



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**ANÁLISIS SOBRE LA PRESENCIA DE
MORBILLIVIRUS EN UNA POBLACIÓN DE
MANATÍES ANTILLANOS (*Trichechus manatus
manatus*) EN VILLAHERMOSA, TABASCO, MÉXICO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

BLANCA VALLADARES RIVEROLL

ASESORES:

Dr. Daniel Martínez Gómez
M C José Ramírez Lezama



México D.F

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a la memoria de mis abuelos, Francisco y Úrsula.

A mis padres por ser mi soporte, por estar conmigo siempre. Este trabajo es resultado de un gran esfuerzo que no hubiera podido concluir sin su gran apoyo y comprensión, de los cuales me siento bendecida.

A mis hermanas por todas las experiencias, por todas las pláticas y sobre todo por su presencia siempre.

A Alberto, por tu amor, cariño y apoyo en este arduo camino de la investigación, por los buenos y malos momentos en donde siempre has estado y por tu fuerte carácter, comprensión e infinita paciencia. Eres una persona maravillosa.

A mi abuela Lita, por tu fortaleza al cuidar a esta familia tan grande.

A Pato por su constante preocupación e interés sobre este trabajo.

A la familia López Herrera, por sus oraciones, aliento y apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no habría sido posible sin el extraordinario apoyo que mi asesor de tesis, el Dr. Daniel Martínez Gómez, me brindó desde el primer momento; admirable como siempre por tu conocimiento y enorme lado humano. Eres a quien le expreso mi mayor gratitud.

A Pepetón por brindarme la confianza y la oportunidad de realizar este proyecto. Gracias por tu apoyo y amistad.

Agradezco especialmente al Dr. León David Olivera-Gómez por permitirme participar en el trabajo de campo, en la captura de los manatíes y la colecta de muestras. Por su apoyo y préstamo del equipo utilizado para realizar este trabajo. Finalmente, por darme el privilegio de conocer su trabajo y el de algunos de los principales investigadores en el campo de los sirénidos.

A Larisa y Estelita por sus conocimientos, enseñanzas, amistad y apoyo durante todo el trabajo, no hubiera podido concluir esto sin su orientación y atinados consejos.

Agradezco el apoyo invaluable de los miembros de mi jurado: MVZ. Laura Patricia Noé Martínez, MVZ. Daniel Atilano López, MVZ. Juan A. Rivera Rebolledo y MVZ. Gerardo Suzán Azpiri, por haber contribuido a enriquecer este trabajo.

A todos mis compañeros de la UAM-Xochimilco por sus enseñanzas, pero especialmente a Luis, Angie y Osvaldo su amistad, ocurrencias, consejos y ayuda han sido indispensables. Nada de este trabajo hubiera sido lo mismo sin ustedes.

A Citlalin, Sve, Beto, Chio, Mayra, Ale, Juan, Esteban y aquellos amigos que por alguna razón he olvidado podido mencionar, gracias por su amistad y por formar parte de mis mejores y peores momentos.

Finalmente, agradezco el apoyo otorgado para la realización de este trabajo al proyecto

PAPIIT No. IN222307.

CONTENIDO

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. JUSTIFICACIÓN	22
3. HIPÓTESIS	22
4. OBJETIVO GENERAL	23
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
6. MATERIAL Y MÉTODOS	24
POBLACIÓN DE ESTUDIO Y TOMA DE MUESTRAS	24
TRANSCRIPCIÓN REVERSA ACOPLADA A LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)	26
DISEÑO DE INICIADORES PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL CONTROL DE AMPLIFICACIÓN INTERNA (CAI) Y MORBILLIVIRUS	27
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL CAI	31
CLONACIÓN DEL CAI	33
EXTRACCIÓN DEL PLÁSMIDO PARA EL CAI MEDIANTE LISIS ALCALINA	34
SELECCIÓN DE PLÁSMIDOS EN DIRECCIÓN	35
PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS	37
TRANSFECCIÓN DEL PLÁSMIDO EN CÉLULAS RENALES DE MONO VERDE (VERO)	37
CÉLULAS VERO Y CÉLULAS RENALES DE PERRO (MDCK) UTILIZADAS EN CULTIVO CELULAR PARA LA EXTRACCIÓN DE ARN	39

EXTRACCIÓN DE ARN A PARTIR DE CULTIVO CELULAR Y MUESTRAS DE HISOPOS NASALES	39
RT-PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL CAI Y MORBILLIVIRUS	41
RT-PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MORBILLIVIRUS	42
INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO (ELISA)	43
PREPARACIÓN DE LOS ANTÍGENOS EMPLEADOS EN LA PRUEBA DE ELISA	43
EVALUACIÓN DE LOS SUEROS CONTROL	45
PROCEDIMIENTO DEL ELISA	46
7. RESULTADOS	48
PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL CAI	48
DISEÑO Y CLONACIÓN DEL CAI	49
RT-PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL CAI Y MORBILLIVIRUS	52
RT-PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MORBILLIVIRUS	53
ELISA	54
8. DISCUSIÓN	59
9. CONCLUSIONES	66
10. PERSPECTIVAS	66
LITERATURA CITADA	67

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Figura 1. Esquema de la estructura de un morbillivirus	8
Figura 2. Posición de los genes para el género <i>Morbillivirus</i>	8
Figura 3. Mapa de distribución mundial del orden Sirenia	16
Figura 4. Mapa de distribución geográfica del manatí de las Antillas	17
Figura 5. Mapa de distribución en México de <i>Trichechus manatus manatus</i>	19
Figura 6. Áreas con mayor presencia de manatíes en el estado de Quintana Roo	20
Figura 7. Mapa de localización de la Laguna de las Ilusiones, en Villahermosa, Tabasco	24
Figura 8. Homología del iniciador Morb-1	28
Figura 9. Homología del iniciador Morb-2	29
Figura 10. Homología del iniciador Morb(II)-1	30
Figura 11. Homología del iniciador Morb(II)-2	31
Figura 12. Constantes de la PCR para amplificación del CAI	32
Figura 13. Esquema del vector comercial pcDNA 3.1/V5-His Topo®	33
Figura 14. Constantes de la PCR para amplificación de plásmidos en dirección	37
Figura 15. Constantes de la RT-PCR para amplificación del CAI y morbillivirus	42
Figura 16. Producto de PCR usado para la clonación del CAI	48
Figura 17. ADN plasmídico obtenido a partir de las colonias transformantes	49
Figura 18. Productos de amplificación correspondientes al inserto del CAI	49
Figura 19. Productos del PCR de dirección y ADN plasmídico en dirección después de la purificación	50
Figura 20. Cultivo de células Vero transfectadas	51
Figura 21. Productos de amplificación correspondientes al CAI	51
Figura 22. RT-PCR para la amplificación del CAI y morbillivirus	52
Figura 23. RT-PCR para la amplificación de morbillivirus	53

Figura 24. Homología de la amplificación presente en dos de las secreciones nasales de manatí	54
Figura 25. Cultivo de células MDCK infectadas con Distemper canino	55
Figura 26. Gráfica que muestra la media y la desviación estándar de los valores de absorbancia de los sueros controles negativos y los sueros de manatí	58
Cuadro 1. Valores de absorbancia de los sueros de manatíes	57
Cuadro 2. Comparación de la media a partir de los valores de absorbancia de los sueros de manatíes y los sueros controles	58

RESUMEN

VALLADARES RIVEROLL BLANCA. Análisis sobre la presencia de morbillivirus en una población de manatíes antillanos (*Trichechus manatus manatus*) en Villahermosa, Tabasco, México. (Bajo la dirección de Dr. Daniel Martínez Gómez y MC José Ramírez Lezama).

Morbillivirus ha sido la causa de altas mortalidades en mamíferos marinos tales como focas comunes (*Phoca vitulina*), delfines nariz de botella (*Tursiops truncatus*), ballenas piloto (*Globicephala sp*), entre otras especies. En manatíes son pocos los estudios realizados sobre morbillivirus. En este trabajo, se realizó un estudio para detectar la presencia de morbillivirus en manatíes antillanos de vida libre en Villahermosa, Tabasco, durante los meses de mayo y septiembre del 2009. Se colectaron y analizaron 10 muestras de secreción nasal de manatí mediante la técnica de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR); para la cual, se construyó un control de amplificación interna, cuyos extremos tenían la secuencia del gen P de morbillivirus y el centro contenía la secuencia del gen de la proteína verde fluorescente (GFP) con la finalidad de demostrar su presencia. No se obtuvo una amplificación en ninguna de las muestras. Mediante la realización de un inmunoensayo enzimático (ELISA), usando el virus de Distemper canino como antígeno de captura se analizaron 11 muestras de suero sanguíneo de manatíes antillanos y no se encontró evidencia de exposición al virus. Este es el primer trabajo realizado sobre morbillivirus en manatíes antillanos de vida libre en México. Los resultados obtenidos mediante la RT-PCR y el ELISA no muestran evidencia de la presencia de morbillivirus en la población de manatíes antillanos de Villahermosa, Tabasco, México. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que el virus se encuentre circulando en aguas mexicanas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

En las últimas décadas se han incrementado los reportes de brotes infecciosos en mamíferos marinos, el aumento en la mortalidad entre las diferentes poblaciones ocasiona cambios drásticos en la abundancia, estructura y dinámica poblacional. En algunos casos las muertes han sido resultado de enfermedades virales ^[1].

En abril de 1988, en Europa murieron aproximadamente 18,000 focas comunes (*Phoca vitulina*) que representaban el 57% de la población, afectando en menor proporción a focas grises (*Halichoerus grypus*). Esta epizootia comenzó en Anholt, una isla danesa y se extendió a las costas de Suecia, Países Bajos, Noruega, Alemania, Reino Unido e Irlanda ^[2, 3, 4]. El descubrimiento de cuerpos de inclusión similares a los de distemper en el tejido de los animales así como la presencia de anticuerpos neutralizantes contra el virus de distemper canino, condujeron al aislamiento viral. Se lograron aislar *Herpesvirus* y *Picornavirus*, sin embargo se determinó que éstos no habían sido la causa de las muertes. Un nuevo morbillivirus, Virus de Distemper de los Fócidos (PDV), fue aislado a partir de cultivos celulares primarios de riñón, pulmón y otros órganos, estableciéndose como el agente causal. Recientemente morbillivirus ha sido identificado como la causa de altas mortalidades en mamíferos marinos ^[2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9].

La fuente del virus es aún desconocida, sin embargo existen diferentes teorías sobre su origen. Una de ellas sugiere que la fuente del virus fueron carnívoros terrestres, tomando como base diversos estudios serológicos que mostraban la presencia de anticuerpos neutralizantes contra un morbillivirus (probablemente PDV) en estos animales por periodos prolongados, sin que se lograra el aislamiento de ningún virus de distemper

canino [5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18]. En el caso del brote de 1988 en Anholt, Dinamarca, se piensa que las focas grises fueron los vectores de la infección [10, 11, 12].

Entre 1980 y 1994, en América del Norte, se realizaron estudios serológicos en focas comunes y focas grises, encontrándose en las costas del Atlántico, anticuerpos neutralizantes contra PDV en 37% de las focas comunes y 73% de las focas grises; mientras que en las focas del Pacífico no se encontró evidencia de anticuerpos contra morbillivirus [14].

A finales de 1988, en el Lago Baikal se presentó una mortalidad de aproximadamente 18,000 focas siberianas (*Phoca sibirica*) las cuales mostraron la misma signología que las focas comunes en Europa. De estos animales se logró el aislamiento de un virus, al que se llamó, morbillivirus de las focas Baikal, referido también como Virus de Distemper de los Fócidos-2 (PDV-2) [5, 19, 20, 21]. Estudios posteriores, identificaron a este morbillivirus como una cepa del Virus de Distemper Canino (CDV) [3, 4, 5, 19, 21].

Igualmente, más de 10,000 focas del Caspio (*Phoca caspica*) murieron entre abril y junio del 2000 en las costas de Kazakhstán, Azerbaijón y Turkmenistán, todos los casos se atribuyeron a infección por CDV [20, 22].

En mayo de 2002, disminuyó drásticamente la población de focas comunes (*Phoca vitulina*) en la Isla Anholt, al norte de Dinamarca y una vez más se aisló PDV, estableciéndose, así como el agente causal. Para junio del mismo año, la enfermedad se había extendido hasta Suecia, Noruega, Países Bajos, Alemania, Dinamarca, Bélgica, Francia, Gran Bretaña y el oeste de Irlanda. En Alemania murieron aproximadamente 7,500 focas, acabando con el 51% de la población, mientras que en Países Bajos la mortalidad fue del 54%, similar a la de 1988 (53%), sugiriendo que la virulencia del PDV

para focas comunes no había cambiado ^[2, 4, 7, 11]. La duración de la epizootia fue aproximadamente 9 meses, y en algunas localidades fue más corta que la ocurrida en 1988 (93 días contra 115, en el caso de Países Bajos) ^[7, 10].

Estudios moleculares realizados durante las epizootias de focas comunes, mostraron una homología del 99% en la secuencia de la proteína P entre el virus aislado en Dinamarca y el aislado en Países Bajos en 2002 y 97% de similitud entre la epizootia de 1988 y 2002, indicando que estos virus estaban estrechamente relacionados ^[7].

Entre 2006 y 2007, la mortalidad de focas comunes, grises y de casco (*Cystophora cristata*) aumentó de manera inusual en las costas de Maine y Massachussets en Estados Unidos. A partir de muestras de hígado se logró aislar un morbillivirus y se confirmó la presencia de PDV. Este virus mostró alta similitud con el PDV de la epizootia de 1988 ^[23].

Los primeros ejemplos documentados de infección por morbillivirus en cetáceos, fueron seis marsopas comunes (*Phocoena phocoena*) encontradas en las costas de Irlanda a finales de 1988, de estos animales fue aislado el morbillivirus de las Marsopas [Porpoise Morbillivirus (PMV)] ^[3, 5, 24, 25].

En julio de 1990 en las costas de España, se encontró en delfines listados (*Stenella coeruleoalba*), el morbillivirus del delfín [Dolphin Morbillivirus (DMV)], el cual se diseminó rápidamente por el mar Mediterráneo llegando hasta las costas de Grecia y Turquía para 1992, se desconoce el número de animales muertos ^[3, 5, 21, 26]. Años más tarde se encontraron dos delfines común del Mar Negro (*Delphinus delphis ponticus*) en las costas de Crimea, cuya muerte fue causada por morbillivirus, lo cual sugiere un contacto con delfines listados del mar Mediterráneo ^[27].

En el continente americano también se ha reportado la presencia de morbillivirus en delfines, en uno de los reportes se menciona, que en más del 50% de la población de delfines nariz de botella (*Tursiops truncatus*) de las costas de Virginia y Florida en Estados Unidos que murieron entre junio de 1987 y mayo de 1988, y en el Golfo de México de 1993 a 1994, se observó en los tejidos examinados a través de inmunohistoquímicas, la presencia de un morbillivirus, lográndose el aislamiento en varios casos ^[15]. El origen de la infección en estos animales es desconocido, sin embargo, en dos poblaciones de ballenas piloto *Globicephala melas* y *Globicephala macrorhynchus* se encontraron anticuerpos contra morbillivirus, en un 92% y 64% respectivamente, con lo cual se planteó la hipótesis de que estos animales podrían actuar como reservorios o transmisores en el océano Atlántico ^[28]. Sin embargo, el morbillivirus de estos animales podría no ser el mismo de los delfines, ya que con la muerte de una hembra calderón común en Nueva Jersey, se postuló la presencia de un tercer tipo de morbillivirus cetáceo, llamado morbillivirus de ballenas piloto [Pilot Whale Morbillivirus (PWMV)] en esta área del planeta ^[29].

Entre 1995 y 1997 se encontraron animales infectados con DMV a lo largo de las costas del noroeste de Estados Unidos, uno de estos hallazgos fueron 6 de 18 delfines comunes (*Delphinus delphis*) en el sur de California, que resultaron positivos a la presencia de anticuerpos contra DMV, siendo los primeros reportes de morbillivirus en el océano Pacífico ^[3, 15, 30].

Algunos autores consideran al DMV, PMV y PWMV como un solo agente, ya que las secuencias de aminoácidos y nucleótidos están estrechamente relacionadas (90 a 94%), por lo que han sido clasificados en un sólo género llamado Morbillivirus Cetáceo (CeMV) ^[3, 5, 21, 31].

Se han detectado anticuerpos contra morbillivirus o la presencia de éste en distintas especies animales como: focas arpa (*Phoca groenlandica*) en Canadá en el año 1991; un león marino (*Zalophus californianus*) en Inglaterra en el año 1995, siendo el primer reporte para esta especie ^[18]; focas monje (*Monachus monachus*) en las costas de Mauritania en 1997; rorcual común (*Balaenoptera physalus*) en Bélgica en 1997, focas de casco (*Cystophora cristata*) y delfines de hocico blanco (*Lagenorhynchus albirostris*) en las costas de Alemania en 2007, lo cual muestra que el morbillivirus tiene una distribución muy amplia ^[3, 5, 16, 32, 33].

A la fecha sólo existe un reporte de morbillivirus en manatíes, realizado en 1995 con 148 manatíes de Florida (*Trichechus manatus latirostris*), de los cuales 40 eran silvestres, 97 estaban en rehabilitación y 11 eran especímenes para necropsia. En este caso se encontraron anticuerpos neutralizantes contra PMV en 6 de los 148 manatíes muestreados (4%) entre 1986 y 1991, indicando una exposición a un morbillivirus antigénicamente similar al CeMV. Sin embargo, hasta la fecha, no se han confirmado casos con signología clínica de la enfermedad o lesiones histopatológicas y no se ha aislado ningún morbillivirus de manatíes ^[34].

1.2 Características del género Morbillivirus

La familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Paramyxovirinae* contiene tres géneros, *Paramyxovirus*, *Rubulavirus* y *Morbillivirus* ^[35, 36].

Todos los *Morbillivirus* tienen una distribución mundial y son altamente contagiosos, si bien en algunas especies se ha controlado mediante la vacunación, no se ha logrado

erradicar debido a su amplia distribución y a la variedad de especies silvestres susceptibles que diseminan el virus continuamente ^[37].

Hasta 1988, se habían clasificado dentro de este género a cuatro miembros: Peste Bovina o 'Rinderpest Virus' (RPV) y peste de los pequeños rumiantes o 'peste des petits ruminants virus' (PPRV) en artiodáctilos, Virus del sarampión o 'Measles Virus' (MV) en primates y el virus de distemper canino o 'Canine Distemper Virus' (CDV) en carnívoros, mustélidos, felinos, prociónidos y recientemente fócidos ^[4, 36]. Actualmente se han identificado a dos miembros más: distemper de los fócidos o 'Phocine Distemper Virus' (PDV) y Morbillivirus Cetáceo (CeMV), que comprende las cepas DMV, PMV y PWMV; ambos afectando a mamíferos marinos ^[4, 7, 19].

El genoma de los morbillivirus está formado por una cadena simple de ARN no segmentada de polaridad negativa, unida a la nucleoproteína. Son virus envueltos de 150-300 nanómetros (nm) de diámetro aproximadamente, esféricos y con estructuras filamentosas ^[35, 36, 38, 39].

Su envoltura contiene dos glicoproteínas virales, la proteína de fusión (F) y la hemaglutinina (H) la cual, carece de actividad neuroaminidasa. La nucleocápside tiene forma helicoidal y su diámetro es de 18 nm aproximadamente; está formada por tres proteínas, la nucleoproteína (N o NP), fosfoproteína (P) y la polimerasa (L). La proteína matriz (M) interactúa con las proteínas de la envoltura viral (F y H) así como con las proteínas de la nucleocápside (N, P y L) brindándole estructura y estabilidad al virus ^[12, 35, 36, 38, 39, 40] (Figura 1).

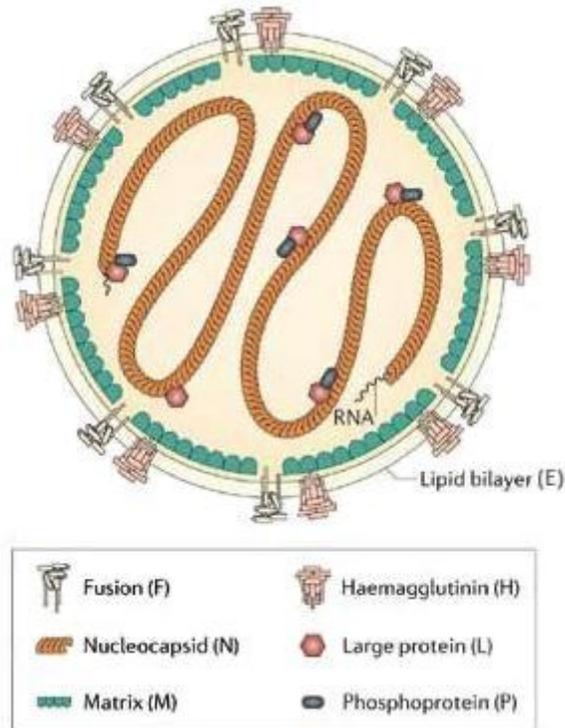


Fig. 1 Esquema de la estructura de un Morbillivirus. Se observa el genoma y las proteínas que lo forman: H, corresponde a la hemaglutinina, F, a la proteína de fusión; E, a la envoltura lipídica del virus; M, a la proteína matriz; N, a la nucleoproteína; L, a la ARN-polimerasa; P, a la fosfoproteína y finalmente el genoma ARN cubierto por la proteína N.

El genoma tiene un tamaño aproximado de 16 kilobases (Kb) y contiene seis genes que codifican para seis proteínas estructurales: N, P, M, F, H y L, además de dos no estructurales (proteína V y C) codificadas dentro del gen P, a través de variaciones de marcos de lectura (Open Reading Frame, ORF). El gen L es el más grande dentro del genoma del virus [12, 35, 36, 38, 39] (Figura 2).

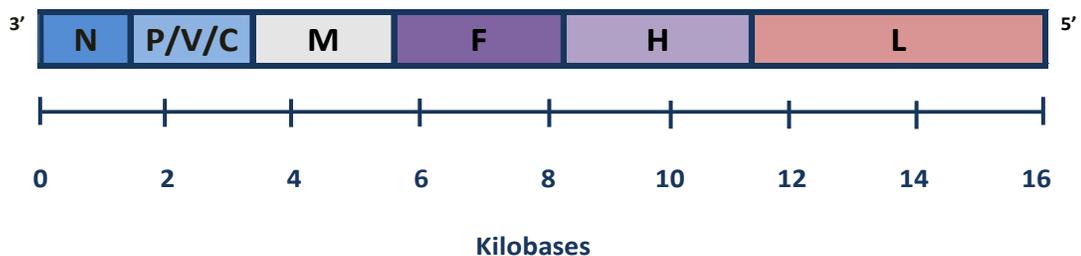


Fig. 2 Posición de los genes para el género *Morbillivirus*

La proteína H tiene un peso de 79 kilodaltones (KDa) para el virus del sarampión y 76 KDa para distemper canino^[40]. Es responsable de reconocer al receptor, lo que permite la adhesión a las células blanco, por lo tanto ejerce una gran influencia en el tropismo del virus. Se ha identificado a la molécula de superficie CD150 o SLAM (molécula de señalización de actividad linfocitaria) como uno de los receptores que usan los virus de distemper canino, peste bovina y sarampión, para infectar a la célula; además, se ha demostrado que este último también puede usar la molécula CD46 (un cofactor del complemento)^[21, 36, 38, 41].

La proteína F es sintetizada como un precursor inactivo (F_0), este es fraccionado por una proteasa dando origen a dos subunidades F_1 y F_2 unidos por un enlace disulfuro que constituyen la proteína activa. Durante la interacción con los receptores celulares la proteína H sufre un cambio de conformación que permite contactar un dominio de la proteína F dando como resultado la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática y la liberación de la nucleocápside en el citoplasma de la célula para iniciar la transcripción y posteriormente la traducción^[12, 35, 36, 38, 39, 42].

La proteína N tiene un peso aproximado de 58 KDa y 60 KDa para el virus de distemper canino y peste bovina, respectivamente. Está directamente asociada a la protección del genoma a través de la encapsidación del ARN viral dentro de una nucleocápside resistente a las RNAsas. Forma un complejo con la proteína P y L durante la transcripción y replicación así como con la proteína M durante el ensamblaje de las partículas virales. La transcripción y replicación están reguladas por la cantidad de proteína N libre^[35, 36, 39, 40].

La proteína L es la polimerasa del virus y es la menos abundante; tiene un peso entre 160-200 KDa aproximadamente. Interactúa con las proteínas P y N, formando un complejo que lleva a cabo la transcripción y replicación viral [36, 38, 39, 40, 42].

El gen P codifica para tres proteínas: P, V y C, a través de variaciones en los marcos de lectura y edición del ARN (que da como resultado la traducción de una nueva proteína). Es decir, mientras que la proteína P es traducida a partir de una copia exacta del gen P, la proteína C es leída en diferente ORF del ARNm de la fosfoproteína por medio de un codón interno (que no es necesariamente AUG) [35, 39, 43]. La proteína V es traducida de un ARNm editado, donde se lleva a cabo la inserción de residuos G en su secuencia, resultado del “tartamudeo” de la polimerasa del virus, generando una proteína con un extremo N-terminal homólogo al de la proteína P y un extremo C-terminal rico en cisteínas. Se cree que estas proteínas podrían participar en la inhibición de la actividad del interferón [35, 36, 38, 39, 42]. La proteína P pesa 70 KDa en el caso del virus del sarampión, 73 KDa en CDV y 71 KDa para el virus de la peste bovina [40].

La proteína M tiene un peso de 37 KDa en el virus del sarampión, 34 KDa en el CDV y 38 KDa en el virus de la peste bovina. Es la proteína más abundante y se localiza en la parte interna de la envoltura viral. Mantiene la estructura de las proteínas de la membrana (F y H) y participa junto con las nucleoproteínas (N, P y L) en el ensamblaje viral, brindando estabilidad a la envoltura del virión para su liberación [35, 38, 39, 40].

Las relaciones entre los diferentes morbillivirus han sido investigadas mediante el análisis de la secuencia de sus diferentes proteínas, las cuales varían ligeramente dependiendo del fragmento analizado. De esta forma, se ha encontrado que el CDV y PDV están estrechamente relacionados, con un 72% y 76% de similitud en la secuencia de aminoácidos de las proteínas H y P, respectivamente; mientras que el morbillivirus de los

cetáceos (DMV y PMV) está relacionado filogenéticamente con PPRV presentando una homología en la secuencia de aminoácidos de la proteína N del 71% y del 68% con CDV y PDV [31, 37, 38, 39, 44]. Los morbillivirus de los cetáceos están estrechamente relacionados con PPRV y alejados de MV-RPV pero son aún más distantes del subgrupo de CDV-PDV [3, 31, 44, 45, 46].

1.2.1 Patogenia

Durante la exposición natural, los morbillivirus entran por aerosoles y penetran el epitelio de las vías respiratorias, comenzando una replicación local en los macrófagos del tracto respiratorio en los primeros 2 a 4 días de la infección. Posteriormente el virus entra al torrente sanguíneo y se multiplica en linfonodos regionales, bazo y linfonodos mesentéricos, produciendo una viremia caracterizada por el aumento inicial de la temperatura corporal y leucopenia. El virus se disemina a otros tejidos como estómago, intestino delgado, hígado y finalmente cerebro [35, 47]. El período de incubación varía dependiendo el tipo de morbillivirus, para perros infectados con CDV es de 3 a 7 días, mientras para rumiantes infectados por RPV y PPRV es de 3 a 9 días y de 5 a 6 días, respectivamente; en el caso de focas infectadas con PDV el periodo es entre 5 y 12 días [4, 7, 11, 36].

Los animales comienzan a eliminar al virus a través de todas las secreciones del cuerpo, alrededor del día 7; entre los días 9 y 14 el virus se disemina al sistema nervioso central (SNC) a través del endotelio vascular de las meninges y del plexo coroideo; esta diseminación dependerá de la respuesta inmune desarrollada por el huésped, si esta fue adecuada el animal podrá recuperarse y tendrá inmunidad a largo plazo; por el contrario si

esta no lo fue, el virus causará lesiones en cerebro, nervio óptico y médula espinal ocasionando convulsiones, mioclonia, nistagmo, ataxia y paresis [35, 47, 36].

La presencia del virus en el tracto respiratorio, gastrointestinal, urogenital y en conjuntiva de focas comunes, sugiere que actúan como vías de eliminación del virus.^[3] En perros infectados con CDV la transmisión por aerosol parece ser la ruta más importante, sin embargo, la transmisión por contacto directo o indirecto no puede descartarse, ya que la formación de grandes grupos sociales, el espacio geográfico, la edad, el comportamiento entre otros factores probablemente favorezca la transmisión lateral de morbillivirus en pinípedos [3, 7].

1.2.2 Hallazgos clínicos y patológicos causados por el virus

Las manifestaciones clínicas en focas y cetáceos infectados naturalmente con morbillivirus son similares a los producidos por CDV estos incluyen fiebre, secreción oculo-nasal mucopurulenta, conjuntivitis, oftalmítis, queratitis, disnea, diarrea, aborto, pérdida de peso, tremor muscular y postura anormal. Además, frecuentemente se ha encontrado enfisema subcutáneo en las regiones cervical y torácica impidiéndoles sumergirse [3, 5, 48]. Los datos hematológicos en organismos acuáticos infectados con morbillivirus son escasos, sin embargo, se ha reportado en una foca juvenil anemia, trombocitosis y leucocitosis [49]. En perros infectados con CDV los resultados hematológicos muestran anemia, trombocitopenia y linfopenia [47, 50, 51].

Los hallazgos a la necropsia reportados en mamíferos marinos son neumonía en aproximadamente 75% de las focas común y 95% de los cetáceos, abscesos pulmonares,

pleuritis, hidrotórax, hemotórax (aproximadamente 1% de los casos) y linfadenopatía de linfonodos mediastínicos, mesentéricos y retroperitoneales [3, 5, 48, 52].

Las principales lesiones histopatológicas son bronconeumonía intersticial, proliferación de neumocitos tipo II, enfisema alveolar e intersticial, sincitios en alveolos, bronquios y bronquiolos, linfocitólisis generalizada, así como presencia de cuerpos de inclusión intracitoplásmicos e intranucleares en diversos órganos incluidos pulmón, cerebro, hígado y riñón. Encefalitis no supurativa con necrosis de neuronas y células gliales, astrocitosis, desmielinización focal del cerebelo en aproximadamente 22% de los casos. También se han informado enfermedades secundarias de origen viral, bacteriano y micótico, además de aumento en la carga parasitaria [3, 5, 48, 52].

1.2.3 Diagnóstico

El diagnóstico de morbillivirus se basa normalmente en la detección directa e indirecta del virus. Las técnicas serológicas y de aislamiento viral han sido ampliamente utilizadas en distintos trabajos de investigación. Sin embargo en diversas ocasiones, la única fuente de material disponible para analizar, cuando se trabaja con mamíferos marinos de vida libre, son las muestras de tejido en descomposición. Es por eso, que la transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) ha demostrado ser una prueba invaluable para analizar muestras pobremente conservadas [36, 37, 38, 48, 53].

La prueba de RT-PCR consiste en lo siguiente: una cadena de ARN es transcrita a un ADN complementario (ADNc) a través de una enzima llamada transcriptasa reversa; posteriormente la doble cadena de ADN se desnatura (para separar las dos hebras) a 94°C para que la *Taq polimerasa* (ADN polimerasa) genere copias del fragmento

específico con base a los iniciadores diseñados. Finalmente el fragmento se visualiza mediante electroforesis. Esta técnica ha sido empleada para la identificación de nuevos morbillivirus aislados en cultivo celular o para confirmar la etiología de animales infectados [53, 54].

El aislamiento del morbillivirus en cultivo celular es la técnica directa comúnmente utilizada en mamíferos marinos, donde una vez que el virus es aislado, se requiere identificarlo, usualmente por medio de técnicas serológicas como seroneutralización, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica e inmunoensayo enzimático (ELISA). La prueba de seroneutralización es la más empleada para detectar morbillivirus, sin embargo, tiene varios inconvenientes [6, 36, 48, 55, 56, 57].

El aislamiento viral es una prueba que requiere células mantenidas en medios de cultivo específicos, las células se infectan con el inóculo de la muestra y se incuban a 37°C hasta observar un efecto citopático; el resultado de este método depende de la sensibilidad de la línea celular. Por otra parte, el aislamiento del virus en cultivo celular es caro y consume tiempo, además de que el número de cultivos celulares provenientes de tejidos de mamíferos marinos es limitado, de tal manera que la mayoría de los laboratorios dependen de líneas celulares estándar que tienen su origen en tejidos de animales terrestres [35, 37, 47, 56].

El ensayo enzimático, ELISA, se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tienen actividad enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado, el complejo antígeno-anticuerpo quedará inmovilizado y será revelado fácilmente mediante la adición de un sustrato que al actuar con la enzima, producirá un color observable a simple vista y cuantificable mediante un espectrofotómetro [58].

1.3 Manatí Antillano (*Trichechus manatus manatus*)

Los manatíes son los únicos mamíferos herbívoros y completamente acuáticos. Usualmente habitan aguas poco profundas de aproximadamente 0.9 a 2.1 m. En vida libre se ha estimado que pueden llegar a vivir entre 50 y 60 años ^[59, 60, 61, 62].

Su clasificación taxonómica (Linnaeus, 1978) es:

Reino	Animalia
Phylum	Chordata
Subphylum	Vertebrata
Clase	Mammalia
Subclase	Theria
Orden	Sirenia
Familia	<i>Trichechidae</i>
Género	<i>Trichechus</i>
Especie	<i>manatus</i>
Subespecie	<i>manatus</i>

El orden Sirenia incluye a dos familias, *Dugongidae* y *Trichechidae*. La familia *Dugongidae* está representada por una sola especie existente, el dugongo (*Dugong dugon*) que se distribuye en las costas del Océano Pacífico, África hasta algunas islas del Océano Índico ^[60, 61]. La vaca Steller (*Hydrodamalis gigas*), otra especie de hábitos marinos extinta en el siglo XVIII, 27 años después de su descubrimiento debido a la intensa cacería, era considerado el único sirenio adaptado a aguas frías (Figura 3) ^[61, 62, 63, 64].

La familia *Trichechidae* está conformada por un solo género *Trichechus* que se distribuye en las aguas costeras del Océano Atlántico de los continentes americano y africano, este género está representado por tres especies. El manatí de las Antillas (*Trichechus manatus*) que se distribuye de las costas de Florida (EUA) hasta el noreste de Brasil

(Figura 4) ^[59, 61, 62]. El manatí de África Occidental (*Trichechus senegalensis*) que habita estuarios y ríos de África, desde el Río Senegal hasta el Río Kwanza en Angola. Finalmente el manatí amazónico (*Trichechus inunguis*) endémico de la región del Amazonas, su hábitat está restringido a la cuenca del Río Amazonas, habita únicamente lagos y canales de agua dulce (Figura 3) ^[59, 62, 64, 65].

Morfológicamente todos los manatíes son similares. *T. inunguis* es el más pequeño, no presenta uñas en sus aletas y la mayoría presentan una mancha de pigmento rosa que generalmente está centrada en el pecho o abdomen ^[60, 62, 65].

Con base en su geografía y características craneales el *T. manatus* se divide en dos subespecies, el manatí antillano (*Trichechus manatus manatus*) que abarca el sureste del Golfo de México hasta América del Sur y el manatí de Florida (*Trichechus manatus latirostris*) que se encuentra en el norte del Golfo de México y en la zona costera del sureste de la península de Florida ^[61, 62, 66].

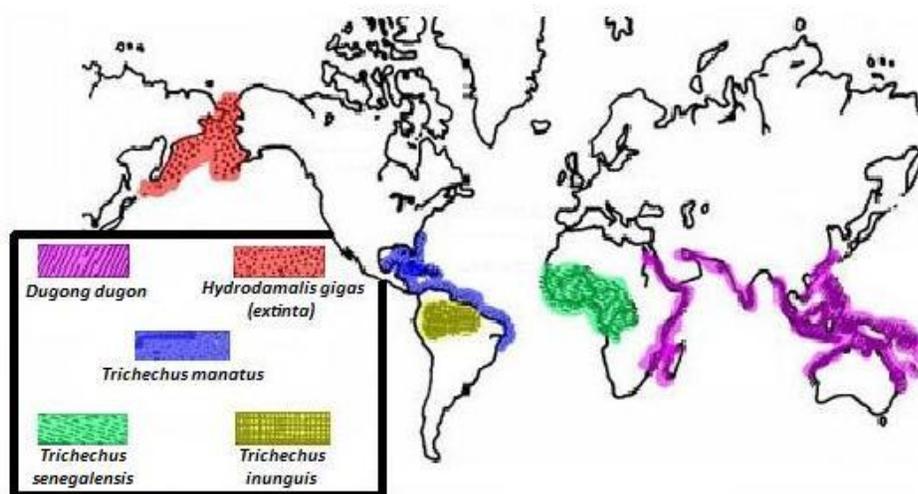


Fig. 3 Mapa de distribución mundial del orden Sirenia.



Fig. 4 Mapa de distribución geográfica del manatí de las Antillas (*Trichechus manatus*). La subespecie *Trichechus manatus latirostris* restringida a las costas de Florida, EUA y norte del Golfo de México. *Trichechus manatus manatus* distribuido en las costas del Golfo de México hasta Brasil.

1.3.1 Biología de la especie

Los manatíes tienen un labio superior flexible el cual es usado para tomar y manipular el alimento. Ambos labios presentan vibrisas modificadas (cerdas periorales), las cuales al igual que los labios, participan en la comunicación e interacción social. Los nostrilos se localizan en la parte dorsal del hocico con válvulas o pliegues que se cierran cuando el manatí se sumerge. Los ojos poseen una membrana traslúcida que les permite ver mejor debajo del agua y en condiciones de baja luminosidad. Las orejas carecen de pabellón externo ^[59, 62, 65].

Los adultos llegan medir entre 2.7 m hasta 3.0 m con un peso entre 410 – 545 Kg, mientras que los recién nacidos miden 1.7 m y pesan 32 Kg aproximadamente ^[59].

Su aparato digestivo se compone de un estómago con una sola cámara y una glándula accesoria digestiva o glándula cardiaca, que se encuentra asociada al estómago y se encarga de producir ácido clorhídrico. Entre el intestino delgado y grueso, se encuentra el ciego en donde se lleva a cabo la digestión de celulosa. Sus hábitos alimenticios les han permitido desarrollar un intestino extremadamente largo, característicos de las especies herbívoras ^[59, 62, 65].

La boca y dientes de los manatíes están adaptados para la vida herbívora, carecen de incisivos y caninos funcionales, aunque los jóvenes presentan un par de incisivos vestigiales que no emergen. Al desgastarse el molar frontal por el masticado de plantas fibrosas, la pieza que está detrás empuja las demás piezas hacia adelante, permitiendo su reemplazo. Detrás de los labios hay unos parches llenos de bordes que parten al alimento en piezas más pequeñas antes de que los molares los trituren finalmente ^[59, 60, 62].

El consumo diario de alimento para las hembras no lactantes y machos adultos es de 7 a 10% de su peso corporal, las crías consumen cerca del 15% de su peso corporal y las hembras lactantes comen entre el 10 y 13% de su peso corporal ^[59, 62].

Anatómicamente, el manatí macho presenta una abertura genital caudal a la cicatriz umbilical; mientras que la hembra, exhibe prominentes pezones axilares y la abertura genital se encuentra craneal al ano ^[59, 62].

El periodo de gestación dura cerca de 13 meses y las crías son dependientes hasta 2 años después del nacimiento. Generalmente tienen una cría en un intervalo de 3 a 5 años aproximadamente ^[59, 62].

1.3.2 Distribución en México

Hasta la fecha, los censos poblaciones en México son inexactos, sin embargo, algunos estudios en el año 2001 reportaron una población estimada de 1,800 manatíes, todos pertenecientes a la subespecie *T. manatus manatus*, que se distribuye por los estados de Veracruz, Tabasco, Chiapas, Campeche, Yucatán y Quintana Roo [65, 66].

La metapoblación de manatíes en México, está dividida en tres poblaciones, la primera localizada en las costas de Yucatán y Quintana Roo (la cual se extiende hasta Belice) compuesta por 600 individuos para el año 2001. La segunda, se encuentra en la cuenca de los ríos Grijalva y Usumacinta en Tabasco y el sistema lagunar de Términos en Campeche y Chiapas, donde se calcularon 1000 individuos. Finalmente, la tercera se compone de 200 individuos y se localiza en Veracruz (Figura 5) [65].

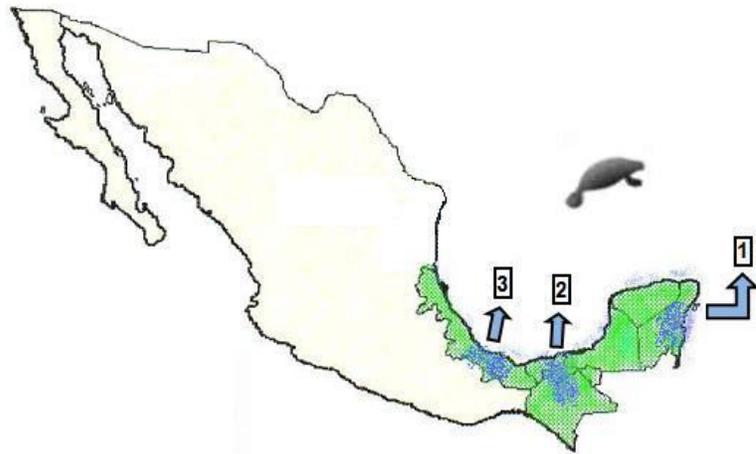


Fig. 5 Mapa de distribución en México de *Trichechus manatus manatus*. Los números indican las localidades con mayor población de manatíes. 1) Corresponde a las costas de Yucatán y Quintana Roo. 2) Conciernen a los Ríos y Lagunas de Tabasco y Campeche. 3) Corresponde a los Ríos de Veracruz.

La población de Quintana Roo, se agrupa a su vez en tres áreas: la primera y la más importante corresponde a la bahía de Chetumal, localizada al sur del estado y es la región

con mayor número de manatíes de las costas mexicanas ^[66, 67]. La segunda área de importancia, se compone de las bahías de Ascensión y Espíritu Santo, dentro de la Reserva de la Biosfera de Sian Ka'an. La tercera está ubicada en las caletas y cenotes de los poblados de Tulum y Playa del Carmen (Figura 6) ^[67].

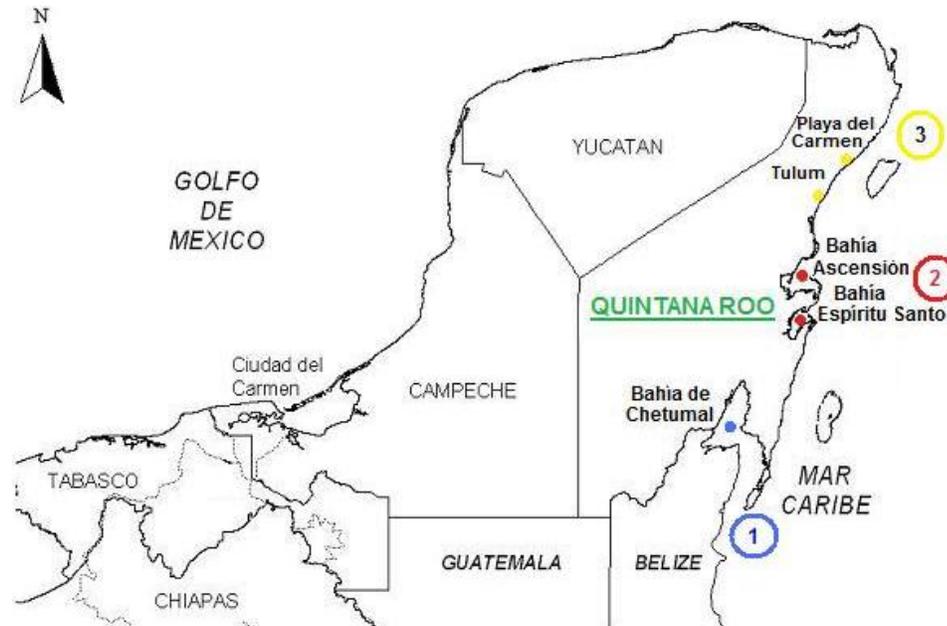


Fig. 6 Áreas con mayor presencia de manatíes en el estado de Quintana Roo. (1) Bahía de Chetumal. (2) Reserva de la Biosfera de Sian Ka'an. (3) Zona costera comprendida entre Tulum y Playa del Carmen.

1.3.3 Legislación en México

Los manatíes en México se protegieron legalmente a partir del 25 de noviembre de 1921; sin embargo, la escasa inspección y vigilancia en las actividades pesqueras, la caza clandestina y la demanda de su carne, desfavorece la eficiente aplicación para resguardar la especie. Actualmente la especie, a nivel nacional, se encuentra protegida por la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010 ^[68].

A nivel internacional, a partir de 1975 la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) la considera como especie en peligro de extinción, dentro del Apéndice I; y está considerada como vulnerable por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) ^[66, 68, 69].

Las dos especies restantes, *T. inunguis* y *T. senegalensis* también son consideradas como vulnerables por la UICN; asimismo, *T. inunguis* está listado como especie en peligro de extinción, dentro del Apéndice I por la CITES, mientras que *T. senegalensis* está incluido en el Apéndice II ^[66, 69]. En Brasil, *T. manatus* es la única especie considerada en peligro crítico por el Plan de Acción para Mamíferos Acuáticos de Brasil (IBAMA, 2001) y como especie amenazada por la Lista Oficial de Especies de Fauna Brasileña desde 1989; donde el número de animales se ha reducido por la caza intensiva. Actualmente la caza ilegal, la degradación y pérdida de su hábitat, amenazas naturales (marea roja), pesca incidental entre otros factores, ha favorecido la disminución de individuos en todas sus áreas de distribución geográfica ^[63, 64, 66].

Algunos investigadores consideran que en México es posible que gran parte de la diversidad biológica se pierda como consecuencia de las enfermedades que afectan a la fauna silvestre. Estas están presentes en todos los sistemas biológicos y participan en la regulación de la biodiversidad, a través de procesos evolutivos (biogeografía), la especiación y mediante procesos ecológicos (depredación) ^[70].

Debido a la falta de estudios sobre morbillivirus en México, en el presente trabajo se analiza la presencia de este agente mediante la estandarización y el uso de la RT-PCR con controles de amplificación interna y ELISA, con muestras de secreciones nasales y sueros de manatíes, respectivamente. Lo cual constituye el primer estudio realizado en manatíes de vida libre en México.

2. JUSTIFICACIÓN

Existe evidencia de la presencia de morbillivirus en mamíferos marinos en diferentes regiones del continente americano; lo cual sugiere una posible susceptibilidad al agente en las poblaciones de manatíes de las costas mexicanas. En la actualidad existe sólo un antecedente sobre morbillivirus en manatíes de Florida (*Trichechus manatus latirostris*), sin embargo, éste no ha podido ser aislado de algún sirénido ^[34]. Este trabajo tiene como objetivo determinar la presencia de morbillivirus, en la población de manatíes de Villahermosa, Tabasco, México.

El manatí es un mamífero cuyo estado actual es vulnerable en todas las zonas de distribución, lo cual refleja una excesiva fragilidad en sus poblaciones. Ante este panorama, la elaboración de este trabajo pretende dar pauta a estudios sobre éste y otros agentes infecciosos, originando conocimientos para la prevención y manejo, evitando pérdidas y garantizando la supervivencia de este mamífero.

3. HIPÓTESIS

Dada la existencia de *Morbillivirus* en diferentes mamíferos marinos y su amplio rango de distribución mundial, entonces algún tipo de morbillivirus podría estar presente en la población de manatíes antillanos (*Trichechus manatus manatus*) de la región de Villahermosa, Tabasco, México.

4. OBJETIVO GENERAL

Identificar mediante métodos directos e indirectos, la presencia de morbillivirus en la población de manatíes antillanos (*Trichechus manatus manatus*) de la Laguna de las Ilusiones en Villahermosa, Tabasco, México; con el fin de establecer su estatus epidemiológico.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Colectar muestras sanguíneas así como secreciones nasales a través de hisopos, en la población de manatíes antillanos (*Trichechus manatus manatus*).
2. Analizar las muestras obtenidas mediante un inmunoensayo enzimático (ELISA) y la técnica de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para establecer la presencia del morbillivirus en la población de estudio.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo se llevó a cabo en la Laguna de las Ilusiones localizada en un Área Natural Protegida Estatal, la cual forma parte de la Reserva Ecológica, en la subregión Centro; ubicada entre el Boulevard Lic. Adolfo Ruiz Cortines y Av. Universidad en Villahermosa, Tabasco, México.

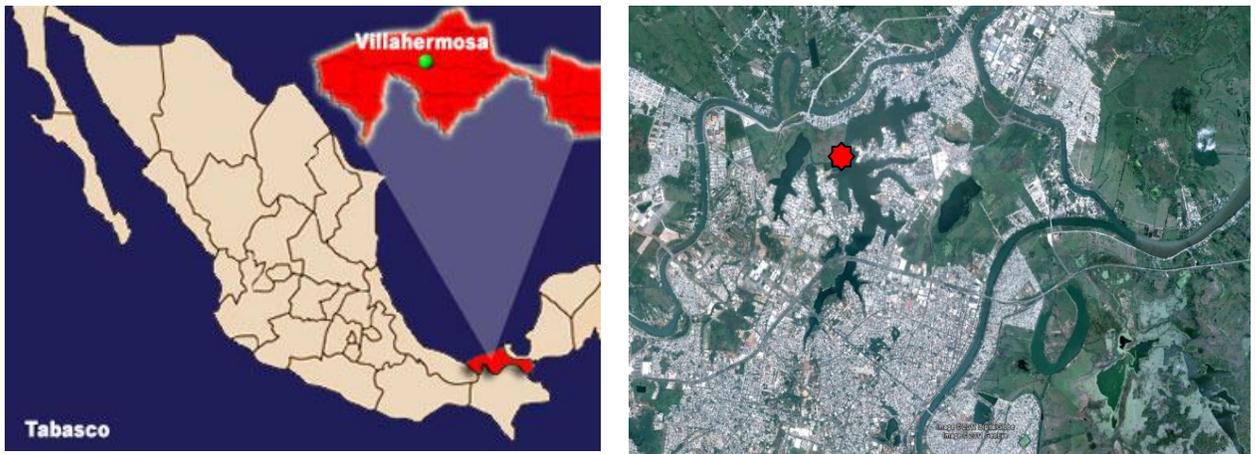


Fig. 7 Mapa donde se indica la localización de la Laguna de las Ilusiones, en Villahermosa, Tabasco, México (★).

6.1 Población de estudio y toma de muestras

A los manatíes se les colocó un radio transmisor (sistema VHF) durante los meses de mayo y septiembre de 2009 para su monitoreo, bajo el proyecto SEMARNAT Núm. SGPA/DGVS/01754/09; este manejo fue aprovechado para la toma de muestras. Los manatíes fueron capturados usando una lancha y una red, con la cual se obstruía el camino del manatí acercándolo a la lancha, para finalmente sacarlo y posteriormente colocarlo sobre una esponja en decúbito ventral, sujetando la cabeza, pecho y la cola con la ayuda de personas capacitadas. El manejo fuera del agua tuvo una duración de 24 a

140 minutos, con un promedio de 90 minutos aproximadamente. Durante este tiempo, se obtuvieron muestras de heces, piel, medidas morfométricas, peso, muestras de sangre para hematología y química sanguínea y finalmente la inserción de un microchip para identificación. Los manatíes recuperados, fueron liberados en el sitio de captura. Ningún efecto adverso por el estrés de la captura fue detectado 24 horas después de la liberación de los manatíes.

Obtención de sueros

Se desinfectó el área de venopunción empleando torundas y gasas con yodo durante 1-3 minutos y se tomaron las muestras sanguíneas de las venas que inervan el plexo braquial de la aleta pectoral, utilizando tubos vacutainer ^[59, 60, 71].

Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente hasta llegar a la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT), donde se centrifugaron a 1,550 rpm por 15 minutos para separar el suero. El suero obtenido se conservó en microtubos estériles y éstos fueron mantenidos a -20 °C hasta la Ciudad de México donde se almacenaron en un ultracongelador a -70°C hasta su análisis.

Hisopos nasales

Las secreciones nasales se tomaron por medio de hisopos estériles, frotando suavemente la cavidad nasal. Cada hisopo fue guardado en tubos de fondo cónico de 15 mL, los cuales se congelaron a -20 °C y posteriormente en la Ciudad de México fueron almacenados a -70 °C hasta ser procesadas.

Las muestras recolectadas fueron transportadas en refrigeración de Villahermosa, Tabasco hasta la Ciudad de México, donde se ingresaron al Laboratorio de Microbiología Agropecuaria de la Universidad Autónoma de México, Xochimilco (UAM-Xochimilco).

6.2 Transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Aunque la RT-PCR es ampliamente utilizada en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, tiene como desventaja la interpretación de resultados falsos negativos (muestras reportadas como negativas a pesar de que el patógeno este presente), esto puede ser causado por agentes inhibidores de la reacción que frecuentemente están presentes en las muestras biológicas, los cuales pueden reducir la sensibilidad e inhibir la reacción de la prueba ^[72, 73].

Un método para estandarizar las pruebas de diagnóstico molecular es el uso de controles de amplificación interna (CAI). Un CAI es una secuencia de ADN no blanco presente en el mismo tubo donde se tiene la muestra en la que se busca la secuencia de interés (secuencia blanco) y que es co-amplificada simultáneamente bajo las mismas condiciones de la reacción. El uso de CAI en la técnica RT-PCR permite validar el resultado positivo o negativo, en este trabajo se desarrollo un sistema de amplificación interna como control para las pruebas de diagnóstico molecular, a continuación se detallan los procedimientos para la elaboración de ese control ^[72].

6.2.1 Diseño de iniciadores para la amplificación del CAI y morbillivirus

Se utilizó un par de iniciadores universales reportados por *Saliki JT et al, 2002.*, que amplifican un fragmento de 80 pares de bases (pb) del gen P de morbillivirus ^[53]. La secuencia es la siguiente:

Morb- 1 5' – ATT AAA AAG GGC ACA GGA GAG AGA TCA GCC –3'

Morb- 2 5' – ATT GGG TTG CAC CAC TTG TC –3'

También se sintetizó otro par de iniciadores, los cuales tienen una secuencia del gen de la proteína verde fluorescente (GFP) en el extremo 3' y la secuencia del gen P de morbillivirus en el extremo 5'. Estos iniciadores compuestos amplifican un producto de 769 pb:

Morb-GFP- 1 5' – ATT AAA AAG GGC ACA GGA GAG AGA TCA GCC **ATG GCT AGC AAA GGA G** – 3'

Morb-GFP- 2 5' – ATT GGG TTG CAC CAC TTG **TCG CTT TTG TAG AGC TCA TCC A** – 3'

Finalmente, se diseñó un tercer juego de iniciadores basándose en la secuencia homóloga del gen del virus de distemper canino (CDV) y el de distemper de los fócidos (PDV) para amplificar un fragmento de 235 pb:

Morb(II)- 1 5' – GGA AAT GCT TCM TCT AAC WGG G – 3'

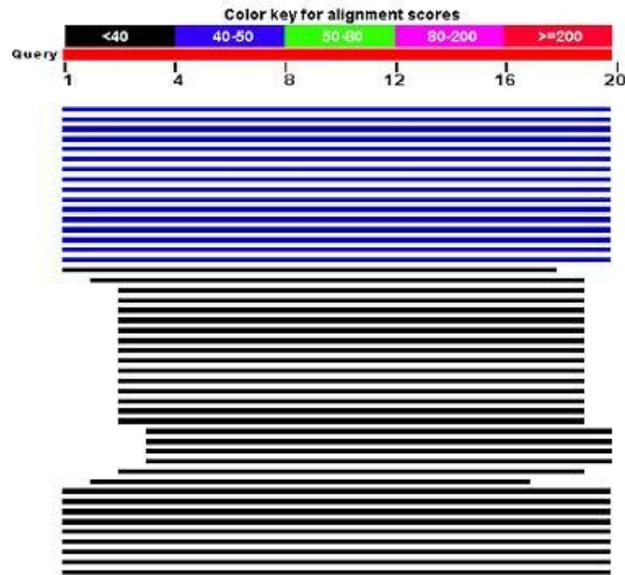
Morb(II)- 2 5' – TCC TGT GCC CTT TTT WAT GG – 3'

La homología de los iniciadores Morb-1, Morb-2, Mor(II)-1 y Morb(II)-2 para la amplificación de un fragmento correspondiente a morbillivirus, fue comprobada por medio

de la base de datos BLAST (Basic local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center of Biotechnology Information) (Figuras 8, 9, 10 y 11).

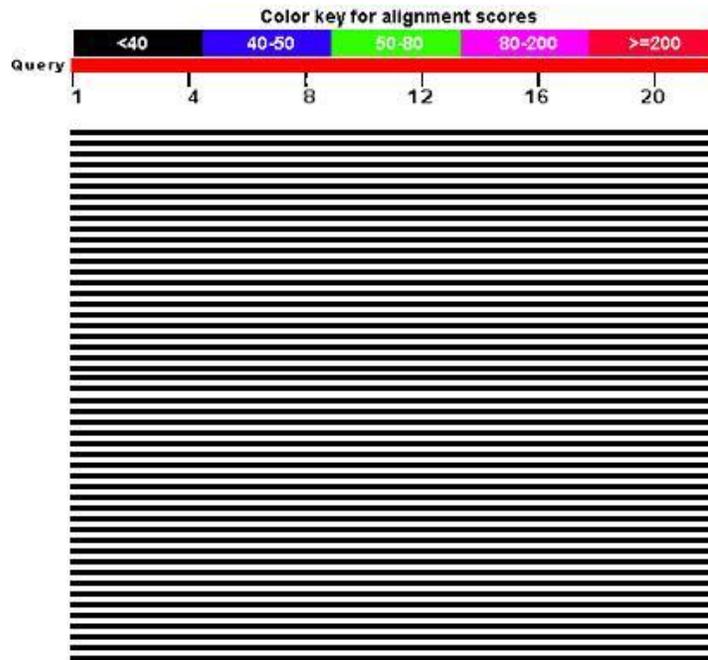


Fig. 8 Diagrama donde se muestra la homología de las secuencias reportadas con la secuencia del iniciador Morb-1 mediante el BLAST de NCBI.



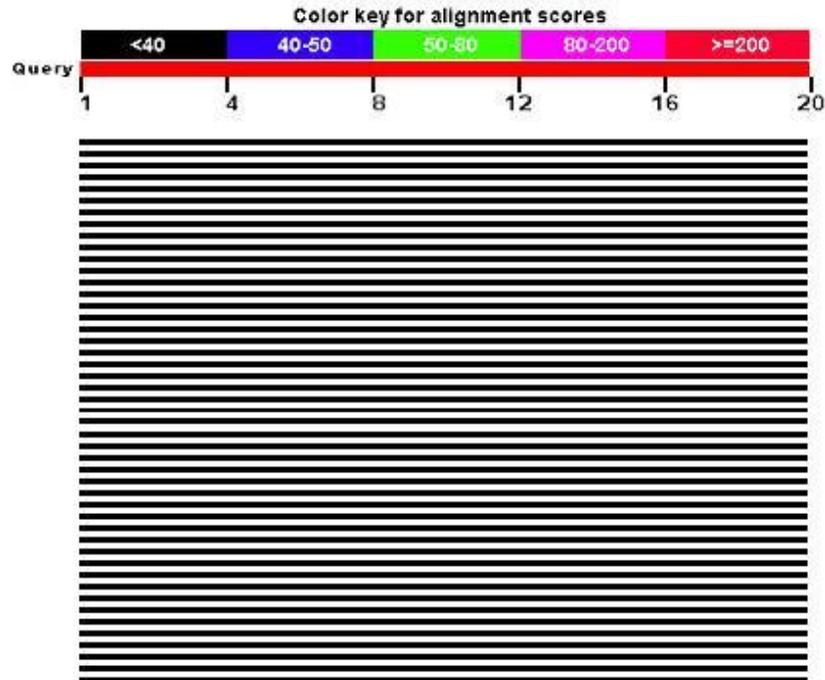
Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
Canine distemper virus P gene for phosphoprotein, complete cds, str	40.1	40.1	100%	0.060	100%
Canine distemper virus strain Shuskiy, complete genome	40.1	40.1	100%	0.060	100%
Canine distemper virus strain Phoca/Casplan/2007, complete genom	40.1	40.1	100%	0.060	100%
Canine distemper virus strain recombinant Snyder Hill, complete per	40.1	40.1	100%	0.060	100%
Canine distemper virus strain CDV3, complete genome	40.1	40.1	100%	0.060	100%
Canine distemper virus isolate 98-2646, complete genome	40.1	40.1	100%	0.060	100%
Canine distemper virus isolate 98-2654, complete genome	40.1	40.1	100%	0.060	100%
Canine distemper virus isolate 98-2645, complete genome	40.1	40.1	100%	0.060	100%
Canine distemper virus P gene for phosphoprotein, partial cds, isola	40.1	40.1	100%	0.060	100%
Canine distemper virus strain Onderstepoort, complete genome	40.1	40.1	100%	0.060	100%
Canine distemper virus, isolate Onderstepoort complete genome	40.1	40.1	100%	0.060	100%
Canine distemper virus V protein (V), phosphoprotein (P), and C pro	40.1	40.1	100%	0.060	100%
Canine distemper virus V protein (V), phosphoprotein (P), and C pro	40.1	40.1	100%	0.060	100%
Canine distemper virus V protein (V), phosphoprotein (P), and C pro	40.1	40.1	100%	0.060	100%
Pilot whale morbillivirus phosphoprotein (P) gene, partial cds	40.1	40.1	100%	0.060	100%

Fig. 9 Diagrama donde se muestra la homología de las secuencias reportadas con la secuencia del iniciador Morb-2 mediante el BLAST de NCBI.



Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
Canine distemper virus strain HLJ1-06, partial genome	38.4	38.4	100%	0.38	90%
Canine distemper virus strain HLJ2-07, partial genome	38.4	38.4	100%	0.38	90%
Phocine distemper virus strain PDV/USA2006 phosphoprotein (P) gene	38.4	38.4	100%	0.38	90%
Canine distemper virus P gene for phosphoprotein, complete cds, strain	38.4	38.4	100%	0.38	90%
Canine distemper virus isolate MKY-KM08, complete genome	38.4	38.4	100%	0.38	90%
Canine distemper virus P gene for phosphoprotein, partial cds, strain	38.4	38.4	100%	0.38	90%
Canine distemper virus P gene for phosphoprotein, partial cds, strain	38.4	38.4	100%	0.38	90%
Canine distemper virus P gene for phosphoprotein, partial cds, isolate	38.4	38.4	100%	0.38	90%
Canine distemper virus P gene for phosphoprotein, partial cds, isolate	38.4	38.4	100%	0.38	90%
Canine distemper virus P gene for phosphoprotein, partial cds, isolate	38.4	38.4	100%	0.38	90%
Canine distemper virus P gene for phosphoprotein, partial cds, isolate	38.4	38.4	100%	0.38	90%

Fig. 10 Diagrama donde se muestra la homología de las secuencias reportadas con la secuencia del iniciador Morb(II)-1 mediante el BLAST de NCBI.



Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
Canine distemper virus strain HLJ1-06, partial genome	37.4	37.4	100%	0.40	95%
Canine distemper virus strain HLJ2-07, partial genome	37.4	37.4	100%	0.40	95%
Phocine distemper virus strain PDV/JSA2006 phosphoprotein (P) gene	37.4	37.4	100%	0.40	95%
Canine distemper virus isolate MKY-KM08, complete genome	37.4	37.4	100%	0.40	95%
Canine distemper virus P gene for phosphoprotein, partial cds, strain HLJ1-06	37.4	37.4	100%	0.40	95%
Canine distemper virus P gene for phosphoprotein, partial cds, strain HLJ2-07	37.4	37.4	100%	0.40	95%
Canine distemper virus P gene for phosphoprotein, partial cds, isolate MKY-KM08	37.4	37.4	100%	0.40	95%
Canine distemper virus P gene for phosphoprotein, partial cds, isolate HLJ1-06	37.4	37.4	100%	0.40	95%
Canine distemper virus P gene for phosphoprotein, partial cds, isolate HLJ2-07	37.4	37.4	100%	0.40	95%

Fig. 11 Diagrama donde se muestra la homología de las secuencias reportadas con la secuencia del iniciador Morb(II)-2 mediante el BLAST de NCBI.

6.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación del CAI

Se llevó a cabo una reacción de PCR para amplificar un fragmento de 769 pb compuesto de dos fragmentos: en la parte central un fragmento que corresponde al gen de la proteína verde fluorescente (GFP) y en los extremos secuencias correspondientes a morbillivirus; a esta construcción se le denominó control de amplificación interna (CAI).

Brevemente, en un volumen final de 50 μ l se agregó 1 μ l de cada uno de los iniciadores compuestos Morb-GFP-1 y Morb-GFP-2 a una concentración de 10 μ M, 45 μ l de PCR Supermix^a y 1 μ l de ADN plasmídico (pcDNA3.1/CT-GFP Topo®)^a a una concentración de 100 nanogramos (ng). La PCR se realizó en un termociclador^b con las temperaturas que se mencionan a continuación: un ciclo de 95 °C por 5 min (desnaturalización inicial), 30 ciclos a 95 °C por 1 min (desnaturalización), 65 °C por 1 min (alineamiento), 72 °C por 2 min (extensión) y un último ciclo de 72 °C por 5 min (extensión final) (Figura 12).

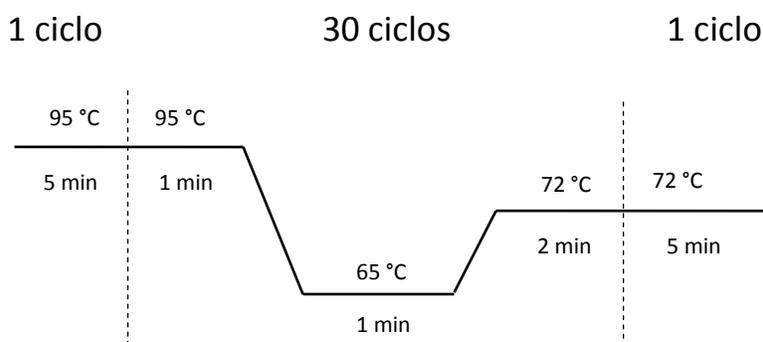


Fig. 12 Esquema con los ciclos de tiempos y temperaturas de la PCR para amplificación del CAI.

La visualización de los productos amplificados por PCR se realizó mediante geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

^a Invitrogen®, California, EUA

^b Corbett Research, California, EUA

6.2.3 Clonación del CAI

El CAI fue clonado en el vector comercial pcDNA 3.1/V5-His Topo^{®c} (Figura 13) siguiendo las indicaciones del fabricante y usando células competentes de *Escherichia coli* DH5 α (One Shot[®] TOP10 Chemically Competent *E.coli*)^d mediante transformación química.

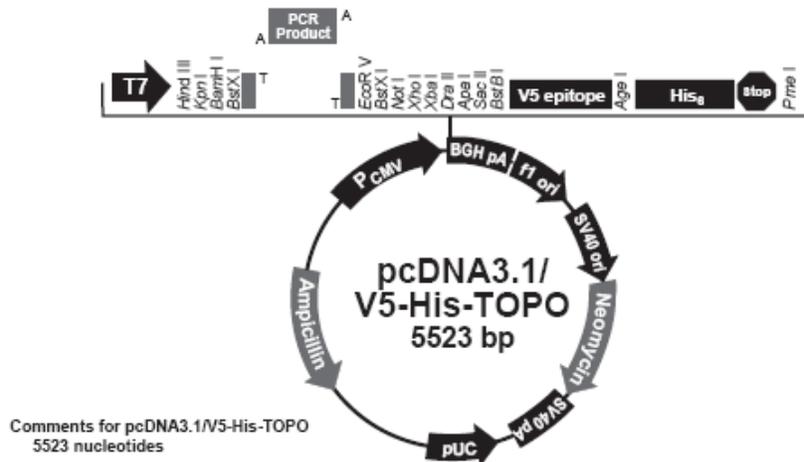


Fig. 13 Esquema del vector comercial pcDNA 3.1/V5-His Topo[®] usado para la clonación del CAI.

Para clonar el CAI en un volumen final de 6 μ l se mezclaron de manera cuidadosa los siguientes reactivos: 2 μ l del producto de PCR (PCR- CAI), 2 μ l de agua estéril, 1 μ l de solución salina (proporcionada por el fabricante) y 1 μ l del vector pcDNA 3.1/V5-His Topo[®], esta mezcla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente.

Para la transformación de células competentes, primero se descongeló un vial de células (*E.coli* DH5 α) colocándolo en hielo. Una vez descongelado se adicionaron los 6 μ l de la reacción de clonación, se mezcló suavemente sin usar la pipeta e inmediatamente se incubó en hielo durante 30 min. Posteriormente, se realizó un choque térmico a 42 $^{\circ}$ C

^c Invitrogen[®], California, EUA

^d Invitrogen[®], California, EUA

durante 30 segundos y rápidamente se volvió a colocar en hielo por 2 min; a este tubo se agregaron 250 µl de medio S.O.C (proporcionado por el fabricante) y se incubó a 37 °C con agitación por 1 hora. Finalmente, se tomaron 100 µl de este tubo y se sembraron en dos placas con medio Luria-Bertani (LB) sólido adicionado con ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron a 37 °C toda la noche. Con el plásmido resultante, se realizó la transfección.

6.2.4 Extracción del plásmido para el CAI mediante lisis alcalina

Se eligieron al azar las colonias transformadas en el agar LB con ampicilina y a éstas se les realizó la extracción de ADN plasmídico mediante lisis alcalina usando el protocolo de midipreparación descrito por Sambrook ^[74].

Brevemente, cada una de las colonias crecidas se transfirió a un matraz previamente adicionado con 50 mL de medio LB líquido con ampicilina (1 µg/ 1 mL) y se incubaron a 37 °C con agitación durante toda la noche. Pasado este tiempo, se tomaron los 50 mL del medio y se colocaron en tubos de fondo cónico de 15 mL, se centrifugaron a 8,000 rpm durante 10 min. Se decantó el sobrenadante, se suspendieron las pastillas en 200 µl de solución de lisis I fría (glucosa 50 mM, Tris-Cl 25 mM y EDTA 10 mM), se transfirieron a un microtubo y se homogenizaron vigorosamente con ayuda de un vórtex y se incubaron 5 min a temperatura ambiente. Pasada la incubación, se adicionaron 400 µl de solución de lisis II preparada al momento (NaOH 0.2 N, SDS 1%) se mezclaron por inversión y se incubaron a 4 °C por 10 min. Posteriormente, se agregaron 300 µl de solución lisis III fría (acetato de potasio 5 M y ácido acético glacial) se mezclaron por inversión y se incubaron a 4 °C durante 5 min; se centrifugaron a 13,000 rpm durante 5 min a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un nuevo microtubo, se añadió un volumen igual de fenol:cloroformo

(25:25) y se mezclaron con vórtex hasta homogenizar, se centrifugó a 13,000 rpm durante 2 min. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo microtubo y se precipitaron con 0.6 volúmenes de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubaron a 4 °C por 5 min; se centrifugaron a 13,000 rpm durante 5 min, se retiró el sobrenadante por decantación y se lavaron las pastillas con 1 mL de etanol frío al 70%, se centrifugaron nuevamente a 13,000 rpm por 2 min; se eliminó el sobrenadante por decantación y se dejaron secar las pastillas a temperatura ambiente. Finalmente las pastillas se suspendieron en 250 µl de solución TE (tris (hidroximetil) aminometano-ácido etilendiaminotetraacético 10:1 mM pH 8) y se les agregó 10 µl de RNAsa (100 µg/ mL), se mezclaron e incubaron durante 30 min a 37 °C ^[75].

Se observó la integridad de cada ADN mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% en amortiguador Tris-acetato-EDTA (TAE), teñido con bromuro de etidio en una cámara horizontal^e ^[75]. Finalmente las muestras de ADN plasmídico se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

6.2.5 Selección de plásmidos en dirección

Con la finalidad de corroborar que en el vector de las colonias transformadas el CAI se encontrara en la dirección correcta para ser expresado de manera exitosa, se realizó una PCR de dirección; para la cual se diseñó un iniciador basado en la secuencia específica del promotor del virus del citomegalovirus (CMV), a este iniciador se le denominó Fw-Dirección.

^e Bio-Rad®, Philadelphia, EUA

Cada colonia transformada fue sometida a 3 reacciones de PCR, cada una de las reacciones tenía un volumen final de 50 μ l, los cuales contenían los siguientes reactivos:

Primera reacción (Reacción 1), en un tubo estéril para PCR se agregó 2 μ l de cada uno de los iniciadores Morb-1 y Morb-2 a una concentración de 10 μ M, 45 μ l de PCR Supermix y 1 μ l de ADN plasmídico (obtenido a partir de la lisis alcalina). El producto esperado es de 769 pb correspondiente al CAI.

Segunda reacción (Reacción 2), se añadieron 2 μ l de cada uno de los iniciadores Morb-1 y Fw-Dirección a una concentración de 10 μ M, 45 μ l de PCR Supermix y 1 μ l de ADN plasmídico; en esta reacción no se esperaba ningún amplificado, de tal forma que si se presentaba alguna amplificación ésta indicaría que el vector fue insertado en sentido contrario y el CAI no sería expresado.

Tercera reacción (Reacción 3), se mezclaron 2 μ l de cada uno de los iniciadores, en esta ocasión Fw-Dirección y Morb-2 a una concentración de 10 μ M, 45 μ l de PCR Supermix y 1 μ l de ADN plasmídico. Finalmente, para esta reacción el producto esperado era de 769 pb, indicando que el CAI se encontraba en la dirección correcta y podía ser expresado.

La PCR se realizó en un termociclador con las siguientes temperaturas: un ciclo de 95 °C por 5 min (desnaturalización inicial), 30 ciclos a 95 °C por 1 min y 30 segundos (desnaturalización), 56 °C por 1 min y 30 segundos (alineamiento), 72 °C por 1 min y 30 segundos (extensión) y un último ciclo de 72 °C por 5 min (extensión final) (Figura 14).

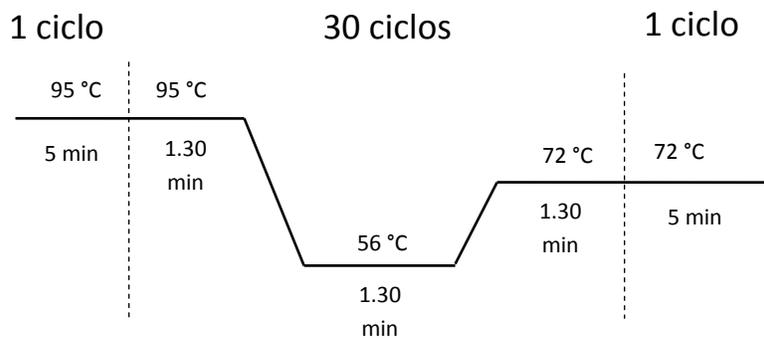


Fig. 14 Esquema con los ciclos de tiempos y temperaturas de la PCR para amplificación de plásmidos en dirección.

6.2.6 Purificación de los plásmidos

Previo a la transfección de aquellos vectores con la dirección adecuada, se realizó la purificación de los plásmidos que estaban en dirección mediante una columna comercial Pure Link Quick Plasmid Miniprep Kit^f, siguiendo las recomendaciones del fabricante, el ADN fue suspendido en 75 µl de solución TE precalentada (proporcionada por el fabricante) y se almacenó a -20 °C.

6.2.7 Transfección del plásmido en células Vero

La transfección se llevó a cabo en células renales de mono verde (Vero) a través del uso de LipofectamineTM LTX and Plus Reagent^f, siguiendo el protocolo del fabricante y realizando algunas modificaciones:

^f Invitrogen®, California, EUA

En botellas de cultivo celular con una superficie de 25 cm² se crecieron células Vero hasta tener una confluencia del 100%; posteriormente, se retiró el medio de crecimiento (*Minimal Essential Medium*)^g y el monoestrato se lavó dos veces con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2 frío ^[75]. Para la preparación de la mezcla de Lipofectamina, en un microtubo se colocaron 5 µg de ADN plasmídico y 10 µl del reactivo de transferencia (Plus-Reagent®), se homogenizó y se dejó incubar por 5 min a temperatura ambiente. Mientras tanto, en otro microtubo se agregó 1 mL del medio de crecimiento (MEM) sin suero fetal bovino y 50 µl de Lipofectamina LTX®, se mezcló gentilmente y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla del ADN y el reactivo se transfirió al microtubo de la Lipofectamina LTX®, se homogenizó y ésta se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Una vez pasado el tiempo de incubación, la mezcla anterior se agregó a la botella con células Vero, se mezcló suavemente hasta cubrir toda la superficie y se incubó durante 4 horas a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se retiró la mezcla de Lipofectamina y se agregaron 5 mL de MEM fresco adicionado con suero y antibiótico y las células se incubaron por 20 horas más.

Las células Vero transfectadas fueron visualizadas mediante un microscopio invertido de fluorescencia con el uso de un filtro. Posteriormente se siguió el protocolo de TRIZOL®^g y una vez que se obtuvo el ARN total, este se utilizó para la RT-PCR junto con los iniciadores Morb-1 y Morb-2 para la amplificación del CAI.

^g Invitrogen®, California, EUA

6.2.8 Células Vero y MDCK utilizadas en cultivo celular para la extracción de ARN

Se utilizó cultivo de células Vero y células renales de perro (MDCK) en botellas de cultivo celular^h de 25 cm², a una temperatura de 37 °C. Se usó medio *Minimal Essencial Medium* (MEM)ⁱ adicionado con 10% de suero fetal bovino (SFB)ⁱ.

6.2.9 Extracción de ARN a partir de cultivo celular y muestras de hisopos nasales

La extracción de ARN se realizó a partir de cultivo de células Vero transfectadas, cultivo de células MDCK infectadas con distemper canino, cultivo de células MDCK sin infectar y muestras de campo, utilizando el método de extracción de ARN con Trizol®, siguiendo las recomendaciones del fabricante y realizando algunos cambios.

Extracción de ARN a partir de cultivo celular. Se retiró el medio de cultivo de las botellas, las células crecidas fueron lavadas dos veces con PBS pH 7.2 frío, se retiró el excedente de PBS y se agregó 1 mL de Trizol®, se bañó el estrato con la pipeta para desprender las células y se pasó a un microtubo. Se incubó durante 5 minutos (min) a 4 °C. Posteriormente, se agregaron 200 µl de cloroformo, se agitó vigorosamente la mezcla por 15 segundos y se incubó por 2 min a 4 °C.

Pasada la incubación, se centrifugó en un microcentrífuga refrigerada^j a 12,000 x g durante 15 min a 4 °C. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo microtubo. Se precipitó el

^h NUNC®, California, EUA

ⁱ Invitrogen®, California, EUA

^j Eppendorf, EUA

ARN con 0.5 mL de isopropanol frío, se mezcló suavemente por inversión y se incubó 10 min a 4 °C.

Se volvió a centrifugar a 12,000 x g durante 10 min a 4 °C y se retiró el sobrenadante para obtener la pastilla de ARN.

La pastilla se lavó con 1 mL de etanol al 75% preparado con agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC)^k al 0.1%. Se centrifugó a 7,500 x g durante 6 min a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente la pastilla de ARN se suspendió en 20 µl de agua con DEPC al 0.1%.

Extracción de ARN a partir de las muestras de hisopos nasales. Al hisopo se le agregó 1 mL de Trizol® en un microtubo y se mezcló durante 1 min. Esta mezcla se incubó durante 5 min a 4 °C. Se obtuvieron 800 µl, los cuales se transfirieron a un nuevo microtubo. Se agregaron 160 µl de cloroformo, se agitó vigorosamente la mezcla por 15 segundos y se incubó durante 2 min a 4 °C. Se centrifugó a 12,000 x g durante 15 min a 4 °C.

El resto del procedimiento se realizó de la misma manera que el de extracción a partir de cultivo celular, ajustando únicamente los volúmenes, agregando de esta forma 400 µl de isopropanol y 800 µl de etanol al 75% tratado con DEPC al 0.1%.

La pastilla de ARN se suspendió con 15 µl de agua con DEPC al 0.1%. Después de la extracción se midió la concentración de ARN total de cada muestra, utilizando un espectrofotómetro^l. Posteriormente, se observó la integridad del ARN mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% en amortiguador Tris-acetato-EDTA (TAE),

^k Sigma® St. Louis, MO, EUA

^l SmartSpec-Plus Spectrophotometer. Bio-Rad®, Philadelphia, EUA

teñido con bromuro de etidio en una cámara horizontal^m. Finalmente las muestras de ARN se almacenaron en un ultracongelador a -70 °C hasta su uso.

6.2.10 RT-PCR para la amplificación del CAI y morbillivirus

Se estandarizó la RT-PCR en un solo paso para la amplificación de un fragmento del gen de morbillivirus de 80 pb y el CAI de 769 pb.

La amplificación del ADNc se llevó a cabo en un volumen de reacción de 25 µl considerando la adición de 5 µl que contenían 250 ng de ARN total de cada muestra y 3 µl que contenían 150 ng de ARN total de CAI. En un tubo estéril de 0.2 mL para PCR se agregó 1 µl de los iniciadores Morb-1 y Morb-2 a una concentración de 10 µM cada uno, 5 µl de amortiguador de síntesis de 1ª cadena 5xⁿ, 2 µl de mezcla de nucleótidos trifosfatados (dNTP's)ⁿ a una concentración de 10 mM cada uno, 1 µl de DTT a 0.1 Mⁿ, 1.5 µl de MgCl₂ⁿ a una concentración final de 1.5 mM, 100 U de Transcriptasa reversa (SuperScript)ⁿ, 1 U de *Taq polimerasa*ⁿ y agua estéril tratada con DEPC al 0.1% cuanto baste para (c.b.p) 25 µl.

La RT-PCR se realizó en un termociclador^o y cada ensayo contó con un control (CAI sin ARN de muestra nasal). Los ciclos de la reacción fueron los siguientes: un ciclo a 42 °C por 50 min (transcripción reversa), un ciclo a 94 °C por 5 min (desnaturalización inicial), 35 ciclos a 94 °C por 1 min y 45 segundos (desnaturalización), 55 °C por 1 min y 45

^m Bio-Rad®, Philadelphia, EUA

ⁿ Invitrogen®, California, EUA

^o Corbett Research, California, EUA

segundos (alineamiento), 72 °C por 1 min y 45 segundos (extensión) y el último ciclo de 72 °C por 8 min (extensión final) (Figura 15).

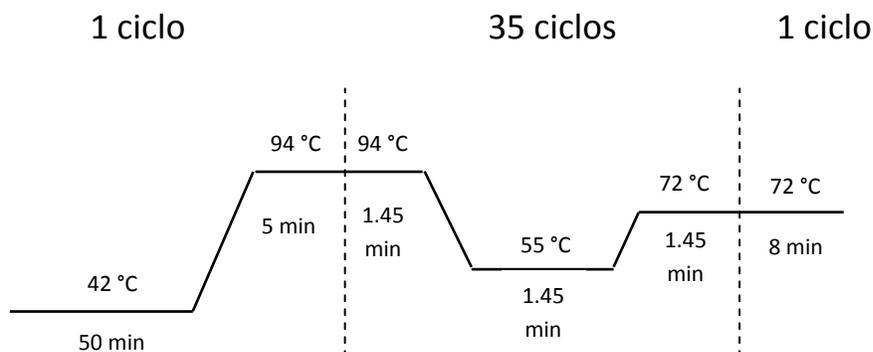


Fig. 15 Esquema con los ciclos de tiempos y temperaturas de la RT-PCR para amplificación del CAI y morbillivirus.

Los productos amplificados por RT-PCR se visualizaron a través de electroforesis con geles de agarosa al 2.5% teñidos con bromuro de etidio.

6.2.11 RT-PCR para la amplificación de morbillivirus

Se realizó una segunda RT-PCR para amplificar un fragmento del gen de morbillivirus de mayor tamaño y de esta manera confirmar o descartar su presencia. El producto esperado es de 235 pb; en esta ocasión se utilizaron los iniciadores Morb(II)- 1 y Morb(II)- 2 específicos para CDV y PDV.

La amplificación se realizó en un volumen de reacción de 25 µl adicionando 5 µl que contenían 250 ng de ARN total de cada muestra y 3 µl que contenían 150 ng de ARN total de células MDCK infectadas con distemper canino. Las concentraciones de los reactivos no se modificaron y la RT-PCR se llevó a cabo en un termociclador con los mismos ciclos

que la reacción del CAI (Figura 15). Cada ensayo contó con un control positivo (ARN obtenido de células MDCK infectadas con CDV) y un control negativo (ARN obtenido de células MDCK sin infectar).

6.3 Inmunoensayo enzimático (ELISA)

Los sueros se analizaron mediante un ELISA indirecto, para el cual el antígeno de captura se preparó a partir del virus de distemper canino, usando las cepas Snyder-Hill y Lederle (amablemente proporcionadas por el Laboratorio de Virología, departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM), las cuales se replicaron en células renales de perro (MDCK).

6.3.1 Preparación de los antígenos empleados en la prueba de ELISA

Se replicaron células MDCK en botellas de cultivo celular con una superficie de 25 cm² hasta tener una confluencia del 90%; posteriormente, se retiró el medio de cultivo MEM y el monoestrato se lavó dos veces con PBS pH 7.2 frío.

En un microtubo se colocaron 2 mL del medio de crecimiento (MEM) sin suero fetal bovino y 200 µl de la suspensión de virus, se homogenizó y la mezcla se agregó a la botella con células MDCK, se mezcló suavemente hasta cubrir toda la superficie y se incubó por 2 horas a 37 °C. Pasado el tiempo de incubación, se retiró la mezcla y se agregaron 5 mL de MEM fresco sin suero y con antibiótico; las células se incubaron a 37 °C hasta presentar un efecto citopático.

Cuando las células presentaron un efecto citopático, se realizó la extracción de ARN, siguiendo el protocolo de TRIZOL®, con las modificaciones ya mencionadas y el sobrenadante se dividió en alícuotas y posteriormente se cuantificó la cantidad de proteína por el método de Bradford.

Con la finalidad de corroborar la infección en las células MDCK, al ARN total obtenido se le realizó la RT-PCR con los iniciadores Morb(II)-1 y Morb(II)-2 para la amplificación de morbillivirus (RT-PCR morbillivirus).

El sobrenadante del cultivo celular que presentaba el fragmento de morbillivirus en la RT-PCR, fue usado para volver a infectar células MDCK en botellas de cultivo celular y posteriormente se llevó a cabo una precipitación de proteína mediante ácido tricloroacético al 20%. Brevemente, en un microtubo se agregaron 500 µl del sobrenadante de células infectadas y 500 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 20%, se homogenizó y se incubó durante 30 min en hielo; pasado el tiempo de incubación, se centrifugó a 13,500 rpm por 15 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante por decantación y se adicionaron 300 µl de acetona fría, se volvió a centrifugar a 13,500 rpm durante 5 min a 4 °C; se retiró el sobrenadante y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente. Finalmente, la pastilla se suspendió en 70 µl de PBS pH 7.2 y esta mezcla fue utilizada como antígeno en el ELISA.

Asimismo para complementar los resultados del ELISA, también se fijaron en la placa células MDCK sin infectar. Brevemente, se replicaron células MDCK en botellas de cultivo celular con una superficie de 25 cm², cuando presentaron una confluencia del 90%, se retiró el medio de crecimiento (MEM) y se agregó al monoestrato 1 mL de dodecyl sulfato de sodio (SDS) al 2% y se homogenizó; la mezcla resultante se designó como antígeno

control y se transfirió a un microtubo para cuantificar la cantidad de proteína mediante el método de Bradford.

6.3.2 Evaluación de sueros control para el ELISA

Se tomaron muestras de sangre de perros no inmunizados para obtener el suero y así utilizarlo como control negativo en la evaluación. Se analizaron tanto el antígeno como los sueros mediante la realización de un ELISA, donde se evaluó la proteína A unida a peroxidasa, la cual es ampliamente usada como segundo anticuerpo en las pruebas de ELISA, ya que tiene afinidad por las IgG de la mayoría de los mamíferos.

En microplacas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano^p, se fijaron 2 y 4 µg de antígeno (sobrenadante de células MDCK infectadas) así como 2 y 4 µg de antígeno control (células MDCK sin infectar) para identificar la cantidad mínima detectada por los sueros de perro y la proteína A unida a peroxidasa. Se realizaron diluciones 1:50, 1:150, 1:450 y 1:1350 de los sueros con PBS pH 7.2 y se incubaron por 2 horas a 37 °C, posteriormente se lavó tres veces con PBS-Tween, se incubó con proteína A unida a peroxidasa (1 µg/ mL) durante 2 horas a 37 °C, después se lavó tres veces con PBS-Tween y se le agregó el sustrato cromógeno ácido 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfónico (110 µg/ mL) y 1 µl/ 10 mL de peróxido de hidrógeno, diluidos en una solución amortiguadora de citratos pH 4.0. La placa se mantuvo a temperatura ambiente en oscuridad y se realizaron lecturas a los 5, 10 y 15 min en un lector de microplacas^q usando una longitud de onda de 405 nanometros (nm).

^p NUNC®, California, EUA

^q Microplate Reader 680, Bio-Rad®, Philadelphia, EUA

6.3.3 Procedimiento del ELISA

Una vez establecida la cantidad de proteína a fijar como antígeno en la placa, se analizaron los sueros de manatí.

En microplacas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano, se fijaron 2 µg/ pozo de proteínas totales (en la mitad de los pozos se fijó el antígeno consistente con células MDCK infectadas y en la otra mitad el antígeno control, correspondiente a células MDCK sin infectar) en un volumen de 100 µl durante 24 horas a temperatura ambiente.

Posteriormente, se lavaron tres veces con 250 µl/ pozo de PBS pH 7.2 adicionado con 0.05% de Tween 20 (PBS-Tween) en un lavador de microplacas^r. Después se bloquearon con 100 µl/ pozo de una solución de albúmina sérica bovina (ASB) al 1% durante 12 horas a temperatura ambiente; pasado este tiempo, se lavaron tres veces con PBS-Tween. Se incubaron diluciones triples seriadas de los sueros de manatí iniciando en 1:50 hasta 1:4050 durante 2 horas a 37 °C; una vez pasado el tiempo de incubación, se lavaron tres veces con PBS-Tween y se agregaron 100 µl de una solución de proteína A unida a peroxidasa (1 µg/ mL) y se incubó 2 horas a 37 °C. Se realizaron de nuevo tres lavados con PBS-Tween y se adicionaron 100 µl del sustrato cromógeno, ácido 2,2'-Azino-bis-3-ethylbenzyliazoline-6-sulfónico (ABTS)^s y 1 µl/ 10 mL de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) ambos diluidos en una solución amortiguadora de citratos pH 4.0 (Ácido cítrico 109 mM y citrato de sodio 99 mM). Las placas se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente y se realizó la lectura a los 20 min en un lector de microplacas^t usando una longitud de onda de 405 nm.

^r Immunowash 1250, Bio-Rad®, Philadelphia, EUA

^s Sigma® St. Louis, MO, EUA

^t Microplate Reader 680, Bio-Rad®, Philadelphia, EUA

Cada microplaca contó con un suero control negativo, un blanco (sin suero) y cada muestra de suero de manatí se analizó por duplicado con el antígeno control (células MDCK sin infectar). Finalmente, se realizó el análisis de varianza a partir de los valores de absorbancia obtenidos con los sueros controles negativos y los sueros de manatíes desde la dilución 1:50 y hasta la dilución 1:1350 a un tiempo de lectura de 20 min.

7. RESULTADOS

Se colectaron y analizaron 10 muestras de secreción nasal de manatíes adultos (3 hembras y 2 machos) y juveniles (4 hembras y 1 macho) mediante la estandarización de la RT-PCR con el uso de controles de amplificación interna. También se colectaron 11 muestras de suero sanguíneo de los manatíes adultos y juveniles, y además de una cría macho para su análisis mediante la realización de un ELISA.

7.1 RT-PCR

7.1.1 PCR para la amplificación del CAI

Para el diseño del CAI primero se realizó una PCR para obtener una amplificación de 769 pb, a partir de ADN obtenido de un kit de expresión y utilizando los iniciadores compuestos Morb-GFP-1 y Morb-GFP-2, los cuales presentan la construcción de los fragmentos del gen de morbillivirus y las secuencias de la proteína verde fluorescente (GFP). Posteriormente, el producto amplificado fue usado para la clonación del CAI (Figura 16).

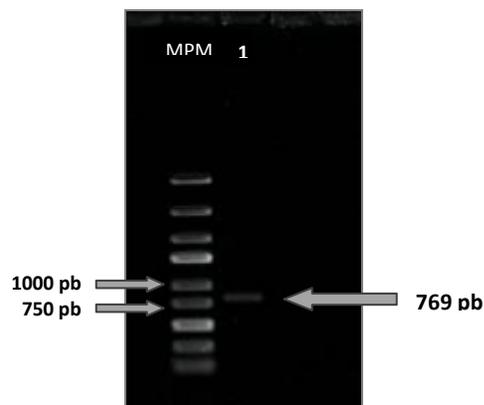


Fig. 16 Foto de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1: Producto de PCR usado para la clonación del CAI. MPM= Marcador de peso molecular Gene Ruler Express.

7.1.2 Diseño y clonación del CAI

Una vez obtenido el producto de 769 pb, correspondiente a la construcción del CAI, ésta se insertó en el sitio de clonación del vector pcDNA 3.1/V5-His Topo®.

Posteriormente, se realizó la transformación mediante células competentes *E.coli* DH5α en placas de agar LB sólido con ampicilina mediante el protocolo de transformación química. Se eligieron aleatoriamente colonias transformantes de las cuales se obtuvo el ADN plasmídico (Figura 17).

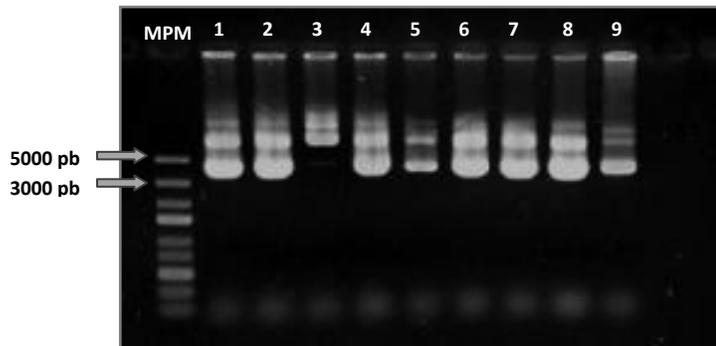


Fig. 17 Foto de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1 al 9: ADN plasmídico obtenido a partir de las colonias transformantes. MPM= Marcador de peso molecular Gene Ruler Express.

Para identificar a las colonias bacterianas portadoras del plásmido con el inserto, se realizó una PCR utilizando los iniciadores Morb-1 y Morb-2, en dichas colonias se logró amplificar el CAI (Figura 18).



Fig. 18 Foto de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1 al 10: Productos de amplificación de 769 pb correspondientes al inserto del CAI. MPM= Marcador de peso molecular Gene Ruler Express.

Para comprobar que la secuencia del CAI en el ADN plasmídico extraído estuviera en la dirección correcta para ser expresado en células eucariontes, se llevó a cabo una *PCR de dirección*, a partir de las colonias bacterianas seleccionadas. El ADN plasmídico resultante de las colonias que se encontraron en dirección fue purificado y utilizado para la transfección (Figura 19 A y B).

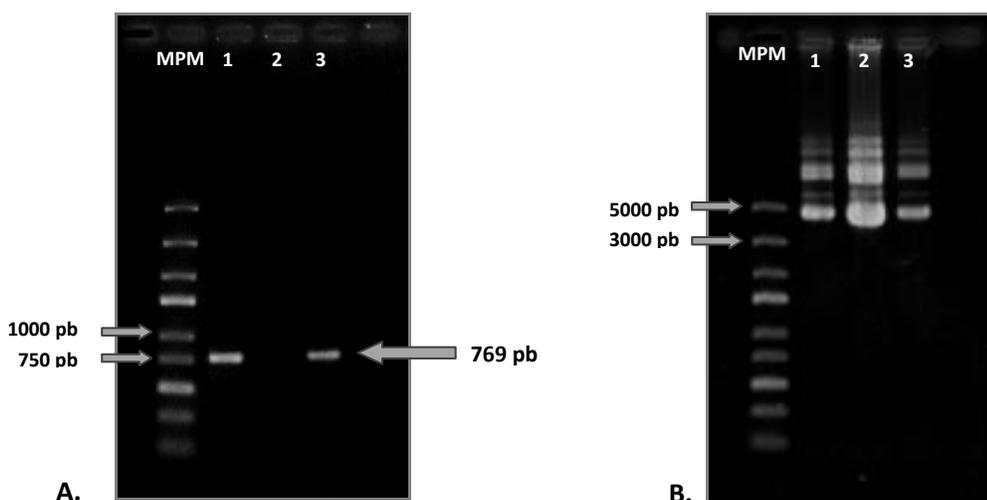


Fig. 19 A. Foto de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Se observan los productos del PCR de dirección correspondientes a 769 pb. Carril 1: Reacción 1, donde se obtiene un producto de amplificación de 769 pb correspondiente al CAI. Carril 2: Reacción 2, donde no se obtiene amplificación alguna. Carril 3: Reacción 3, donde se obtiene un producto de 769 pb, indicando que el CAI está en la dirección correcta. MPM= Marcador de peso molecular Gene Ruler Express.

B. Foto de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1 al 3: ADN plasmídico en dirección después de la purificación. MPM= Marcador de peso molecular Gene Ruler Express.

Se realizó la transfección del ADN plasmídico en cultivo de células Vero mediante el uso de Lipofectamine™ LTX and Plus Reagent®, con la finalidad de expresar el CAI clonado en células eucariontes.

Posteriormente, las células Vero transfectadas fueron visualizadas mediante un microscopio invertido de fluorescencia con el uso de un filtro (Figura 20) y después se

realizó la extracción de ARN total y una vez obtenido se llevó a cabo una RT-PCR utilizando los iniciadores Morb-1 y Morb-2 (Figura 21).

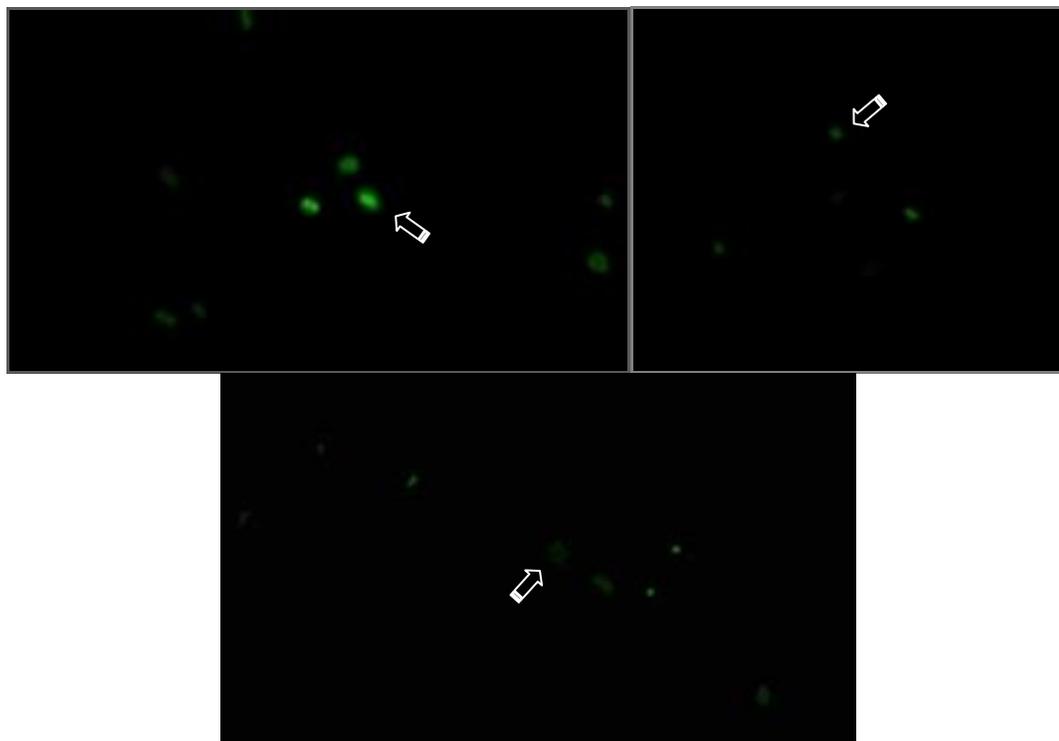


Fig. 20 Fotomicrografía de cultivo de células Vero transfectadas. Se observa la fluorescencia en el citoplasma y núcleo de las células (flecha), indicando que el CAI fue expresado en células eucariontes.

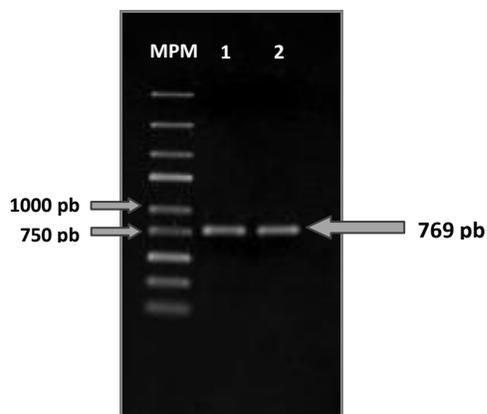


Fig. 21 Foto de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. RT-PCR utilizando ARN total de células Vero transfectadas, obteniendo productos de amplificación de 769 pb correspondientes al CAI. Carril 1 al 2: CAI. MPM= Marcador de peso molecular Gene Ruler Express.

7.1.3 RT-PCR para la amplificación del CAI y morbillivirus

Se evaluó la utilización de las células Vero transfectadas con el CAI, empleando el ARN de las células junto con el ARN de las secreciones nasales de los manatíes para finalmente realizar la RT-PCR, utilizando los iniciadores Morb-1 y Morb-2 con los cuales se logra la amplificación del CAI (769 pb) y de un producto de 80 pb perteneciente a un fragmento del gen P de morbillivirus en muestras positivas.

Se procesaron en total 10 muestras de secreciones nasales de manatí, de las cuales todas presentaron la amplificación del producto de 769 pb correspondiente al CAI y solo dos muestras amplificaron una banda difusa (Figura 22). Todas las muestras fueron procesadas una segunda vez en el *RT-PCR para morbillivirus*, sin obtener amplificación alguna.

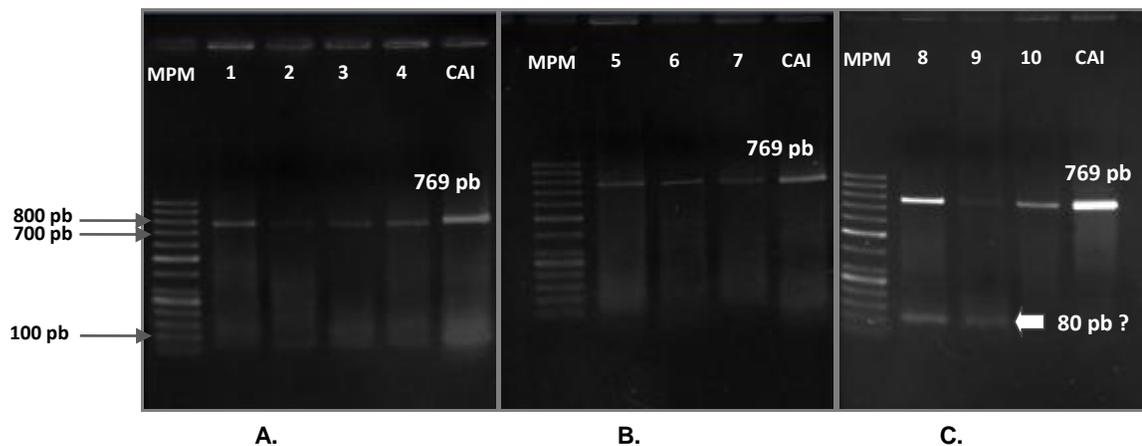


Fig. 22 Foto de un gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio. RT-PCR utilizando el CAI y secreciones nasales de manatí. **A y B:** Carril 1 al 7. Amplificación de 769 pb correspondiente al CAI sin amplificación alguna de morbillivirus (80 pb). **C:** Carril 8 y 9. Amplificación del CAI y una posible amplificación de morbillivirus correspondiente a 80 pb. Carril 10: Amplificación del CAI sin amplificación de morbillivirus. CAI= Control de amplificación interna sin muestras nasales. MPM= Marcador de peso molecular 50 pb Gene Ruler Express.

7.1.4 RT-PCR para la amplificación de morbillivirus

No obstante que los iniciadores de Morb-1 y Morb-2 fueron diseñados a partir de la secuencia de un fragmento del gen P de morbillivirus, para confirmar los resultados obtenidos se consideró otro control externo para asegurar que la ausencia del amplificado de 80 pb correspondiente al morbillivirus, se debía a la ausencia de ARN en las muestras.

Con este fin se realizó una RT-PCR a partir de ARN total de cultivo de células MDCK infectadas para la amplificación de un fragmento de 235 pb correspondiente a morbillivirus (CDV y PDV). El ARN que amplificó fue usado como control positivo en cada RT-PCR con las muestras problema, no obteniéndose en ninguna muestra una amplificación (Figura 23). Cada RT-PCR contó además, con un control positivo (ARN obtenido de células MDCK infectadas con CDV) y un control negativo (ARN obtenido de células MDCK sin infectar).

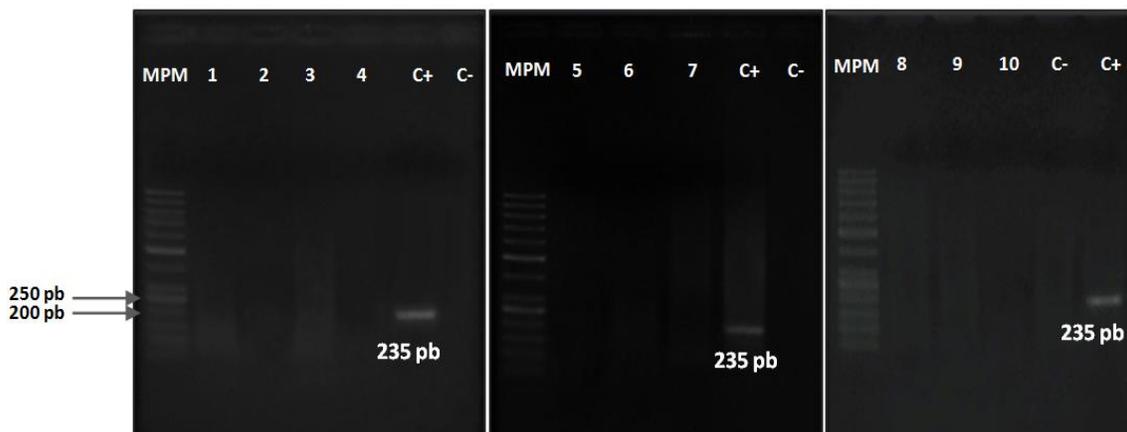


Fig. 23 Foto de un gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio. RT-PCR utilizando ARN total de células MDCK infectadas, obteniendo productos de amplificación de 235 pb correspondientes al CDV. Carril 1 al 10: Secreciones nasales de manatíes. C+= Control positivo (células MDCK infectadas) con un producto de amplificación de 235 pb. C-= Control negativo (células MDCK sin infectar). MPM= Marcador de peso molecular 50 pb Gene Ruler Express.

Debido a que se obtuvo en dos muestras nasales de manatí una amplificación difusa en la RT-PCR con el CAI y morbillivirus, esta fue purificada y enviada a la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología perteneciente a la UNAM, campus Morelos, para obtener la secuencia de dichos productos. El análisis muestra que la secuencia no corresponde a morbillivirus, con lo cual se descarta su presencia y confirma los resultados negativos. La secuencia obtenida corresponde a una bacteria endosimbionte llamada *Candidatus portiera aleyrodidarum* (Figura 24).

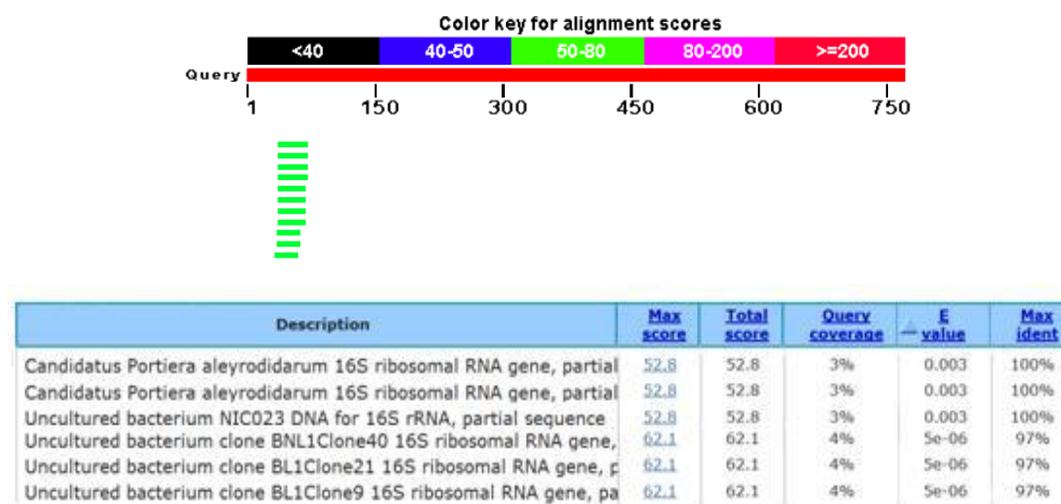


Fig. 24 Diagrama donde se muestra la homología de las secuencias reportadas con la secuencia de la amplificación presente en dos de las secreciones nasales de manatí mediante el BLAST de NCBI.

7.2 Inmunoensayo enzimático (ELISA)

Las células MDCK inoculadas en cultivo celular con el virus de Distemper canino, tanto con la cepa Lederle como con la cepa Snyder-Hill a los 4 días de la infección presentaron un efecto citopático donde se observaron células redondeadas, formación de sincitios y agregación celular en forma de racimos de uvas (Figura 25).

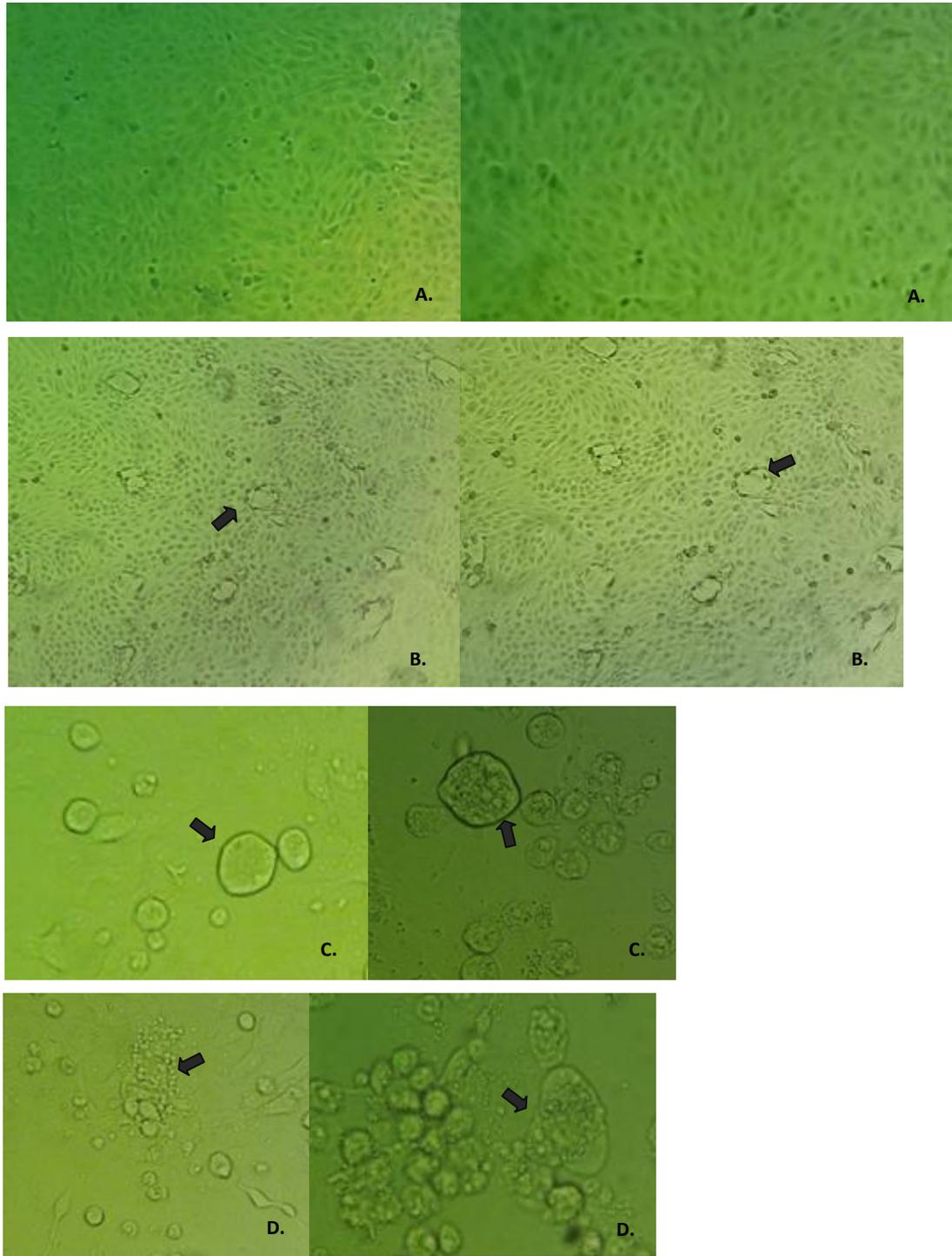


Fig. 25 Fotomicrografía de cultivo de células MDCK infectadas con Distemper canino (cepa Snyder-Hill). Se observa el efecto citopático (flechas). **A.** Células MDCK sin infectar. **B y C.** Células MDCK 72 horas post-infección, las flechas muestran la formación de sincitios. También se observan a las células redondeadas y aumentadas de tamaño. **D.** Células MDCK 96 horas post-infección, se presenta agregación y vacuolización celular (flecha).

Al ARN obtenido de los monoestratos infectados con las cepas del virus, se observó íntegro y se les realizó una RT-PCR con los iniciadores Morb(II)-1 y Morb(II)-2, amplificando un fragmento de 235 pb específico para CDV y PDV. El sobrenadante del cultivo celular que presentaba el fragmento de morbillivirus, fue usado para volver a infectar células MDCK en botellas de cultivo celular.

Con base en estos análisis, se utilizaron las proteínas totales de la cosecha viral (proteínas del virus a partir del sobrenadante de las células) como antígeno de captura. Asimismo para fortalecer los resultados del ELISA, también se fijaron proteínas totales de células MDCK sin infectar.

Los sueros control se analizaron a diferentes diluciones (1:50, 1:150, 1:450 y 1:1350), determinándose un tiempo de lectura de 20 min. Una vez establecida las condiciones de la prueba de ELISA se analizaron los sueros de manatí.

Se analizaron 11 sueros de manatíes antillanos provenientes de la Laguna de las Ilusiones, Tabasco y no se encontró evidencia de exposición al virus. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 1.

MANATÍ	VALORES DE ABSORBANCIA	
	Dilución	D.O. 405 nm
103-272-620	1:50	0.060
	1:150	0.059
	1:450	0.058
	1:1350	0.057
001-310-639	1:50	0.064
	1:150	0.058
	1:450	0.052
	1:1350	0.052
103-535-357	1:50	0.068
	1:150	0.059
	1:450	0.058
	1:1350	0.058
103-342-839	1:50	0.074
	1:150	0.069
	1:450	0.064
	1:1350	0.064
103-261-089	1:50	0.076
	1:150	0.075
	1:450	0.060
	1:1350	0.060
103-024-848	1:50	0.077
	1:150	0.075
	1:450	0.075
	1:1350	0.074

MANATÍ	VALORES DE ABSORBANCIA	
	Dilución	D.O. 405 nm
S/N	1:50	0.078
	1:150	0.077
	1:450	0.064
	1:1350	0.062
S/N	1:50	0.078
	1:150	0.078
	1:450	0.075
	1:1350	0.071
103-040-817	1:50	0.081
	1:150	0.076
	1:450	0.076
	1:1350	0.075
103-310-272	1:50	0.088
	1:150	0.084
	1:450	0.084
	1:1350	0.083
103-015-620	1:50	0.088
	1:150	0.082
	1:450	0.082
	1:1350	0.074

Cuadro 1. Valores de absorbancia de los sueros de manatíes en las diferentes diluciones analizadas. Lectura a los 20 minutos.

Al realizar el análisis de varianza entre los valores de absorbancia de los sueros de los manatíes y los sueros control, se determinó que los sueros de manatíes se comportan en el ensayo como los sueros de los animales negativos a CDV (Cuadro 2), incluso se pudo establecer a los sueros de manatí como un grupo diferente a los sueros controles negativos ($P \leq 0.05$), por sus absorbancias un poco más bajas (Figura 26).

MANATÍ	MEDIA D.O. MANATÍ – CONTROL NEGATIVO	<u>ANÁLISIS DE VARIANZA</u>	
103-024-848	0.075 – 0.130	Media manatí- control negativo	0.070- 0.12
S/N	0.070 – 0.130		
103-272-620	0.058 – 0.130	Desv. Estándar	0.002- 0.005
001-310-639	0.056 – 0.130		
103-310-272	0.085 – 0.123		
103-015-620	0.081 – 0.123		
103-261-089	0.067 – 0.123		
103-342-839	0.067 – 0.123		
103-040-817	0.077 – 0.118		
S/N	0.075 – 0.118		
103-535-357	0.061 – 0.118		

Cuadro 2. Comparación de la media a partir de los valores de absorbancia de los sueros de manatíes y los sueros controles negativos de las diferentes diluciones analizadas. Lectura a los 20 minutos.

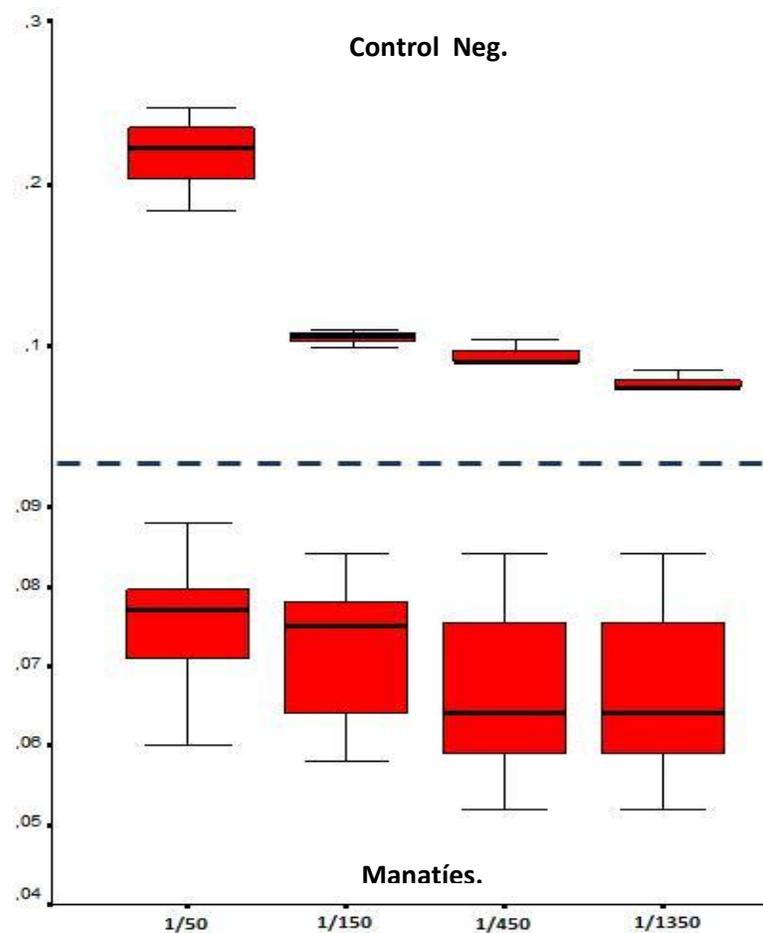


Fig. 26 Gráfica con la media y la desviación estándar de los valores de absorbancia de los sueros controles negativos y los sueros de manatí en las diferentes diluciones analizadas, mostrándose como grupos diferentes. Lectura a los 20 minutos.

8. DISCUSIÓN

El presente trabajo constituye el primer estudio sobre morbillivirus realizado en manatíes de vida libre en México, en el se analizaron 11 muestras de sueros y 10 muestras de secreciones nasales (a partir de hisopos nasales) de manatíes, para detectar la presencia de morbillivirus, este diagnóstico se llevó a cabo mediante la estandarización y el uso de la RT-PCR con controles de amplificación interna y ELISA. Los resultados obtenidos no muestran evidencia sobre la presencia de morbillivirus en esta población de manatíes, estableciendo con esto un punto de inicio para el manejo integral de la colonia de manatíes antillanos de la Laguna de las Ilusiones de Villahermosa, Tabasco.

Aunque las pruebas de diagnóstico molecular son sensibles y específicas, no están exentas de presentar resultados falsos negativos; esta situación puede ser evaluada mediante el uso de controles externos positivos ^[72]. Sin embargo, las muestras clínicas por su origen pueden contener factores inhibidores o éstos pueden adquirirse durante la extracción de los ácidos nucleicos presentando resultados falsos negativos. El uso de controles de amplificación interna, a diferencia de los controles externos positivos, radica en que al ser colocados en cada una de las muestras clínicas, generan información sobre la eficiencia de la extracción y de las condiciones en que se lleva a cabo la reacción, detectando con precisión las muestras verdaderamente negativas ^[72, 73]. Es por ello, que en este trabajo se construyó un control de amplificación interna (CAI) de tipo competitivo, el cual utiliza un solo par de iniciadores para amplificar tanto al CAI como a la secuencia de interés, éste control interno fue usado en conjunto con las muestras clínicas para la detección de morbillivirus, con excelentes resultados.

Hasta ahora, se sabe de la existencia de trabajos donde utilizan controles externos para el diagnóstico de morbillivirus, sin embargo, hasta la fecha no se ha reportado ningún

estudio que utilice un sistema de expresión en células eucariontes para producir moléculas de ARNm del CAI, logrando su expresión en conjunto con una fluorescencia en las células. Este CAI además, puede ser fácilmente utilizado y reproducido en cualquier laboratorio que realice el diagnóstico de morbillivirus, facilitando la realización de estudios más completos sobre morbillivirus en fauna silvestre.

Para favorecer la expresión del CAI en células eucariontes, se utilizó un plásmido con un promotor de expresión fuerte acoplado al gen de la proteína verde fluorescente, lo cual permitió conocer con exactitud la eficiencia de la transfección con solo observar las células en un microscopio de fluorescencia. Por otro lado, la adición de las células Vero transfectadas con el plásmido a las muestras clínicas, permitió evaluar desde la metodología de la extracción del ARN total hasta las condiciones en las que se realizó la RT-PCR para la detección de morbillivirus.

La utilidad del CAI se evaluó con la adición de células Vero transfectadas y las muestras de secreciones nasales de manatíes. De esta manera, la amplificación del CAI apoya los resultados obtenidos, ya que la presencia de la amplificación del CAI y la ausencia del producto correspondiente a morbillivirus permite validar este resultado como negativo. Existen varios trabajos donde se demuestra la utilidad de los CAI en la detección de diversos agentes infecciosos en México, tales como el virus causante de la viremia primaveral de la carpa, el virus de la necrosis pancreática infecciosa en truchas y herpesvirus en tortugas ^[76, 77, 78].

No obstante, todo sistema de diagnóstico tiene un límite de detección, para resolver este problema en el caso del CAI, se realizó la cuantificación y la dilución del ARN total para la RT-PCR, encontrando que 50 ng de ARN total de las células eran suficientes para amplificar el fragmento deseado. El ARN obtenido de algunas muestras fue escaso, lo

cual puede deberse a que el material tomado con el hisopo fue poco, además que pudo ser degradado durante el transporte y almacenamiento de las muestras, sin embargo, la cantidad de ARN total de las muestras nunca fue menor a los 50 ng necesarios para la amplificación de morbillivirus, por lo que el empleo del CAI provee una confianza de que las condiciones en las cuales se realizaron la extracción de ARN total y la RT-PCR fueron correctas y que no hubo factores inhibidores.

En varias ocasiones la constante búsqueda de algún agente infeccioso conlleva a la presencia de amplificaciones inespecíficas, en nuestro caso aunque el CAI nos mostraba que las bandas difusas en la RT-PCR no correspondían a morbillivirus, estos fragmentos fueron purificados y se obtuvo su secuencia, comprobando así que no se trataba de morbillivirus sino de una bacteria llamada *Candidatus portiera aleyrodidarum*.

Existe evidencia que demuestra a *Candidatus portiera aleyrodidarum* como un endosimbionte de la mosca blanca. La presencia de este endosimbionte en la secreción nasal del manatí sugiere una relación evolutiva y ecológica de la mosca blanca con el hábitat del manatí ^[79].

Finalmente, con la RT-PCR diseñada en este trabajo, no fue detectado ningún morbillivirus, ya que las muestras analizadas amplificaron el CAI pero no el fragmento de 80 pb específico del gen P de los morbillivirus. Esto sugiere que la población de manatíes de Villahermosa, Tabasco, no presentaba una infección activa por morbillivirus en el momento del muestreo; sin embargo, es importante señalar que morbillivirus se ha presentado mediante brotes esporádicos, por lo que deben realizarse más muestreos y estrategias de vigilancia implementando técnicas de diagnóstico para morbillivirus donde podría usarse el CAI.

Se utilizó el virus de Distemper canino (cepa Snyder-Hill) en el ELISA indirecto, esperando encontrar evidencia serológica. Los sueros de manatíes no presentaron títulos detectables de anticuerpos contra el virus de Distemper canino y por lo tanto tampoco contra el Distemper de los fócidos, debido a su similitud con el virus de Distemper canino (80% aproximadamente). Se utilizó la Proteína A en lugar de un segundo anticuerpo, la cual tiene gran afinidad por las IgG. ^[19, 48, 14, 80]

La ausencia de anticuerpos séricos contra el virus de Distemper indica que probablemente los manatíes no han sido expuestos al virus o que los niveles de anticuerpos hayan decaído durante el muestreo y no pudieron ser detectados, sin embargo, los análisis hematológicos no muestran variaciones en la población que indiquen un estado de inmunosupresión, situación característica en una infección por morbillivirus y que hubiera podido afectar los resultados del ELISA ^[49, 50, 51].

Los animales capturados para este trabajo eran adultos y jóvenes, así como una cría de manatí de aproximadamente un año de edad y ninguno de los individuos mostró una respuesta inmune detectable por las técnicas empleadas aquí, indicando que esta población de manatíes antillanos no muestra evidencia sobre la presencia de morbillivirus; si bien a primera vista el tamaño de la muestra pareciese reducido, esto no es así porque el número de animales en la Laguna es pequeño, además, el hecho de que se hayan muestreado adultos y juveniles asegura un muestreo completo de la población. Dado que, los manatíes no son animales sociales, en el invierno forman grupos y a menudo frotan sus cabezas y practican coprofagia, comportamiento que podría facilitar la transmisión del virus, de esta forma, si la población de manatíes tuviera contacto con este virus a través de un reservorio o transmisor, se podría presentar un brote infeccioso que afectara a varios miembros de la población ^[34].

Las muestras utilizadas en este trabajo para detectar el virus se consideraron adecuadas debido a que se sabe que las vías de eliminación de morbillivirus son la respiratoria, urinaria, genital, fecal y ocular. La cantidad de muestras analizadas (11) son representativas de la población de Villahermosa, Tabasco; sin embargo, sería conveniente continuar con el muestreo de animales jóvenes y crías para conocer mejor su situación serológica respecto a morbillivirus.

Hasta ahora, el único estudio sobre morbillivirus en manatíes de vida libre que se conoce, se llevó a cabo con manatíes de Florida (*Trichechus manatus latirostris*), después de la epizootia de focas comunes en Europa. Para este caso, se realizó un estudio serológico y se encontró evidencia de infección por un virus similar al morbillivirus cetáceo (CeMV). Sin embargo, no existe evidencia de la presencia o exposición a morbillivirus en el manatí antillano, amazónico y africano, siendo este el primer trabajo realizado sobre morbillivirus en manatíes antillanos en México ^[34].

En febrero de 1999 se reportó una mortalidad de lobos marinos en la Isla San Jorge, Sonora, y se informó verbalmente de la detección de Distemper canino y Distemper de los fócidos mediante RT-PCR en estos animales. Igualmente, se han detectado delfines seropositivos a morbillivirus cetáceo en las costas de Perú, sugiriendo que morbillivirus está presente no solo en las costas del Golfo de México sino también en las costas del Pacífico, no muy lejos de las costas mexicanas ^[81]. En la población de manatíes antillanos de la Laguna de las Ilusiones, además de la interacción con especies silvestres, también existe cierto contacto con carnívoros terrestres constituyendo un riesgo para los manatíes, por lo cual se vuelve una necesidad inaplazable el monitoreo constante de la fauna asociada a esta población. En este trabajo también se estandarizó una RT-PCR para distemper canino y de fócidos, el cual puede ser útil en este monitoreo.

Con lo anterior, no se puede descartar la infección de morbillivirus en manatíes antillanos, se debe tomar en cuenta que las condiciones ambientales pueden facilitar la dispersión del agente infeccioso entre las especies, por ejemplo, ciertas condiciones climáticas y la pérdida de hábitats pueden causar que las especies tengan que compartir zonas para crianza o alimentación, provocando contactos no usuales entre ellas ^[7].

En contraste con toda la información disponible sobre Distemper de los fócidos en focas, lo que se conoce de estos virus en manatíes es nulo. Los manatíes son susceptibles a estos virus y si estas poblaciones tuvieran contacto con dichos agentes probablemente a través de reservorios o transmisores, tal vez se podría presentar una mortalidad, lo cual sería muy riesgoso para esta especie y especialmente para la población de la Laguna de las Ilusiones. De ahí la importancia de realizar monitoreos para detectar estos agentes, conocer sus posibles consecuencias y establecer estrategias de manejo en esas poblaciones. En este trabajo se encuentra el procedimiento detallado para la detección de estos agentes.

Con el propósito de lograr un mejor entendimiento de la dinámica de las enfermedades en áreas donde convergen una gran variedad de especies, es necesario conocer los factores ecológicos que pueden favorecer las tasas de transmisión de los agentes infecciosos. El Distemper de los fócidos y el morbillivirus cetáceo no habían sido documentados antes de 1988, lo cual sugiere que las epizootias se han debido, en parte, al impacto de las actividades humanas en las diferentes poblaciones de focas, peces y el ambiente marino en general ^[7]. Bajo este panorama la Laguna de las Ilusiones está constantemente modificada por diversas actividades humanas, este trabajo en conjunto con otros realizados en la misma población, representa un esfuerzo por conservar esta especie.

A partir del deterioro del ambiente se han instrumentado una serie de medidas que intentan mantener, recuperar o aumentar poblaciones silvestres, así como disminuir la poblaciones que son perjudiciales para las especies nativas, dando origen a técnicas de manejo con fines de conservación. Estas técnicas pueden estar relacionadas con el manejo del hábitat o el manejo directo de las poblaciones a través de programas de introducción, reintroducción y traslocación. Sin embargo, hasta la fecha, han sido pocos los programas de manejo que han usado información sobre estudios epidemiológicos en las diferentes especies manejadas ^[70].

El acercamiento del médico veterinario a los temas de conservación de los recursos naturales es una necesidad inaplazable en México, uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo, con el fin de que contribuya a conservar esa diversidad biológica ^[70].

9. CONCLUSIONES

- I. Este es el primer trabajo realizado sobre morbillivirus en manatíes antillanos de vida libre en México.
- II. Se diseñó y construyó un control de amplificación interna a partir de un vector de expresión en células eucariontes y se demostró su utilidad para monitorear enfermedades cuyos agentes etiológicos involucrados no es posible obtener.
- III. Dado que por medio de las técnicas de RT-PCR y ELISA no se detectó la presencia de morbillivirus, podemos afirmar que no existe evidencia de la presencia de este agente en la población de manatíes antillanos (*Tichechus manatus manatus*) de Laguna de las Ilusiones en Villahermosa, Tabasco.

10. PERSPECTIVAS

- I.- Realizar monitoreos constantes en la población de manatíes antillanos así como de la fauna asociada a esta población, para determinar la presencia de morbillivirus.
- II.- Continuar la evaluación del CAI, para ser utilizado y reproducido en cualquier laboratorio que realice diagnóstico con muestras clínicas de animales posiblemente infectados.

LITERATURA CITADA

- 1.- Harwood J and Hall A. Mass mortality in marine mammals: Its implications for population dynamics and genetics. *Trends Ecol Evol* 1990; 5: 254- 257.
- 2.- Müller G, Wohlsein P, Beineke A, Haas L, Siebert U, Fonfara S *et al.* Phocine Distemper in German Seals, 2002. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 723-725.
- 3.- Kennedy S. Morbillivirus infections in aquatic mammals. *J Comp Pathol* 1998; 119: 201-225.
- 4.- Sips GJ, Chesik D, Glazenburg L, Wilschut J, De Keyser J and Wilczak N. Involvement of morbilliviruses in the pathogenesis of demyelinating disease. *Rev Med Virol* 2007. In press.
- 5.- Kennedy S. Morbillivirus infections in aquatic mammals, in: Williams ES, Barker IK editors. *Infectious Diseases of Wild Mammals*. Part I/ Viral and Prion Diseases. 3th Ed. Iowa State University Press. 2001, 64-72.
- 6.- Barrett T, Blixenkrone-Moller M, Di Guardo G, Domingo M, Duignan P, Hall A *et al.* Morbilliviruses in aquatic mammals: report on round table discussion. *Vet Microbiol* 1995; 44: 261-265.
- 7.- Rijks JM. Multidisciplinary analysis of the 2002 phocine distemper virus epidemic in the Netherlands. (Doctoral thesis). Rotterdam University. 2008.
- 8.- Osterhaus ADME, Groen J, Spijkers HEM, Broeders HWJ, UytdeHaag FGCM, de Vries P *et al.* Mass mortality in seals caused by newly discovered virus-like morbillivirus. *Vet Microbiol* 1990; 23: 343-350.

- 9.- Stanton JB, Brown CC, Poet S, Lipscomb TP, Saliki J and Frasca S. Retrospective Differentiation of Canine Distemper Virus and Phocine Distemper Virus in Phocids. *J Wildl Dis* 2004; 40: 53-59.
- 10.- Dietz R, Heide-Jørgensen MP and Härkönen T. Mass deaths of harbour seals (*Phoca vitulina*) in Europe. *Ambio* 1989; 18: 258-264.
- 11.- Härkönen T, Dietz R, Reijnders P, Teilmann J, Harding K, Hall A *et al.* A review of the 1988 and 2002 phocine distemper virus epidemics in European harbour seals. *Dis Aquat Organ* 2006; 68: 115-130.
- 12.- Barrett T. Rinderpest and Distemper Viruses, in: Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV editors. *Encyclopedia of Virology*. 3th Ed. Academic Press. 2008, 497-507.
- 13.- Duignan P, Sadove S, Saliki JT and Geraci JR. Phocine Distemper in Harbour Seals (*Phoca vitulina*) from Long Island, New York. *J Wildl Dis* 1993; 29: 465-469.
- 14.- Duignan P, Saliki JT, St. Aubin DJ, Early G, Sadove S, House JA *et al.* Epizootiology of morbillivirus infection in north american harbour seals (*Phoca vitulina*) and gray seals (*Halichoerus grypus*). *J Wildl Dis* 1995; 31: 491-501.
- 15.- Lipscomb TP, Kennedy S, Moffett D, Krafft A, Klaunberg BA, Lichy JH *et al.* Morbilliviral epizootic in bottlenose dolphins of the Gulf of Mexico. *J Vet Diagn Invest* 1996; 8: 283-290.
- 16.- Kreutzer M, Kreutzer R, Siebert U, Müller G, Reijnders P, Brasseur S *et al.* In search of virus carriers of the 1988 and 2002 phocine distemper virus outbreaks in European harbour seals. *Arch Virol* 2008; 153: 187-192.

17.- Markussen NH and Have P. Phocine distemper virus infection in harp seals (*Phoca groenlandica*). *Mar Mamm Sci* 1992; 8: 19-26.

18.- Barrett T, Wohlsein P, Bidewell CA and Rowell SF. Canine distemper virus in a Californian sea lion (*Zalophus californianus*). *Vet Rec* 2004; 154: 334-336.

19.- Mamaev LV, Denikina NN, Belikov SI, Volchkov VE, Visser IKG, Fleming M *et al.* Characterisation of morbilliviruses isolated from Lake Baikal seals (*Phoca sibirica*). *Vet Microbiol* 1995; 44: 251-259.

20.- Forsyth MA, Kennedy S, Wilson S, Eybatov T and Barrett T. Canine distemper virus in a Caspian seal. *Vet Rec* 1998; 143: 662- 664.

21.- Ohishi K, Ando A, Suzuki R, Takishita K, Kawato M, Katsumata E, *et al.* Host-virus Specificity of Morbilliviruses Predicted by Structural Modeling of the Marine Mammal SLAM, a receptor. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2008; 10: 1-12.

22.- Kennedy S, Kuiken T, Jepson PD, Deaville R, Forsyth MA, Barrett T *et al.* Mass Die-Off of Caspian seals caused by Canine Distemper Virus. *Emerg Infect Dis* 2000; 6: 637-639.

23.- Earle JAP, Melia MM, Doherty NV, Nielsen O and Cosby SL. Phocine distemper virus in seals, East Coast, United States, 2006. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 215-220.

24.- Visser IKG, Van Bresseem MF, de Swart RL, van de Bildt MWG, Vos HW, Saliki JT *et al.* Characterization of morbilliviruses isolated from dolphins and porpoises in Europe. *J Gen Virol* 1993; 74: 631-641.

- 25.- Barrett T, Visser IKG, Mamaev LV, Goatley L, Van Bresse MF and Osterhaus ADME. Dolphin and Porpoise Morbilliviruses Are Genetically Distinct from Phocine Distemper Virus. *Virology* 1993; 193: 1010-1012.
- 26.- Wohlsein P, Puff C, Kreutzer M, Siebert U and Baumgärtner W. Distemper in a dolphin. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 1959-1961.
- 27.- Birkun A Jr, Kuiken T, Krivokhizhin S, Haines DM, Osterhaus ADME, van de Bildt MWG *et al.* Epizootic of morbilliviral disease in common dolphins (*Delphinus delphis ponticus*) from the Black Sea. *Vet Rec* 1999; 144: 85-92.
- 28.- Duignan P, House C, Geraci JR, Early G, Copland HG, Walsh MT, Bossart GD *et al.* Morbillivirus infection in two species of Pilot Whales (*Globicephala* sp.) from the Western Atlantic. *Mar Mamm Sci* 1995; 11: 150-162.
- 29.- Taubenberger JK, Tsai MM, Atkin TJ, Fanning TG, Krafft A, Moeller RB *et al.* Molecular genetic evidence of a novel morbillivirus in a Long-Finned Pilot Whale (*Globicephalus melas*). *Emerg Infect Dis* 2000; 6: 42-45.
- 30.- Reidarson TH, McBain J, House C, King DP, Stott JL, Krafft A *et al.* Morbillivirus infection in stranded common dolphins from the Pacific Ocean. *J Wildl Dis* 1998; 34: 771-776.
- 31.- Blixenkrone-Moller M, Boldt G, Gottschalck E and Kenter M. Comparative analysis of the gene encoding the nucleocapsid protein of dolphin morbillivirus reveals its distant evolutionary relationship to measles virus and ruminant morbilliviruses. *J Gen Virol* 1994; 75: 2829-2834.

- 32.- Kennedy S. Infectious Disease in Marine Mammals, in: Dierauf LA and Gulland FMD, editors. *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine*. 2nd Ed. CRC Press. USA. 2001, 296-298.
- 33.- Duignan PJ. Morbillivirus Infections of Marine Mammals, in: Fowler M and Miller E, editors. *Zoo and Wild Animal Medicine*. 4th Ed. Saunders Company. USA. 1999, 497-501.
- 34.- Duignan PJ, House C, Walsh MT, Campbell T, Bossart GD, Duffy N *et al*. Morbillivirus infection in manatees. *Mar Mamm Sci* 1995; 11: 441-451.
- 35.- Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ, editors. Paramyxoviridae, in: *Veterinary Virology*. 3th Ed. Academic Press. USA. 1999, 411-428.
- 36.- MacLachlan NJ and Dubovi EJ, editors. Paramyxoviridae, in: *Fenner's Veterinary Virology*. 4th Ed. Academic Press. USA. 2011, 299-325.
- 37.- Barrett T. Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. *Vet Microbiol* 1999; 69: 3-13.
- 38.- Dutch RE. Paramyxoviruses, in: Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV editors. *Encyclopedia of Virology*. 3th Ed. Vol. IV. Academic Press. USA. 2008, 52-57.
- 39.- Lamb RA and Kolakofsky D. Paramyxoviridae: The Viruses and their Replication, in: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 4th Ed. Vol. I. Academic Press. USA. 2001, 1305-1335.
- 40.- Rima BK. The proteins of Morbilliviruses. *J Gen Virol* 1983; 64: 1205-1219.
- 41.- Wild TF, Naniche D, Rouboudin-Combe C, Gerlier D, Malvoisin E, Lecouturier V and Buckland R. Mode of entry of morbilliviruses. *Vet Microbiol* 1995; 44: 267-270.

42.- Martin SJ. The structure and composition of morbilliviruses: a brief review. *Rev Sci Tech* 1986; 5: 389-393.

43.- Easton AJ and Ling R. Mononegavirales, in: Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV editors. *Encyclopedia of Virology*. 3th Ed. Vol. III. Academic Press. USA. 2008, 324-334.

44.- Blixenkrone-Moller M, Sharma B, Varsanyi TM, Hu A, Norrby E and Kövamees J. Sequence analysis of the genes encoding the nucleocapsid protein and phosphoprotein (P) of phocid distemper virus, and editing of the P gene transcript. *J Gen Virol* 1992; 73: 885-893.

45.- Örvell C and Sheshberadaran H. Phocine distemper virus is phylogenetically related to canine distemper virus. *Vet Rec* 1991; 129: 267-269.

46.- Van de Bildt MWG, Kuiken T and Osterhaus ADME. Cetacean morbilliviruses are phylogenetically divergent. *Arch Virol* 2005; 150: 577-583.

47.- Greene CE, editor. Canine Distemper, in: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 2th Ed. Saunders Company. USA. 2000, 9-22.

48.- Rijks JM, Read FL, van de Bildt MWG, van Bolhuis HG, Martina BEE, Wagenaar JA *et al*. Quantitative Analysis of the 2002 Phocine Distemper Epidemic in the Netherlands. *Vet Pathol* 2008; 45: 516-530.

49.- Philippa JDW, van de Bildt MWG, Kuiken T, Hart P and Osterhaus ADME. Neurological signs in juvenile harbour seals (*Phoca vitulina*) with fatal phocine distemper. *Vet Rec* 2009; 164: 327-331.

- 50.- Krakowka S, Axthelm MK and Gorham JR. Effects of induced thrombocytopenia on viral invasion of the central nervous system in canine distemper virus infection. *J Comp Pathol* 1987; 97: 441-450.
- 51.- Axthelm MK and Krakowka S. Canine distemper virus-induced thrombocytopenia. *Am J Vet Res* 1987; 48: 1269-1275.
- 52.- Duignan P, Geraci JR, Raga J and Calzada N. Pathology of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from Valencia and Murcia, Spain. *Can J Vet Res* 1992; 56: 242-248.
- 53.- Saliki JT, Cooper EJ and Gustavson JP. Emerging morbillivirus infections of marine mammals. Development of two diagnostic approaches. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 969: 51-59.
- 54.- Dale JW and von Schantz M, editors. Polymerase Chain Reaction (PCR), in: *From genes to genomes: concepts and applications of DNA technology*. John Wiley and Sons. USA. 2002, 145-160.
- 55.- Bostock CJ, Barrett T and Crowther JR. Characterisation of the European seal morbillivirus. *Vet Microbiol* 1990; 23: 351-360.
- 56.- Gemma T, Iwatsuki K, Yoshida Y, Kai C and Mikami T. Serological analysis of canine distemper virus using an immunocapture ELISA. *J Vet Med Sci* 1996; 58 (8): 791-794.
- 57.- Saliki JT and Lehenbauer TW. Monoclonal antibody-based competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of morbillivirus antibody in marine mammal sera. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1877-1881.

- 58.- Vicencio MM. Manual de Laboratorio. Prácticas de Inmunología. 2ª Ed. México, D.F. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 2005.
- 59.- Bossart GD. Manatees, in: Dierauf LA, Gulland FMD, editors. *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine*. 2nd Ed. CRC Press. USA. 2001, 939-958.
- 60.- Macdonald D, editor. Dugongos y Manatíes, en: *La Gran Enciclopedia de los Mamíferos*. Ed. Libsa. España. 2006, 304-314.
- 61.- Berta A, Sumich JL, Kovacs KM, editors. Sirenian and Other Marine Mammals: Evolution and Systematics, in: *Marine Mammals. Evolutionary Biology*. 2nd Ed. Academic Press. USA. 2006, 89-101.
- 62.- Reynolds JE, Powell JA and Taylor CR. Manatees. *Trichechus manatus*, *T. senegalensis* and *T. inunguis*, in: Perrin WF, Würsig B, Thewissen JGM, editors. *Encyclopedia of Marine Mammals*. 2nd Ed. Academic Press. USA. 2009, 682-691.
- 63.- Pinto de Lima R y Mattosinho C, editores. Sirenídeos, en: *Protocolo de reintroducción de manatíes en Brasil*. IBAMA MMA. Brasil. 2007, 9-16.
- 64.- Vianna JA, Bonde RK, Caballero S, Giraldo JP, Lima RP, Clark A *et al.* Phylogeography, phylogeny and hybridization in trichechid sirenians: implications for manatee conservation. *Mol Ecol* 2006; 15: 433-447.
- 65.- Flores L. Aspectos biológicos de los sirénidos. *Trichechus manatus*. *BIOCYT* 2010; 3: 122-134.
- 66.- International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. Red List of Threatened Species. [updated 2010; cited 10 april 2011]. Available from: <http://www.iucnredlist.org/>

67.- Morales-Vela B y Olivera-Gómez LD. Distribución del manatí (*Trichechus manatus*) en la costa norte y centro-norte del estado de Quintana Roo, México. *An Inst Biol Univ Nac Auton Mex Ser Zool* 1997; 68: 153-164.

68.- Proyecto de conservación, recuperación y manejo del Manatí (*Trichechus manatus*) en México. Serie PREP núm. 11. [en línea 1999; citada el 10 abril 2011]. Disponible en:

<http://www.semarnat.gob.mx/gestionambiental/vidasilvestre/Documents/Preps/Proyecto-Manati.pdf>

69.- Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre. Listado de Especies en Apéndices I, II y III. [en línea 14 octubre 2010; citada el 11 abril 2011]. Disponible en:

<http://www.cites.org/esp/app/appendices.shtml>

70.- Suzán G, Galindo F y Ceballos G. La importancia del estudio de enfermedades en la conservación de fauna silvestre. *Veterinaria México* 2000; 31: 223-230.

71.- Walsh MT, Bossart GD. Manatee Medicine, in: Fowler M and Miller E, editors. *Zoo and Wild Animal Medicine*. 4th Ed. Saunders Company. USA. 1999, 507-516.

72.- Hoofar J, Malorny B, Abdulmawjood A, Cook N, Wagner M and Fach P. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1863-1868.

73.- Rosenstraus M, Wang Z, Chang S, DeBonville D and Spadoro JP. An internal control for routine diagnostic PCR: Design, properties and effect on clinical performance. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 191-197.

- 74.- Sambrook J, Russell DW editors. Preparation of plasmid DNA by alkaline lysis with SDS: Midipreparation. In: *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. 3th Ed. Vol 1. Cold spring harbor laboratory press. USA. 2001, 1.35-1.37.
- 75.- Sambrook J, Russell DW editors. Preparation of reagents and buffers used in molecular cloning. In: *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. 3th Ed. Vol 1. Cold spring harbor laboratory press. USA. 2001, Appendix 1.7-1.17.
- 76.- Chávez LA. Diagnóstico de la viremia primaveral de la carpa (VPC) en granjas del Estado de México e Hidalgo, México. (Tesis de Maestría). México, D.F.: UNAM 2010.
- 77.- Maldonado E. Estandarización de un método de diagnóstico molecular para la necrosis pancreática infecciosa en los salmónidos utilizando controles internos. (Tesis de Maestría). México, D.F.: UNAM 2009.
- 78.- Muñoz JF. Determinación de la presencia de ADN de herpesvirus en muestras de fibropapiloma de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*), del campamento tortuguero la "Escobilla", Oaxaca. (Tesis de Licenciatura). México, D.F.: UNAM 2009.
- 79.- Thao ML and Baumann P. Evolutionary relationships of primary prokaryotic endosymbionts of whiteflies and their hosts. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 3401-3406.
- 80.- Philippa JDW, Leighton FA, Daoust PY, Nielsen O, Pagliarulo M, Schwantje H *et al.* Antibodies to select pathogens in free-ranging terrestrial carnivores and marine mammals in Canana. *Vet Rec* 2004; 155: 135-140.
- 81.- Van Bresse MF, van Waerebeek K, Fleming M and Barrett T. Serological evidence of morbillivirus infection in small cetaceans from Southeast Pacific. *Vet Microbiol* 1998; 59: 89-98.