., Romand, S., Thulliez, P. (2003). *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. *Veterinary Parasitology*, 116, 275-296.
- Dubey, J.P., Limpscomb, T.P., Mense, M. (2004). Toxoplasmosis in an elephant seal (*Mirounga angustirostris*). *The Journal of Parasitology*, 90(2), 410-411.
- Dubey, J.P., Fair, P.A., Bossart, G.D., Hill, D., Fayer, R., Sreekumar, C., Kwok, O.C.H., Thulliez, P. (2005). A comparison of several serologic tests to detect antibodies to *Toxoplasma gondii* in naturally exposed bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *The Journal of Parasitology*, 91(5), 1074-1081.
- Dubey, J.P., Morales, J.A., Sundar, N., Velmurugan, G.V., González-Barrientos, C.R., Hernández-Mora, G., Su, C. (2007). Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) from Costa Rica. *The Journal of Parasitology*, 93(3), 710-711.
- Dubey, J.P., Fair, P.A., Sundar, N., Velmurugan, G., Kwok, O.C.H., McFee, W.E., Majumdar, D., Su, C. (2008). Isolation of *Toxoplasma gondii* from bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *The Journal of Parasitology*, 94(4), 821-823.
- Dubey, J.P., Mergl, J., Gehring, E., Sundar, N., Velmurugan, G., Kwok, O.C.H., Grigg, M.E., Su, C., Martineau, D. (2009). Toxoplasmosis in captive dolphins (*Tursiops truncatus*) and walrus (*Odobenus rosmarus*). *The Journal of Parasitology*, 95(1), 82-85.
- Dubey, J.P. (2009). History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 39, 877-882.
- Dubey, J.P. (2010). *Toxoplasmosis of animals and humans*, 2nd Ed. (pp. 211-216). Maryland: CRC Press.
- Durazno, R., Ramírez-Manguilar, A.M., Miranda, L.E., Soto-Mardones, L.A. (2010). *Climatología de variables hidrográficas*. En: Gaxiola-Castro, G. y Durazno, R. *Dinámica del ecosistema pelágico frente a Baja California 1997-2007*. Diez años de investigaciones mexicanas de la Corriente de California (pp. 25-57). México: SEMARNAT-INE-CICESE-UABC.
- Enríquez-Andrade, R.R., Anaya-Reyna, G., Barrera-Guevara, J.C., Carvajal-Moreno, M.A., Martínez-Delgado, M.E., Vaca-Rodríguez, J.G., Valdés-Casillas, C. (2005). An analysis of critical areas for biodiversity conservation in the Gulf of California Region. *Ocean & Coastal Management*, 48(1), 31-50.
- Espinosa de los Reyes, A.M.G. (2007). *Variabilidad espacial de la dieta del lobo marino de California (Zalophus californianus californianus, Lesson 1828)*. Tesis, Programa de Posgrado en Ciencias en Ecología Marina. CICESE, Ensenada, Baja California.

- Figuroa-Castillo, J.A., Duarte, R.V., Juárez, A.M., Luna, P.H., Correa, D. (2006). Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from Mexico. *The Journal of Parasitology*, 92(2), 394-395.
- Ford, J.K.B., Ellis, G.M., Barrett-Lennard, L.G., Morton, A.B., Palm, R.S., Balcomb III, K.C. (1998). Dietary specialization in two sympatric populations of killer whales (*Orcinus orca*) in coastal British Columbia and adjacent waters. *Canadian Journal of Zoology*, 76, 1456-1471.
- Forman, D., West, N., Francis, J., Guy, E. (2009). The sero-prevalence of *Toxoplasma gondii* in British marine mammals. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(2), 296-298.
- Fujii, K., Kakumoto, C., Kobayashi, M., Saito, S., Kariya, T., Watanabe, Y., Xuan, X., Igarashi, I., Suzuki, M. (2007). Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in seals around Hokkaido, Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 69(4), 393-398.
- Gajadhar, A.A., Measures, L., Forbes, L.B., Kapel, C., Dubey, J.P. (2004). Experimental *Toxoplasma gondii* infection in grey seals (*Halichoerus grypus*). *The Journal of Parasitology*, 90(2), 255-259.
- Gaydos, J.K., Conrad, P.A., Gilardi, K.V.K., Blundell, G.M., Ben-David, M. (2007). Does human proximity affect antibody prevalence in marine-foraging river otters (*Lontra canadensis*)?. *Journal of Wildlife Diseases*, 43(1), 116-123.
- Godínez, R.C., Zelaya, R.B., Aurióles, G.D., Verdugo, R.A., Rodríguez, R.E.A., De la Peña, M.A. (1999). Antibodies against *Leptospira interrogans* in California sea lion (*Zalophus californianus*) pups from seven islands of the Gulf of California, Mexico. *Journal of Wildlife Diseases*, 35(1), 108-111.
- Godínez, R.C., Santos, P.G.K., Zepeda, L.H., Aguirre, A., Anderson, D.W., Parás, G.A., Velarde, E., Zavala, G.A. (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*, 81, 31-45.
- Gonzales-Viera, O., Marigo, J., Ruoppolo, V., Rosas, F.C.W., Kanamura, C.T., Takakura, C., Fernández, A., Catao-Dias, J.L. (2013). Toxoplasmosis in a Guiana dolphin (*Sotalia guianensis*) from Paraná, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 191, 358-362.
- Greig, D.J., Gulland, F.M.D., Kreuder, C. (2005). A decade of live California sea lion (*Zalophus californianus*) strandings along the central California coast: causes and trends, 1991-2000. *Aquatic Mammals*, 31(1), 11-22.
- Greig, D.J., Gulland, F.M.D., Smith, W.A., Conrad, P.A., Field, C.L., Fleetwood, M., Harvey, J.T., Ip, H.S., Jang, S., Packham, A., Wheeler, E., Hall, A.J. (2014). Surveillance for zoonotic and selected pathogens in harbor seals *Phoca vitulina* from central California. *Diseases of Aquatic Organisms*, 111, 93-106.
- Gulland, F.M.D., Lowenstine, L.J., Colagross, A., Morgan, L., Spraker, T. (1996). *Leptospirosis in marine mammals*. In: Fowler, M.C., Miller, E. (Eds.). *Zoo and Wild Animal Medicine. Current Therapy 4* (pp. 469-471). St. Louis, Missouri: Saunders-Elsevier.
- Gulland, F.M.D., Lowenstine, L.J., Lapointe, J.M., Spraker, T., King, D.P. (1997). Herpesvirus infection in stranded Pacific harbor seals of coastal California. *Journal of Wildlife Diseases*, 33(3), 450-458.

- Hanni, K.D., Mazet, J.A.K., Gulland, F.M.D., Estes, J., Staedler, M., Murray, M.J., Miller, M., Jessup, D.A. (2003). Clinical pathology and assessment of pathogen exposure in southern and Alaskan sea otters. *Journal of Wildlife Diseases*, 39(4), 837-850.
- Holshuh, H.J., Sherrod, A.E., Taylor, C.R., Andrews, B.F., Howard, E.B. (1985). Toxoplasmosis in a feral northern fur seal. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 187(11), 1229-1230.
- Honnold, S.P., Braun, R., Scott, D., Sreekumar, C., Dubey, J.P. (2005). Toxoplasmosis in a Hawaiian monk seal (*Monachus schauinslandi*). *The Journal of Parasitology*, 91(3), 695-697.
- House, C., Aguirre, A.A., House, J.A. (2002). *Emergence of infectious diseases in marine mammals*. In: Aguirre, A.A., Ostfeld, R.S., Tabor, G.M., House, C.A., Pearl, M.C. (Eds.). *Conservation Medicine: Ecological Health in Practice* (pp. 104-117). New York: Oxford University Press.
- Howe, D.K. and Sibley, L.D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *Journal of Infectious Diseases*, 172(6), 1561-1566.
- Howe, D.K., Honoré, S., Derouin, F., Sibley, L.D. (1997). Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(6), 1411-1414.
- INE-SEMARNAP. (2000). *Proyecto para la conservación, manejo y aprovechamiento sustentable de los pinnípedos de México* (pp. 109). México: Subcomité Técnico Consultivo para la Conservación, Recuperación, Investigación, Manejo y Aprovechamiento Sustentable de los Pinnípedos en México y Aguas de Jurisdicción Nacional, Serie PREP: 9, Instituto Nacional de Ecología.
- Inskeep, W., Gardiner, C.H., Harris, R.K., Dubey, J.P., Goldston, R.T. (1990). Toxoplasmosis in Atlantic bottle-nosed dolphins. *Journal of Wildlife Diseases*, 26(3), 377-382.
- Isaac-Renton, J., Bowie, W.R., King, A., Irwin, G.S., Ong, C.S., Fung, C.P., Shokeir, M.O., Dubey, J.P. (1998). Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6), 2278-2280.
- Jalal, S., Nord, C.E., Lappalaian, M., Evengard, B. (2004). Rapid and sensitive diagnosis of *Toxoplasma gondii* infections by PCR. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(10), 937-939.
- Jardine, E.J. and Dubey, J.P. (2002). Congenital toxoplasmosis in a Indo-Pacific bottlenose dolphin (*Tursiops aduncus*). *The Journal of Parasitology*, 88(1), 197-199.
- Jensen, S.K., Aars, J., Lydersen, C., Kovacs, K.M., Asbakk, K. (2010). The prevalence of *Toxoplasma gondii* in polar bears and their marine mammal prey: evidence for a marine transmission pathway?. *Polar Biology*, 33, 599-606.
- Kabay, M. (1996). Toxoplasmosis in a sealion (*Neophoca cinerea*). *Veterinary Pathology Report*, 75, 29-30.
- King, J.E. (1983). *Seals of the World* (pp. 240). United Kingdom: British Museum and Cornell University Press.
- Kirk, C.M., Amstrup, S., Swor, R., Holcomb, D., O'Hara, T.M. (2010). Morbillivirus and *Toxoplasma* exposure and association with hematological parameters for Southern Beaufort Sea polar bears: potential response to infections agents in a sentinel species. *EcoHealth*, 7, 321-331.

- Kompalic-Cristo, A., Frotta, C., Suárez-Mutis, M. Fernandes, O, Britto, C. (2007). Evaluation of a real-time PCR assay based on the repetitive B1 gene for the detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood. *Parasitology Research*. 101(3), 619-6225.
- Kreuder, C., Miller, M.A., Jessup, D.A., Lowenstine, L.J., Harris, M.D., Ames, J.A., Carpenter, T.E., Conrad, P.A., Mazet, J.A.K. (2003). Patterns of mortality in southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*) from 1998-2001. *Journal of Wildlife Diseases*, 39(3), 495-509.
- Kreuder, C., Miller, M.A., Lowenstine, L.J., Conrad, P.A., Carpenter, T.E., Jessup, D.A., Mazet, J.A. (2005). Evaluation of cardiac lesions and risk factors associated with myocarditis and dilated cardiomyopathy in southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *American Journal of Veterinary Research*, 66(2), 289-299.
- Lambourn, D.M., Jeffries, S.J., Dubey, J.P. (2001). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in harbor seals (*Phoca vitulina*) in Southern Puget Sound, Washington. *The Journal of Parasitology*, 87(5), 1197-1198.
- Lapointe, J.M., Duignan, P.J., Marsh, A.E., Gulland, F.M., Barr, B.C., Naydan, D.K., King, D.P., Farman, C.A., Huntingdon, K.A., Lowenstine, L.J. (1998). Meningoencephalitis due to a *Sarcocystis neurona*-like protozoan in Pacific harbor seals (*Phoca vitulina richardsi*). *The Journal of Parasitology*, 84(6), 1184-1189.
- Le Boeuf, B.J., Aurioles, G.D., Condit, R., Fox, C., Gisiner, R., Romero, R., Sinsel, F. (1983). Size and distribution of the California sea lion population in México. *Proceedings of the California Academy of Sciences*, 43(7), 77-85.
- Lefebvre, K.A., Frame, E.R., Gulland, F., Hansen, J.D., Kendrick, P.S., Beyer, R.P., Bammler, T.K., Farin, F.M., Hiolski, E.M., Smith, D.R., Marcinek, D.J. (2012). A novel antibody-based biomarker for chronic algal toxin exposure and sub-acute neurotoxicity. *PLOS ONE*, 7(5), e36213.
- Lindsay, D.S., Phelps, K.K., Smith, S.A., Flick, G., Sumner, S.S., Dubey, J.P. (2001). Removal of *Toxoplasma gondii* oocysts from sea water by eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, Suppl. 197S-198S.
- Lindsay, D.S., Thomas, N.J., Rosypal, A.C., Dubey, J.P. (2001). Dual *Sarcocystis neurona* and *Toxoplasma gondii* infection in a Northern sea otter from Washington state, USA. *Veterinary Parasitology*, 97, 319-327.
- Lindsay, D.S., Collins, M.V., Mitchell, S.M., Cole, R.A., Flick, G.J., Wetch, C.N., Lindquist, A., Dubey, J.P. (2003). Sporulation and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in seawater. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50(6), 687-688.
- Lindsay, D.S. and Dubey, J.P. (2009). Long-term survival of *Toxoplasma gondii* sporulated oocysts in seawater. *The Journal of Parasitology*, 95(4), 1019-1020.
- Lluch, D. (1969). *El lobo marino de California (Zalophus californianus californianus) (Lesson, 1828) (Allen, 1880). Observaciones sobre su ecología y explotación*. México: Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables A.C.
- Lowry, M.S. and Maravilla-Chávez, O. (2005). *Recent abundance of California sea lions in western Baja California, Mexico, and the United States*. In: Garcelon, D.K., Schwemmq, C.A. (Eds.). Sixth California Islands Symposium (pp. 485-497). Ventura, CA: Institute of Wildlife Studies, National Park Service Technical Publication, CHIS-05-01.

- Lynch, M., Nielsen, O., Duignan, P.J., Kirkwood, R., Hoskins, A., Arnould, J.P.Y. (2011). Serologic survey for potential pathogens and assessment of disease risk in Australian fur seals. *Journal of Wildlife Diseases*, 47(3), 555-566.
- Maldonado, J.E., Davila, F.O., Steward, B.S., Geffen, E., Wayne, R.K. (1995). Intraspecific genetic differentiation in California sea lions (*Zalophus californianus*) from southern California and the Gulf of California. *Marine Mammal Science*, 11(1), 46-58.
- Massie, G.N., Ware, M.W., Villegas, E.N., Black, M.W. (2010). Uptake and transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by migratory, filter-feeding fish. *Veterinary Parasitology*, 169, 296-303.
- Mate, B.R. and DeMaster, D.P. (1986). *California Sea Lion*. In: Haley, D. (Ed.). *Marine Mammals of the Eastern North Pacific and Arctic Waters*, 2nd Ed. (196-201 pp.). Seattle, WA: Pacific Search Press.
- Mathews, P.D., Da Silva, V.M.F., Rosas, F.C.W., Neto, J.A.A., Lazzarini, S.M., Ribeiro, D.C., Dubey, J.P., Vasconcellos, S.A., Gennari, S.M. (2012). Occurrence of antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Leptospira* spp. in manatees (*Trichechus inunguis*) of the Brazilian Amazon. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 43(1), 85-88.
- Mathews, P.D., Sanchez, N.P., Mathews, J.P.D., Biffi, C.G., Malheiros, A.F., Garcia, C.R.D. (2013). Detection of infection with *Toxoplasma gondii* in manatees (*Trichechus inunguis*) of the Peruvian Amazon. *Acta Biológica Colombiana*, 18(1), 211-216.
- Mazzariol, S., Marcer, F., Mignone, W., Serracca, L., Gorla, M., Marsili, L., Di Guardo, G., Casalone, C. (2012). *Dolphin Morbillivirus* and *Toxoplasma gondii* coinfection in a Mediterranean fin whale (*Balaenoptera physalus*). *BMC Veterinary Research*, 8(20).
- McDonald, J.C., Gyorkos, T.W., Alberton, B., MacLean, J.D., Richer, G., Juraneck, D. (1990). An outbreak of toxoplasmosis in pregnant women in Northern Québec. *The Journal of Infectious Diseases*, 161, 769-774.
- Measures, L.N., Dubey, J.P., Labelle, P., Martineau, D. (2004). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Canadian pinnipeds. *Journal of Wildlife Diseases*, 40(2), 294-300.
- Mellink, E. (2001). *Las islas*. En: Robles-Gil, P., Ezcurra, E., Mellink, E. (Comps.). *El Golfo de California. Un mundo aparte* (pp. 91-109). México: Pegaso-Casa Lamm-Sierra Madre.
- Messier, V., Lévesque, B., Proulx, J.F., Rochete, L., Libman, M.D., Ward, B.J., Serhir, B., Couillard, M., Ogden, N.H., Dewailly, E., Hubert, B., Déry, S., Barthe, C., Murphy, D., Dixon, B. (2009). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* among Nunavik Inuit (Canada). *Zoonoses and Public Health*, 56, 188-197.
- Migaki, G., Allen, J.F., Casey, H.W. (1977). Toxoplasmosis in a California sea lion (*Zalophus californianus*). *American Journal of Veterinary Research*, 38(1), 135-136.
- Migaki, G., Sawa, T.R., Dubey, J.P. (1990). Fatal disseminated toxoplasmosis in a spinner dolphin (*Stenella longirostris*). *Veterinary Pathology*, 27, 463-464.
- Mikaelian, I., Boisclair, J., Dubey, J.P., Kennedy, S., Martineau, D. (2000). Toxoplasmosis in beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St Lawrence Estuary: two case reports and a serological survey. *Journal of Comparative Pathology*, 122, 73-76.
- Miller, M.A., Sverlow, K., Crosbie, P.R., Barr, B.C., Lowenstine, L.J., Gulland, F.M., Packham, A., Conrad, P.A. (2001). Isolation and characterization of two parasitic protozoa from a Pacific harbor

seal (*Phoca vitulina richardsi*) with meningoencephalomyelitis. *The Journal of Parasitology*, 87(4), 816-822.

Miller, M.A., Gardner, I.A., Packham, A., Mazet, J.K., Hanni, K.D., Jessup, D., Estes, J., Jameson, R., Dodd, E., Barr, B.C., Lowenstine, L.J., Gulland, F.M., Conrad, P.A. (2002a). Evaluation of an indirect fluorescent antibody test (IFAT) for demonstration of antibodies to *Toxoplasma gondii* in the sea otter (*Enhydra lutris*). *The Journal of Parasitology*, 88(3), 594-599.

Miller, M.A., Gardner, I.A., Kreuder, C., Paradies, D.M., Worcester, K.R., Jessup, D.A., Dodd, E., Harris, M.D., Ames, J.A., Packham, A.E., Conrad, P.A. (2002b). Coastal freshwater runoff is a risk factor for *Toxoplasma gondii* infection of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *International Journal for Parasitology*, 32, 997-1006.

Miller, M.A., Grigg, M.E., Kreuder, C., James, E.R., Melli, A.C., Crosbie, P.R., Jessup, D.A., Boothroyd, J.C., Brownstein, D., Conrad, P.A. (2004). An unusual genotype of *Toxoplasma gondii* is common in California sea otters (*Enhydra lutris nereis*) and is a cause of mortality. *International Journal for Parasitology*, 34, 275-284.

Miller, M.A. (2007). *Tissue cyst-forming coccidian of marine mammals*. In: Fowler, M.E., Miller, R.E. (Eds.). *Zoo and Wild Animal Medicine. Current Therapy 6* (pp. 319-340). St. Louis, Missouri: Saunders-Elsevier.

Miller, M.A., Conrad, P.A., James, E.R., Packham, A., Toy-Choutka, S., Murray, M.J., Jessup, D., Grigg, M. (2008a). Transplacental toxoplasmosis in a wild southern sea otter (*Enhydra lutris nereis*). *Veterinary Parasitology*, 153, 12-18.

Miller, M.A., Miller, W.A., Conrad, P.A., James, E.R., Melli, A.C., Leutenegger, C.M., Dabritz, H.A., Packham, A.E., Paradies, D., Harris, M., Ames, J., Jessup, D.A., Worcester, K., Grigg, M.E. (2008b). Type X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and terrestrial carnivores from coastal California: New linkages between terrestrial mammals, runoff and toxoplasmosis of sea otters. *International Journal for Parasitology*, 38, 1319-1328.

Moore, S.E. (2008). Marine mammals as ecosystem sentinels. *Journal of Mammalogy*, 89(3), 534-540.

Murata, K., Mizuta, K., Imazu, K., Teresawa, F., Taki, M., Endoh, T. (2004). The prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild and captive cetaceans from Japan. *The Journal of Parasitology*, 90(4), 896-898.

Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. "Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo". Diario Oficial de la Federación, Segunda Sección, SEMARNAT, (30 de diciembre de 2010).

Oksanen, A., Tryland, M., Johnsen, K., Dubey, J.P. (1998). Serosurvey of *Toxoplasma gondii* in North Atlantic marine mammals by the use of agglutination test employing whole tachyzoites and dithiothreitol. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 21, 107-114.

Oksanen, A., Asbakk, K., Prestrud, K.W., Aars, J., Derocher, A.E., Tryland, M., Wiig, Ø., Dubey, J.P., Sonne, C., Dietz, R., Andersen, M., Born, E.W. (2009). Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in polar bears (*Ursus maritimus*) from Svalbard and East Greenland. *The Journal of Parasitology*, 95(1), 89-94.

- Omata, Y., Oikawa, H., Kanda, M., Mikazuki, K., Dilorenzo, C., Claveria, F.G., Takahashi, M., Igarashi, I., Saito, A., Suzuki, N. (1994). Transfer of antibodies to kittens from mother cats chronically infected with *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology*, 52, 211-218.
- Omata, Y., Hammond, T., Itoh, K., Murata, K. (2005). Antibodies against *Toxoplasma gondii* in the Pacific bottlenose dolphin (*Tursiops aduncus*) from the Solomon Islands. *The Journal of Parasitology*, 91(4), 965-967.
- Omata, Y., Umeshita, Y., Watarai, M., Tachibana, M., Sasaki, M., Murata, K., Yamada, T.K. (2006). Investigation for presence of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Brucella*-species infection in killer whales (*Orcinus orca*) mass-stranded on the Coast of Shiretoko, Hokkaido, Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 68(5), 523-526.
- Orr, R.T., Schonewald, J., Kenyon, K.W. (1970). The California sea lion: skull growth and a comparison of two populations. *Proceedings of the California Academy of Sciences*, 37(11), 381:394.
- Packham, A.E., Sverlow, K.W., Conrad, P.A., Loomis, E.F., Rowe, J.D., Anderson, M.L., Marsh, A.E., Cray, C., Barr, B.C. (1998). A modified agglutination test for *Neospora*: Development, optimization and comparison to the IFAT and ELISA. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 5, 467-473.
- Pantoja, D.A., Marinone, S.G., Parés-Sierra, A., Gómez-Valdivia, F. (2012). Modelación numérica de la hidrografía y circulación estacional y de mesoescala en el Pacífico central mexicano. *Ciencias Marinas*, 38(2), 363-379.
- Peterson, R.S. and Bartholomew, G.A. (1967). The natural history and behavior of the California sea lion. *Special Publication (American Society of Mammalogists)*, 1, 79.
- Philippa, J.D.W., Leighton, F.A., Daoust, P.Y., Nielsen, O., Pagliarulo, M., Schwantje, H., Shury, T., Van Herwijnen, R., Martina, B.E.E., Kuiken, T., Van de Bildt, M.W.G., Osterhaus, M.E. (2004). Antibodies to selected pathogens in free-ranging terrestrial carnivores and marine mammals in Canada. *The Veterinary Record*, 155, 135-140.
- Pretti, C., Mancianti, F., Nardoni, S., Ariti, G., Monni, G., Di Bello, D., Marsili, S., Papini, R. (2010). Detection of *Toxoplasma gondii* infection in dolphins stranded along the Tuscan coast, Italy. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 161(10), 428-431.
- Rah, H., Chomel, B.B., Follmann, E.H., Kasten, R.W., Hew, C.H., Farver, T.B., Garner, G.W., Amstrup, S.C. (2005). Serosurvey of selected zoonotic agents in polar bears (*Ursus maritimus*). *The Veterinary Record*, 156, 7-13.
- Ratcliffe, H.L. and Worth, C.B. (1951). Toxoplasmosis of captive wild birds and mammals. *The American Journal of Pathology*, 27(4), 655-667.
- Reindjers, P., Brasseur, S., Van der Toorn, J., Van der Wolf, P., Boyd, I., Harwood, J., Langne, D., Lowry, L. (1994). *Seals, Fur Seals, Sea Lions and Walrus. Status Survey and Conservation Action Plan*. United Kingdom: IUCN-SSC Seal Specialist Group.
- Rengifo-Herrera, C., Ortega-Mora, L.M., Álvarez-García, G., Gómez-Bautista, M., García-Párraga, D., García-Peña, F.J., Pedraza-Díaz, S. (2012). Detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in Antarctic pinnipeds. *Veterinary Parasitology*, 190, 259-262.
- Resendes, A.R., Almería, S., Dubey, J.P., Obón, E., Juan-Sallés, C., Degollada, E., Alegre, F., Cabezón, O., Pont, S., Domingo, M. (2002). Disseminated toxoplasmosis in a Mediterranean

- pregnant Risso's dolphin (*Grampus griseus*) with transplacental fetal infection. *The Journal of Parasitology*, 88(5), 1029-1032.
- Riedman, M.L. and Estes, J.A. (1990). *The sea otter (Enhydra lutris): behavior, ecology, and natural history*. In: U.S. Department of the Interior. Fish and Wildlife Service. Biological Report. Washington D.C. September, 90(14), 126.
- Roe, W.D., Howe, L., Baker, E.J., Burrows, L., Hunter, S.A. (2013). An atypical genotype of *Toxoplasma gondii* as a cause of mortality in Hector's dolphins (*Cephalorhynchus hectori*). *Veterinary Parasitology*, 192, 67-74.
- Ross, P.S., De Swart, R.L., Visser, I.K.G., Vedder, L.J., Murk, W., Bowen, W.D., Osterhaus, A.D.M.E. (1994). Relative immunocompetence of the newborn harbour seal, *Phoca vitulina*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 42, 331-348.
- Saeij, J.P., Boyle, J.P., Boothroyd, J.C. (2005). Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends in Parasitology*, 21(10), 476-481.
- Samaniego, H.A., Peralta, G.A., Aguirre, M.A. (Eds.). (2007). *Vertebrados de las islas del Pacífico de Baja California. Guía de Campo* (pp.130-155). México: Grupo de Ecología y Conservación de Islas A.C.
- Sánchez, M. y Morales-Vela, B. (1992). *Análisis de la dieta del lobo marino Zalophus californianus en las Islas Ángel de la Guarda y Granito, Golfo de California, México*. XVII Reunión Internacional para el Estudio de los Mamíferos Marinos. La Paz, B.C.S.
- Santos, P.S., Albuquerque, G.R., Da Silva, V.M.F., Martin, A.R., Marvulo, M.F.V., Souza, S.L.P., Ragozo, A.M.A., Nascimento, C.C., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Silva, J.R.C. (2011). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in free-living Amazon River dolphins (*Inia geoffrensis*) from central Amazon, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 183, 171-173.
- Schaefer, J.J., White, H.A., Schaaf, S.L., Mohammed, H.O., Wade, S.E. (2012). Chimeric protein A/G conjugate for detection of anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin G in multiple animal species. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24(3), 572-575.
- Schramm, Y., Mesnick, S.L., De la Rosa, J., Palacios, D.M., Lowry, M.S., Aurióles, G.D., Snell, H.M., Escorza, T.S. (2009). Phylogeography of California and Galápagos sea lions and population structure within the California sea lion. *Marine Biology*, 156, 1375-1387.
- Schulman, F.Y., Lipscomb, T.P., Moffet, D., Krafft, A.E., Lichy, J.H., Tsai, M.M., Taubenberger, J.K., Kennedy, S. (1997). Histologic, immunohistochemical, and polymerase chain reaction studies of bottlenose dolphins from the 1987-1988 United States Atlantic coast epizootic. *Veterinary Pathology*, 34, 288-295.
- Sedlák, K. and Bártová, E. (2006). Seroprevalences of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in zoo animals. *Veterinary Parasitology*, 136, 223-231.
- SEMAR (2003). *Atlas de contaminación marina, calidad del agua en diferentes regiones del Golfo de California*. Campaña de monitoreo. México: Secretaría de Marina.
- Sepúlveda, M.Z., Seguel, M., Alvarado-Rybak, M., Verdugo, C., Muñoz-Zanzi, C., Tamayo, R. (2015). Postmortem findings in four south american sea lions (*Otaria byronia*) from an urban colony in Valdivia, Chile. *Journal of Wildlife Diseases*, 51(1), 279-282.

- Simon, A., Chambellant, M., Ward, B.J., Simard, M., Proulx, J.F., Levesque, B., Bigras-Poulin, M., Rousseau, A.N., Ogden, N.H. (2011). Spatio-temporal variations and age effect on *Toxoplasma gondii* seroprevalence in seals from the Canadian Arctic. *Parasitology*, 138, 1362-1368.
- Sobrino, R., Cabezón, O., Millán, J., Pabón, M., Arnal, M.C., Luco, D.F., Gortázar, C., Dubey, J.P., Almeria, S. (2007). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild carnivores from Spain. *Veterinary Parasitology*, 148, 187-192.
- Soulé, M.E. (2002). *Foreword: Giant Moths and Doing No Harm*. In: Aguirre, A.A., Ostfeld, R.S., Tabor, G.M., House, C.A., Pearl, M.C. (Eds.). *Conservation Medicine: Ecological Health in Practice* (pp. VII-IX). New York: Oxford University Press.
- Steward, R.E.A. and Steward, B.E. (2009). *Female Reproductive Systems*. In: Perrin, W.F., Würsig, B., Thewissen, J.G.M. (Eds.). *Encyclopedia of Marine Mammals*, 2nd Ed. (pp. 423-429). London: Academic Press.
- Sundar, N., Cole, R.A., Thomas, N.J., Majumdar, D., Dubey, J.P., Su, C. (2008). Genetic diversity among sea otter isolates of *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology*, 151, 125-132.
- Szteren, D., Auriolles, G.D., Gerber, L. (2006). *Population status and trend of the California sea lion (Zalophus californianus californianus) in the Gulf of California, Mexico*. In: Trites, A.W., Atkinson, S.K., DeMaster, D.P., Fritz, L.W., Gelatt, T.S., Rea, L.D., Wynne, K.M. (Eds.). *Sea Lions of the World* (pp. 369-384). Alaska: 22nd Lowell Wakefield Fisheries Symposium, Alaska Sea Grant College Program, University of Alaska Fairbanks.
- Tabor, G.M., Ostfeld, R.S., Poss, M., Dobson, A.P., Aguirre, A.A. (2001). *Conservation biology and health sciences: defending the research priorities of conservation medicine*. In: Soulé, M.E. and Orians, G.H. (Eds.). *Research Priorities for Conservation Biology*, 2nd Ed. (pp. 165-173). Washington, DC: Island Press.
- Tabor, G.M. and Aguirre, A.A. (2004). Ecosystem health and sentinel species: adding an ecological element to the proverbial "canary in the mineshaft". *EcoHealth*, 1(3), 226-228.
- Tenter, A.M., Heckenroth, A.R., Weiss, L.M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*, 30, 1217-1258.
- Thomas, N.J. and Cole, R.A. (1996). The risk of disease and threats to the wild population: Conservation and management of the southern sea otter. *Endangered Species Update (Special Issue)*, 13(12), 23-27.
- Tocidowski, M.E., Lappin, M.R., Sumner, P.W., Stoskopf, M.K. (1997). Serologic survey for toxoplasmosis in river otters. *Journal of Wildlife Diseases*, 33(3), 649-652.
- Tollu, B.A. (1986). *Phoques, morses, otaries. Écologie et vie sociale*, Collection "Science et découvertes", (pp. 11-48). Monaco: Le Rocher.
- Van Bresseem, M.F., Raga, J.A., Di Guardo, G., Jepson, P.D., Duignan, P.J., Siebert, U., Barrett, T., Santos, M.C.O., Moreno, I.B., Siciliano, S., Aguilar, A., Van Waerebeek, K. (2009). Emerging infectious diseases in cetaceans worldwide and the possible role of environmental stressors. *Diseases of Aquatic Organisms*, 86, 143-157.
- Van Pelt, R.W. and Dieterich, R.A. (1973). Staphylococcal infection and toxoplasmosis in a young harbor seal. *Journal of Wildlife Diseases*, 9(3), 258-261.

Wallace, G.D., Marshall, L., Marshall, M. (1972). Cats, rats, and toxoplasmosis on a small Pacific island. *American Journal of Epidemiology*, 95(5), 475-482.

Wilcox, B.A. and Aguirre, A.A. (2004). One ocean, one health. *EcoHealth*, 1(3), 211-212.

Wood, B., Tershy, B.R., Hermosillo, M.A., Donlan, C.J., Sánchez, J.A., Keitt, B.S., Croll, D.A., Howald, G.R., Biavaschi, N. (2002). *Removing cats from islands in north-west Mexico*. In: Veitch, C.R. and Clout, M.N. (Eds.). *Turning the tide: the eradication of invasive species* (pp. 374–380). Switzerland: World Conservation Union.

Zavala, G.A. (1999). *El lobo marino de California (Zalophus californianus) y su relación con la pesca en la Región de las Grandes Islas, Golfo de California, México* (pp. 169). Tesis, Programa de Posgrado en Ciencias en Ecología Marina. CICESE, Ensenada, Baja California.

Zavala, G.A., Godínez, C., Enríquez, R. (2004). *La conservación de las islas del Mar de Cortés: experiencias en Baja California*. In: Rivera, A.E., Villalobos, J.G., Azuz, A.I., Rosado, M.F. (Eds.). *El Manejo Costero en México* (pp. 353-365). México: Universidad Autónoma de Campeche, SEMARNAT, CETYS-Universidad de Quintana Roo.

Zhang, D., Wang, Z., Fang, R., Nie, H., Feng, H., Zhou, Y., Zhao, J. (2010). Use of protein AG in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in four species of animals. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(3), 485-486.

ANEXOS

Anexo 1 - ELISA indirecto

Kit comercial - Toxo IgG (Human ®)

Los micropocillos ELISA ya vienen recubiertos con antígeno de *T. gondii* preparado con taquizoitos sonicados.

En la primera etapa de incubación, se adicionan 100 µl por pozo de: los sueros de lobo marino de California, los controles de sueros conocidos de perros y los controles propios del kit (diluidos en una relación 1:100 en amortiguador de fosfatos 10 mM/l con NaCl 8 g/l y albúmina 10 g/l a una pH de 6.5±0.2). La placa se cubre con tiras adhesivas y se incuba por 30 minutos a una temperatura de 17-25°C. Los componentes excesivos son eliminados por 4 lavados con la solución de lavado (Buffer TRIS 10 mM/l y NaCl 8 g/l a un pH de 7.2±0.2 en una relación 1:20 con agua desionizada).

En la segunda etapa de incubación, se añade el conjugado anti-IgG (anticuerpos anti IgG-canino, marcados con peroxidasa) a una dilución 1:5000. La placa se cubre con tiras adhesivas y se incuba por 30 minutos a una temperatura de 17-25°C. Los componentes excesivos son eliminados por 5 lavados con la solución de lavado.

En la tercera etapa se añade 100 µl de sustrato por pozo (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) 1.2 mM/l con peróxido de hidrógeno 3 mM/l a un pH de 3.7±0.2. Se deja incubar por 15 minutos a una temperatura de 17-25°C y se observa una coloración azul. La reacción se para con ácido sulfúrico 0.5 mol/l y cambia el color azul a amarillo (la intensidad de este color es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos en la muestra).

Los valores de absorbancia fueron obtenidos a 450 nm de longitud de onda en un lector de micropocillos (espectrofotómetro) de ELISA automatizado (XMark ®, Bio-Rad).

Notas:

Todos los reactivos del kit deben estar a temperatura ambiente antes del uso

Como testigos positivos se utilizaron sueros de perros domésticos previamente confirmados en el laboratorio y como testigo negativo se utilizó suero comercial negativo a *T. gondii*.

Los resultados se obtuvieron por comparación con el valor de punto de corte del kit ("cut-off value" o "CC"). Los valores iguales o mayores al promedio de los CC más el 15% fueron considerados como positivos (Absorbancias ≥ 0.180).

Anexo 2 - Extracción de DNA de sangre

Protocolo: Purificación de DNA total de muestras sanguíneas (DNeasy Blood & Tissue ®, QIAGEN)

Consideraciones:

- Realizar todos los pasos en campana de extracción
- Todos los pasos de centrifugación son llevados a cabo a temperatura ambiente (15-25°C) en una microcentrífuga.
- Realizar vortex por 5-10 segundos.
- Pre-calentar el termociclador a 56°C.

Procedimiento modificado por Jalal et al., 2004

1. Muestras de sangre (1 ml) se alicuotan en 2 tubos de microcentrífuga de 2 ml (500 µl en cada tubo).
2. Muestras de sangre se lisan mediante adición de volumen igual de buffer de lisis AL (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 0.32 mM sacarosa y Triton X-100 1% v/v).
3. Los lisados son mezclados brevemente en vortex, incubados en hielo por 5 minutos y centrifugados a 8000 g / 3 minutos.
4. Los sobrenadantes son descartados y el pellet es re-suspendido en 0.1 ml (100 µl) de buffer de lisis AL.
5. Realizar una breve centrifugación (8000 g / 2 minutos) y combinar el sobrenadante de los 2 tubos para obtener un volumen total de 0.2 ml (200 µl).

Protocolo QIAGEN (Columnas)

1. Pipetear 20 µl de proteinasa K al tubo de microcentrífuga con la muestra sanguínea de 200 µl, para obtener un volumen total de 220 µl y dar vortex inmediatamente.
2. Incubar a 56°C por 10 minutos
3. Añadir 200 µl de etanol (96-100%) a la muestra y mezclar con vortex.
4. Pipetear la muestra en las mini columnas DNeasy, colocadas en tubos colectores de 2 ml. Centrifugar a 6000 g (8000 rpm) por 1 minuto. Descartar el líquido eluído con todo y el tubo colector.
5. Colocar la mini columna en un tubo colector nuevo de 2 ml, añadir 500 µl de buffer AW1 y centrifugar a 6000 g (8000 rpm) por 1 minuto. Descartar líquido eluído y el tubo colector.
6. Colocar la mini columna en un tubo colector nuevo de 2 ml, añadir 500 µl de buffer AW2 y centrifugar a 20,000 g (14,000 rpm) por 3 minutos para secar la membrana DNeasy. Descartar líquido eluído y el tubo colector.
7. Colocar la mini columna en un tubo limpio de microcentrífuga de 1.5 o 2 ml y pipetear 100 µl de buffer AE directamente en la membrana DNeasy. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto y centrifugar a 6000 g (8000 rpm) por 1 minuto para eluir el DNA. ELUCIÓN 1. Alicuotar en 2 tubos (50 µl en c/u).

Anexo 3 - Histopatología

Una vez fijados los tejidos en formaldehído amortiguado:

Se cortaron secciones de 0.5 cm de grosor y se incluyeron en casetes de plástico, depositándose para su procesamiento automatizado en un histoquinete.

Los tejidos incluidos se deshidrataron con serie ascendente de etanoles (80, 95 y 100%), alcohol absoluto-xileno (relación 1:1) y posteriormente se depositaron en dos cambios xilol y uno final en parafina.

Después de la primera exposición en parafina, los tejidos se retiraron del casete y se incluyeron en el mismo casete y se embebieron en parafina líquida, dejando solidificar a temperatura ambiente por 15 a 40 minutos.

Una vez procesados los tejidos y solidificada la parafina, se cortaron secciones de 5 a 7 μm de grosor con un microtomo.

Los cortes se extendieron en baño de flotación, se recuperaron montándose en portaobjetos y se colocaron en platina caliente (37-40 °C) para su desparafinación.

Finalmente los cortes histológicos se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE), para su posterior revisión por microscopía óptica.