



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Biología

EPIDEMIOLOGÍA Y ANÁLISIS DE RIESGO DE *Brucella* spp. EN CRÍAS DE LOBO MARINO DE GALÁPAGOS, *Zalophus wollebaeki*

Tesis individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciado en Biología

Presenta:

Yara Suhan Juárez Campusano

Dirigido por:

Dra. Karina Acevedo Whitehouse

Dra. Karina Acevedo Whitehouse
Presidente

Firma

Dr. Humberto Suzán Aspiri
Secretario

Firma

Dr. Rubén Pineda López
Vocal

Firma

M. en C. María de Jesús Guerrero Carrillo
Suplente

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Abril 2014.

RESUMEN

Los patógenos pueden ejercer una influencia considerable en la dinámica de las poblaciones, y aunque suele ser poco común considerarlos como causantes de extinción de especies, pueden reducir el reclutamiento, y la supervivencia o disminuir el éxito reproductivo e incrementar así el riesgo de extinción. En esta tesis se investigó la epidemiología de especies patógenas de *Brucella* en el lobo marino de Galápagos, *Zalophus wollebaeki*, y exploró la importancia de factores ecológicos como la presencia de asentamientos humanos, e intrínsecos como la edad, sexo, y año de muestreo, sobre la infección. También se analizó el impacto de la infección por *Brucella* sobre diversos parámetros inmunes del lobo marino de Galápagos. El estudio se enfocó en dos colonias de lobos marinos del archipiélago de las Galápagos, una ubicada en Santa Fe (SF), que carece de asentamientos humanos, y una en San Cristóbal (SC), ubicado en la ciudad del poblado de Puerto Bazquerizo Moreno. Se predijo que el riesgo de infección de *Brucella mellitensis*, *B. bovis* y *B. canis*, bacterias comunes de animales domésticos que infectan mamíferos marinos, sería mayor en SC debido a la presencia de humanos y sus animales domésticos, y que la edad, colonia y año de muestreo influirían sobre los conteos leucocitarios de los animales seropositivos. Se usó una prueba de aglutinación comercial en suero de 221 crías (SC=111, SF=110) muestreadas en 2009 y 2010. La prevalencia fue mayor en SC (30.63%) y SF (16.36%; Fisher exacta, $p=0.017$) con una baja aglutinación (20%). La edad, colonia y año de muestreo influyeron sobre la seroprevalencia de *Brucella* en las crías (GLM independientes, $p<0.05$), y sobre la cantidad de células blancas circulantes. Al modelar la epidemiología de la enfermedad se encontró que existe un riesgo de infección dentro de la población. Se concluye que existe el riesgo de aparición y establecimiento de enfermedades infecciosas derivadas de asentamientos humanos, y que su transmisión no se restringe a las colonias “urbanas”. Estos resultados podrían ser un elemento para futuros planes de conservación.

Palabras clave: Lobo marino de Galápagos, *Zalophus wollebaeki*, *Brucella*, patógenos, epidemiología, conservación.

SUMMARY

Pathogens can exert considerable influence on the population dynamics, and although usually considered as rare species extinction drivers can reduce recruitment, and survival or decrease reproductive success, thereby increasing extinction risk. This thesis investigated the epidemiology of pathogenic *Brucella* species in the Galapagos sea lion, *Zalophus wollebaeki*, and explored the importance of ecological factors such as the presence of human settlements, and intrinsic as age, sex, and year of sampling, on the infection. The impact of *Brucella* infection on various immune parameters Galapagos sea lion was also analyzed. The study focused on two colonies of sea lions in the Galapagos Archipelago, one located in Santa Fe (SF), which lacks human settlements, and one in San Cristobal (SC) located in the town of the town of Puerto Moreno Bazquerizo. It was predicted that the risk of infection of *Brucella mellitensis*, *B. bovis* and *B. canis*, bacteria that commonly infect domestic animals and marine mammals is higher in SC due to the presence of humans and their domestic animals, and that the age, sex and year of sampling will influence on leukocyte counts of seropositive animals. Commercial agglutination test was used in serum of 221 pups (SC=111, SF=110) sampled in 2009 and 2010. The prevalence was higher in SC (30.63%) and SF (16.36 %, Fisher exact, $p=0.017$) with low levels agglutination (20%). Age, colony and year of sampling influenced seroprevalence to *Brucella* (independent GLMs, $p<0.05$), and the number of circulating white blood cells. By modeling the epidemiology of the disease was found that there is a risk of infection within the population. We conclude that there is a risk of emergence and establishment of infectious diseases derived from human settlements, and its transmission is not restricted to the "urban" settlements. These results could be an element of future conservation plans

Key words: Galapagos sea lion, *Zalophus wollebaeki*, *Brucella*, pathogens, epidemiology, conservation.

Al hombre más importante en mi vida:

Nunca olvidaré esa pregunta: “¿Qué vas a estudiar?”, respondí “*Biología papá*”, tu sólo giraste tu rostro hacia mi y dijiste: “¿Qué es eso?... Bueno no importa yo te apoyo, busca una universidad” y a la fecha siempre estás ahí apoyándome en todos los aspectos. Te amo y admiro papá.

A esa gran mujer que también es mi amiga:

Siempre me recibes con una sonrisa, me das un consejo, me das amor, me pides vivir y seguir adelante. Eres uno de los amores de mi vida. Te amo mamá.

“Solo volará quien le de alas a sus sueños”

Gracias a ambos por todo, esto también es de ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Instituto de Zoología de Londres, al parque Nacional Galápagos permisos PC-18-09, N°101-2010-PNG y N°032-2010-PNG, y al proyecto 15-3530 de SEP-CONACYT por el financiamiento y soporte para realizar parte de esta tesis. Así como a la UAQ por ser mi universidad donde cumplí uno de mis sueños.

De igual manera a Paddy Brock por permitirme trabajar con sus valiosas muestras, las cuales se que consiguió con arduo trabajo y que gracias a ello pude realizar esta tesis de la cual estoy orgullosa y, que formara una de la primera vía para subir al tren que me llevara a continuar explorando este mundo de la ciencia y sus maravillas.

A Karina quién me permitió formar parte de la familia del GMEE y me dejo tener muchos hermanitos de la ciencia que tal vez no terminé por conocer pero lo poco o mucho que dejaron en mi es muy importante (Ceci, Adri, Jorge, Anaí, Cami, Wendy, Blanca, Nacho y Luis). De verdad muchas gracias Karina por ser no sólo un director de tesis si no una amiga y consejera que sé, a pesar del tiempo estará presente y que seguirá contando sus experiencias de manera cómica.

A mis sinodales Dr. Rubén, Dr. Humberto y Dra. María de Jesús por darse el tiempo para enriquecer mi tesis con sus comentarios.

A mi hermano gruñón y loco aún así lo amo, pues siempre me deja molestarlo cuando estoy aburrida, me presta dinero y me motiva a trabajar.

A mis grandes amigas quienes siempre han estado ahí en cada día y segundo de mi estancia en la Universidad. Edda que se ha convertido en una gran consejera y confidente. Moni mi “esposa” que me ha mostrado su cariño y aprecio el cual valoro mucho. Alexa (Yiyis) quién fue una gran rommie por que me cuido, me enseñó y mostró la hermosa persona que es. A Ile que con relativamente poco tiempo me permitió ser su amiga para toda la vida. A Brenda que extrañamente desaparece pero sé que ahí estará mínimo a darme un consejo. Las quiero un montón!!!!!!!

También a mis amigos Ilse, Itzel, Ale, Norma, Yuri, Jova quienes siguen en mi vida a pesar de las circunstancias y de la distancia, los adoro!! Amigo-hermano Juan a ti también te agradezco en todo, te quiero mucho. Gracias por estar siempre ahí.

A mis compañeros y amigos de la carrera quienes formaron parte de mi vida y los estimo muchísimo a pesar de las posibles diferencias, yo me llevo todo lo bueno de ustedes. Gracias Ale H. por hacerme reír en todo momento ya sea de ti o contigo, a Zyanya por tu amistad y consejos, Giovanna por su sonrisa, Vicky mi “pareja” y gran amiga, así como a Richi por el tiempo y la felicidad. También a Chuy, Eunice, Mara, Raiza, Blanca, Fer, Pame, Conchita, Yayo, Paco, Ángel, Lalo, Josué, Solar, Beto (espero no falte ninguno) muchas gracias por todo.

Así como a todos mis amigos que conocí además de los mencionados, cada uno sabe lo mucho que los quiero y aprecio, por cada comentario, risa, lagrima y enojo que vivimos juntos ahí estaré siempre.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	2
SUMMARY	3
AGRADECIMIENTOS.....	5
ÍNDICE DE CUADROS.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
GLOSARIO.....	11
1. INTRODUCCIÓN	13
2. ANTECEDENTES.....	16
2.1 Conservación y enfermedades infecciosas	16
2.1.1 Factores de pérdida de especies y su relación con las enfermedades infecciosas.....	17
2.1.2 Importancia de las enfermedades infecciosas.....	18
2.1.3 Enfermedades infecciosas en fauna marina.....	19
2.2 El Lobo marino de Galápagos	19
2.2.1 Biología del Lobo marino de Galápagos.....	20
2.2.2 Nicho ecológico y conservación del Lobo marino de Galápagos	21
2.3 La Brucelosis	22
2.3.1 Breve historia del género <i>Brucella</i>	23
2.3.2 Transmisión y patología	24
2.3.3 Brucelosis en mamíferos marinos.....	24
2.3.4 Diagnóstico.....	26
2.4 La epidemiología y ecología de comunidades.....	27
2.4.1 Ecoepidemiología, inmuno-epidemiología y otras herramientas para el estudio de enfermedades.....	28
2.4.2 Modelos epidemiológicos.....	30
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	33
4. HIPÓTESIS.....	34
5. OBJETIVOS.....	35
5.1 Objetivo	35
5.2 Objetivos específicos	35
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36

6.1 Área de estudio	36
6.2 Colecta de muestras	36
6.3 Análisis serológico	37
6.5 Análisis de riesgo de <i>Brucella</i> spp. en el lobo marino de Galápagos	38
7. RESULTADOS	40
8. DISCUSIÓN	51
9. CONCLUSIONES	60
10. REFERENCIAS.....	61

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Modelo lineal generalizado que muestra la contribución de la colonia, edad y año de muestreo en animales seropositivos	42
Cuadro 2. Modelo lineal generalizado que muestra la contribución de inmunoglobulinas G para predecir infección por <i>Brucella</i>	43
Cuadro 3. Modelo lineal generalizado que muestra la contribución de la colonia, edad y año para explicar conteo de neutrófilos.	43
Cuadro 4. Modelo lineal generalizado que muestra la contribución de la colonia, edad y año para explicar conteo de linfocitos	44
Cuadro 5. Modelo lineal generalizado que muestra la contribución de la colonia, edad y año para explicar conteo de eosinófilos.	44
Cuadro 6. Modelo lineal generalizado que muestra la contribución de la colonia, edad y año para explicar conteo de monocitos.....	45
Cuadro 7. Modelo lineal generalizado que muestra la contribución de la colonia, edad y año para explicar conteo de basófilos.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Lobo marino de Galápagos, <i>Zalophus wollebaeki</i>	21
Figura 2. Diagrama representativo del modelo SIR.	30
Figura 3. Escenarios posibles del modelo SIR	31
Figura 4. Fotografías de satélite que muestran las colonias de estudio.....	36
Figura 5. Ejemplo de lectura de prueba de tarjeta..	37
Figura 6. Prevalencia de anticuerpos contra <i>Brucella</i> spp. entre colonias.....	40
Figura 7. Prevalencia de anticuerpos contra <i>Brucella</i> spp. entre sexos.....	41
Figura 8. Prevalencia de anticuerpos contra <i>Brucella</i> spp. entre años de muestreo... 41	
Figura 9. Prevalencia de anticuerpos contra <i>Brucella</i> spp. entre edades	42
Figura 10. Dinámica de la enfermedad y dinámica de la demografía del lobo marino en un modelo de simulación de una Infección por <i>Brucella</i> spp	47
Figura 11. Efecto de una infección por <i>Brucella</i> spp. sobre la del lobo marino de Galápagos cuando el número inicial de individuos infectados es del 31%.	48
Figura 12. Efecto de una infección por <i>Brucella</i> spp. sobre la dinámica de la demografía del lobo marino de Galápagos en una simulación de un evento climático como ENSO-El niño.....	49
Figura 13. Prevalencia de una infección por <i>Brucella</i> spp. de tres escenarios posibles de simulación para el lobo marino de Galápagos	50

GLOSARIO

Algunos conceptos de para esta tesis se describen a continuación:

Basófilos: Son las células más grandes y raras del sistema inmune. Poseen un núcleo irregular y grandes gránulos en su citoplasma, estos gránulos poseen muchas enzimas como histamina (vasodilatador) y heparina (coagulador). Estas células son mediadoras de reacciones de hipersensibilidad cuando son iniciados uniones de IgE a sus receptores.

Enfermedad: Es la expresión de una infección en aquel organismo hospedero, aunque la infección puede ocurrir sin causar una enfermedad.

Enfermedad emergente: Aquellas de reciente aparición y que son un problema por ser de proporciones epidémicas.

Enfermedad endémica: Enfermedad habitual en una población dentro de un área geográfica determinada.

Enfermedad infecciosa: que se refiere a cualquier cambio en el estado de salud de una especie hospedera que se ha visto irrumpida por un organismo patógeno.

Enzoótico: Enfermedad infecciosa que se encuentra presente todo el tiempo en una población, pero es de baja incidencia.

Eosinófilos: Son células que poseen un núcleo bilobulado y gran cantidad de gránulos en su citoplasma. Su función es poco comprendida pero el aumento en número de células circulantes está asociado a alergias, presencia de parásitos y desordenes inmunes, así mismo pueden mejorar y suprimir respuestas inflamatorias.

Epizoótico: En una un brote de una enfermedad infecciosa en una población que afecta a un gran número de individuos simultáneamente pero no persiste.

Hospedero: Organismo que alberga un parásito.

Infección: Presencia de una patógeno en un hospedero o población de hospederos que provoca alguna reacción orgánica por parte de este.

Linfocitos: Son otras células abundantes el sistema inmune. Primordialmente reaccionan a antígenos con lo que se inician eventos específicos como parte de respuestas del sistema inmune. Existen 3 tipos de linfocitos, las NK (“natural killer” o asesinos naturales), que destruyen variedad de células tumorales y células infectadas por algunos virus. Las células T que actúan como mediadores de inmunidad celular. Las células B que sintetizan anticuerpos específicos y otras proteínas como las inmunoglobulinas que van a reconocer un antígeno específico y así reconocer patógenos. Algunos de estas inmunoglobulinas son las G (IgG), siendo las más abundantes y activadas en presencia de virus, bacterias y hongos y desencadenando distintas cascadas para eliminar estos patógenos.

Macroparásito: Estos incluyen especies de helmintos y ectoparásitos, no se pueden multiplicar directamente dentro o fuera de su hospedero, con ciertas excepciones. Para alcanzar su madurez reproductiva deben infectar otros hospederos, en muchos casos se puede cuantificar la carga poblacional, lo que es importante pues está asociada con la patología causada por la infección. La respuesta inmune que generan es lenta, y puede haber reinfección.

Microparásito: Incluyen especies de pequeño tamaño y pueden replicarse directamente en su hospedero algunos ejemplos son: virus, bacterias y protozoarios. Los microparásitos son difíciles de contar individualmente, lo que impide un conteo poblacional. Pero se puede detectar algunos casos de infección presente o pasada.

Monocitos: Se les considera células inmaduras, del sistema inmune se encargan de destruir o fagocitar bacterias y parásitos intracelulares, son menos eficientes que los neutrófilos. Estas células poseen gran variedad de morfologías de núcleos. Los monocitos circulan en la sangre, y pueden pasar a otros tejidos, cuando esto ocurre pasan por un proceso de diferenciación lo cual son más eficientes y se les llama macrófagos.

Neutrófilos: Son las células más abundantes del sistema inmune. Siendo la primera línea de defensa contra patógenos. Los neutrófilos son células con un núcleo alargado y separado en varios lóbulos, estas van a migrar al tejido reconocer al patógeno, destruirlo ya sea fagocitando, matarlo o digerirlo

Patógeno: Cualquier productor de una enfermedad, puede ser un microorganismo o material, consideraremos al primero como principal para efectos de esta tesis.

Parásito: Organismo que vive en o sobre el tejido de un hospedero y obtiene de él parcial o totalmente sus recursos.

Prevalencia: Proporción de huéspedes infectados, nuevos o viejos en un momento determinado de tiempo.

Seropositivo: Reacción sérica positiva. Evidencia de una infección o exposición ante un patógeno.

Seroprevalencia: Proporción de individuos sero-reactivos positivos en un momento dado de tiempo.

Tasa básica de reproducción (R_0): Es el máximo potencial reproductivo entre una generación y la siguiente. En microparásitos es el promedio de casos nuevos después de que se haya producido el primero en una población, si $R_0 > 1$ resulta una epidemia y $R_0 < 1$ el patógeno no tiene éxito. En macroparásitos la idea cambia un poco, pues R_0 es la habilidad de un parásito para invadir una población y el número de hembras que se tengan en la siguiente generación.

Zoonosis: Es una infección o enfermedad que puede ser compartida entre humanos y fauna silvestre.

1. INTRODUCCIÓN

La actual pérdida de la biodiversidad se le atribuye a distintos factores como el deterioro de hábitat, la contaminación, el cambio climático regional, la sobrexplotación y la introducción de especies exóticas (Hoffmann *et al.* 2010). Comparativamente, las enfermedades infecciosas juegan un papel menor en la pérdida de especies (Smith *et al.* 2009). La presencia habitual de patógenos y sus enfermedades asociadas dentro de los ecosistemas evita que se tomen en cuenta en la mayoría de los estudios de conservación de especies silvestres por el contrario, sólo cobran relevancia cuando por distintos factores se alteran los periodos de incubación o la virulencia y por lo tanto se hacen evidentes en las poblaciones, con efecto notorio sobre la pérdida de la biodiversidad (Smith *et al.* 2009), lo mismo ocurre cuando hay transmisión atípica de patógenos de animales domésticos hacia la fauna silvestre, o emergencia de nuevos patógenos (McCallum & Dobson 2002).

La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, por sus siglas en inglés), reporta que en los últimos 500 años se han extinto 833 especies de animales (Reynolds *et al.* 2009), y solamente el 3.7 % de estas extinciones está atribuido a enfermedades infecciosas (Smith *et al.* 2009). Sin embargo, cabe mencionar que las enfermedades infecciosas son un factor que se encuentra en expansión (Jones *et al.* 2008), debido a cambios en la distribución de su variación en hospederos, o su patogenicidad y la virulencia, las cuales se pueden ver alteradas por los cambios ambientales que experimenta nuestro planeta (Daszak *et al.* 2004). Sin embargo, las enfermedades infecciosas pueden interaccionar de manera sinérgica con conductores de pérdida de biodiversidad más comunes (Deem *et al.* 2000) y por lo tanto causar estragos en la actividad de un ecosistema (Collinge & Ray 2006). Es debido a los cambios producidos por el hombre (efectos antrópicos) que las enfermedades infecciosas deben tomarse en cuenta para los esfuerzos y planes de conservación de las especies silvestres (Smith *et al.* 2009).

Los problemas de conservación y las enfermedades infecciosas no están limitados a ecosistemas terrestres, también la fauna marina presenta estos inconvenientes (Deem *et al.* 2000). Particularmente, a los mamíferos marinos, enlistados en alguna de las categorías de riesgo por la IUCN, se les vincula con la emergencia de enfermedades infecciosas transferidas de la fauna exótica y de

animales domésticos (Reynolds *et al.* 2009). El caso del lobo marino de Galápagos, *Zalophus wollebaeki*, es icónico. Este pinnípedo endémico de las islas Galápagos juega un papel clave como depredador tope de cadena alimenticia (Wolf *et al.* 2007). Anteriormente su población se formaba por cerca de 40,000 individuos y fue reducida a 16,000 en la última década, por lo que fue clasificado como “vulnerable” y después relevado como “en peligro” (Wolf *et al.* 2007; Coria-Galindo *et al.* 2009; IUCN 2013). Algunos atribuyeron esta reducción poblacional a la actividad del evento climático El Niño-Oscilación del Sur (ENSO) que disminuye la disponibilidad de alimento (Trillmich & Limberger 1985), pero hay indicios que la población se puede recuperar sin mayor problema de estos eventos climáticos-oceanográficos (Trillmich & Limberger 1985; Alava *et al.* 2011a).

Otros factores que influyen en los declives poblacionales de la especie son la acumulación de contaminantes orgánicos persistentes, la caza ilegal, derrames de combustible, y enfermedades infecciosas (Alava *et al.* 2011a). Esto último se debe a la interacción, cada vez más frecuente, con animales domésticos y fauna introducida en algunos de los asentamientos humanos cercanos a las loberas, que ha derivado en la presencia de agentes patógenos antes desconocidos para los lobos marinos de Galápagos, como rotavirus y leptospirosis (Coria-Galindo *et al.* 2009). Este hecho es relevante porque se sabe que la fauna doméstica introducida suele incrementar las posibilidades de transmisión de ciertos patógenos en la fauna silvestre (Cunningham 2003).

La brucelosis es una enfermedad común en animales domésticos que tiene un impacto sobre las poblaciones hospederas debido a que suele ocasionar abortos (Burek *et al.* 2005; Lynch *et al.* 2011b). La enfermedad es causada por una bacteria del género *Brucella* que es un parásito facultativo intracelular (Nymo *et al.* 2011). La transmisión se produce principalmente por contacto o ingestión de material abortado o infectado con la bacteria y a través del contacto con secreciones infectadas (Nielsen *et al.* 2005; Lynch *et al.* 2011a; Nymo *et al.* 2011). Muchas especies de *Brucella* han sido aisladas de mamíferos marinos; algunas son exclusivamente de estos grupos como *B. ceti* y *B. pinnipedalis*, y otras son típicas de animales domésticos. Algunas tienen el potencial de regular a la población o de detener el reclutamiento de individuos (Deem *et al.* 2000). Por ello, deben iniciarse estudios epidemiológicos para analizar su impacto sobre especies en riesgo. Estos estudios pueden realizarse a

distintos niveles, o desde distintas perspectivas. Una de estas perspectivas es la ecología de comunidades, que integra conceptos habituales que ayudan a comprender que la emergencia de enfermedades puede estar dada en distintas vías, e investiga la importancia de otros factores como el impacto antropogénico (Collinge & Ray 2006; Holt & Dobson 2006; Skelly *et al.* 2006).

Además otras disciplinas relacionadas con la epidemiología, como la ecoepidemiología (Ariza *et al.* 2004) y la inmuno-epidemiología, (Grenfell *et al.* 2002; Brock *et al.* 2013a) o la genética epidemiológica (Grenfell *et al.* 2002) y la estadística multivariada (Grenfell *et al.* 2002), que nos permiten hacer estudios más completos, mejor respaldados e incluso verificar los resultados y correlacionarlos para detener, manejar o evitar la emergencia de enfermedades infecciosas que afectan las poblaciones silvestres. Esta tesis busca proveer de información sobre el riesgo de *Brucella* en poblaciones del lobo marino de Galápagos por medio de la integración de las diferentes perspectivas de la epidemiología y así, generar modelos y análisis piloto que muestren la importancia de estudio de este tipo de enfermedades infecciosas en especies silvestres y su valor sobre los esfuerzos en conservación.

2. ANTECEDENTES

2.1 Conservación y enfermedades infecciosas

La conservación de la fauna silvestre es un tema cuya percepción se ha visto modificada en los últimos años. Esto se debe a que su enfoque solía contemplar únicamente ciertos aspectos, los cuales no incluían entender las distintas características de una especie o población tales como su distribución geográfica, su estructura, la dinámica de la población e incluso el comportamiento a nivel individual (Deem *et al.* 2000). Por esta razón, se han integrado en las últimas décadas nuevas herramientas y áreas de estudio, que buscan comprender los factores que promuevan la pérdida de la biodiversidad, como el deterioro de hábitat, la contaminación, el cambio climático regional, la sobreexplotación, la introducción de especies exóticas y, en ocasiones las enfermedades infecciosas (Smith *et al.* 2009). Las enfermedades infecciosas, rara vez son incluidas en los planes de conservación. Sin embargo, los patógenos que las causan son un elemento importante en la dinámica de las poblaciones, pues forman parte de las interacciones dadas en un ecosistema (McCallum & Dobson 2002; Acevedo-Whitehouse 2009).

Una enfermedad infecciosa se refiere a aquellos cambios en el estado de salud de un organismo hospedero que resultan de la infección por parte de un organismo parásito patógeno (Collinge & Ray 2006). El patógeno puede o no ocasionar una enfermedad en su hospedero según su virulencia y patogenicidad (Ryser-Degiorgis 2013). La virulencia es una variable continua que indica la cantidad de daño que causa un patógeno, mientras que la patogenicidad es una variable dicotómica que indica la capacidad de causar daño en un hospedero susceptible (Ryser-Degiorgis 2013). El problema del estudio de las enfermedades radica que en que suelen ser inaparentes y, de ocurrir el caso contrario, solo se observa su efecto a nivel individuo, por lo que se sobrestima su verdadero papel a nivel poblacional (Deem *et al.* 2000). También hay que recordar que en animales sociales ó gregarios las probabilidades de contagio y riesgo suelen ser mayores que en las especies solitarias (Ryser-Degiorgis 2013).

2.1.1 Factores de pérdida de especies y su relación con las enfermedades infecciosas

La salud de la vida silvestre puede ser alterada por la misma actividad humana, por lo que la dinámica de las enfermedades puede verse modificada por acción antropogénica (Deem *et al.* 2000).

Por ejemplo, el deterioro del hábitat que es considerada principal causa de extinción (McCallum & Dobson 2002), limita a una especie a realizar todas sus actividades en una zona reducida o encuentro con otras especies, lo que a su vez incrementa las tasas de contagio de agentes infecciosos (Cunningham 2003). Por otro lado, la contaminación química producida por la exposición y bioacumulación de dicloro difenil tricloroetano y compuestos bifenil policlorados (DDTs y PBCs, respectivamente), alteran procesos fisiológicos como el funcionamiento del sistema inmune, así mismo la exposición en etapas postnatal y prenatal de un organismo incrementa la posibilidad de que altere su eficacia biológica (Mos *et al.* 2006; Alava *et al.* 2011b).

El cambio climático, un problema actual de gran relevancia y resultado indirecto de la contaminación, altere en la fisiología del patógeno modificando su sobrevivencia, los periodos de incubación, la virulencia e incluso su transmisión (McCallum & Dobson 2002; Daszak *et al.* 2004), mientras que en el hospedero puede aumentar su susceptibilidad (Harvell *et al.* 1999; Harvell *et al.* 2002). En el caso de la sobreexplotación de especies, se tiene un efecto similar que en la pérdida de hábitat, pues el consumo o manejo de especies puede aumentar el riesgo de transmisión de enfermedades (Smith *et al.* 2009; Medina-Vogel 2010). Globalmente, el problema de la introducción de especies exóticas produce cambios en la función de cada organismo en su medio, y muchas especies son desplazadas de su nicho y llevadas a su extinción (Deem *et al.* 2000). Aquellas que persisten comparten territorios en cercanía con el hombre y sus animales domésticos, y esto promueve la emergencia de enfermedades en poblaciones silvestres en la zona de introducción (Daszak *et al.* 2000; Cleaveland *et al.* 2002). Esta “contaminación biológica” produce a su vez, la llamada “contaminación de patógenos” (Daszak *et al.* 2000; Cunningham 2003; Skelly *et al.* 2006), lo que es un factor pobremente estudiado en conservación (Smith *et al.* 2009), dado que no se considera típicamente como un factor de riesgo en ningún tipo de plan de introducción, reintroducción o de aumento de especies (Deem *et al.* 2000).

La urbanización también arrastra cambios drásticos en un ambiente y aún con ciertas medidas el contacto entre distintas especies no se puede controlar, lo que altera la distribución y abundancia de patógenos y hospederos (Skelly *et al.* 2006).

2.1.2 Importancia de las enfermedades infecciosas

La importancia de las enfermedades infecciosas radica en el potencial daño que ocasionan a nivel poblacional (Daszak *et al.* 2000; Cleaveland *et al.* 2002; Acevedo-Withehouse 2009). Por ejemplo, la UICN ha reportado dentro de su lista roja, que desde hace aproximadamente 500 años se han extinto 833 especies de animales, y solamente el 3.7 % de estas extinciones es atribuido a las enfermedades infecciosas (Reynolds *et al.* 2009; Smith *et al.* 2009). Algunas instancias como la Organización Mundial de la Salud Animal en su Oficina Internacional de Epizootias (OIE) han implementado programas de “Vigilancia” (o Epidemio-Vigilancia) en las que se documenta e investiga el curso de enfermedades emergentes o no emergentes, así como su distribución en poblaciones de animales con una visión de manejo de las mismas (Ryser-Degiorgis 2013). Esta vigilancia se hace de dos formas; de manera pasiva, donde se documentan los casos de muertes ocurridas o aparente enfermedad en animales y esta utiliza para investigación futura y de forma activa, donde se colectan muestras para detectar una selecta enfermedad o patógeno y conocer sobre su posible exposición o infección activa (Ryser-Degiorgis 2013).

Los patógenos se han visto implicados en pérdidas poblacionales de distintos grupos animales, tal es el caso del hongo quitridio que afecta diferentes especies de anfibios (Harvell *et al.* 2002; Acevedo-Withehouse 2009), el virus de fibropapilomatosis en tortugas (Deem *et al.* 2000), distemper canino y la rabia en Perros salvajes de África (*Lycaon pictus*) (Daszak *et al.* 2000), así como de la mixomatosis en Conejos de Sudamérica (*Oryctolagus cuniculus*) y herpes virus en elefantes asiáticos (*Elephas maximus*) (Cunningham 2003).

2.1.3 Enfermedades infecciosas en fauna marina

Los efectos de los agentes infecciosos en sus poblaciones ocurren de la misma manera en ambientes acuáticos que en ambientes terrestres. Por ejemplo, el morbilivirus descrito en mamíferos marinos como marsopas, delfines o focas y que se caracteriza por causar enfermedades, como la peste bovina, el moquillo y el sarampión (Daszak *et al.* 2001; Acevedo-Withehouse 2009) o el distemper de las focas que en 1988 acabó con 18,000 focas comunes (*Phoca vitulina*) y con 400 focas grises (*Halichoerus grypus*) en el Norte de Europa (Cunningham 2003). La capacidad de los patógenos para cruzar la barrera terrestre a entrar en ambientes marinos no es nueva, el inconveniente actual es el aumento del número de contagios propiciados por el contacto de los seres humanos y sus animales domésticos con la fauna marina (Daszak *et al.* 2001; Reynolds *et al.* 2009). Inclusive podemos descubrir especies de patógenos de los cuales no existía ningún reporte previo, tal es el caso de la toxoplasmosis, normalmente transmitida entre los gatos domésticos pero hallada en un delfín de hocico largo (*Stenella longirostris*) y en belugas (*Delphinapterus leucas*) o la influenza B (única en humanos) en una foca común (*Phoca vitulina*) (Daszak *et al.* 2001). Esto es evidencia de la importancia de la emergencia de enfermedades infecciosas transferidas por parte de la fauna doméstica a la silvestre, y pone de manifiesto su papel en la conservación de los mamíferos marinos y los ecosistemas (Reynolds *et al.* 2009), por lo que se debe dejar de hacer caso omiso al estudio de estas enfermedades en los distintos programas de conservación.

2.2 El Lobo marino de Galápagos

El lobo marino de Galápagos (*Zalophus wollebaeki*) es un pinnípedo otárido descrito por Sivertsen en 1953. La especie es endémica del archipiélago de Colón o Galápagos que se encuentra situada a 972 km de las costas de Ecuador, aunque se han observado algunos ejemplares fuera de estos sitios (Fariña *et al.* 2003; Wolf *et al.* 2008). Inicialmente el lobo marino de Galápagos fue descrito como una nueva especie, pero después fue relevada a subespecie del lobo marino de California (*Zalophus californianus*) (Wolf *et al.* 2007).

Las distintas diferencias morfológicas hicieron dudar de esta categoría, lo que llevó a estudios moleculares que respaldaron una separación taxonómica y la confirmación de especies separadas, y se determinó que tanto el lobo marino de Galápagos y el lobo marino de California divergieron hace aproximadamente 2.3 millones de años (± 0.5) (Wolf *et al.* 2007; Wolf *et al.* 2008; Schramm *et al.* 2009).

2.2.1 Biología del Lobo marino de Galápagos

El lobo marino de Galápagos es una especie que presenta dimorfismo sexual, donde los machos son más grandes y pesados que las hembras (Fig. 1). La especie exhibe un sistema polígino, donde unos pocos machos defienden un territorio terrestre o semiacuático en el que las hembras se mueven libremente (Pörschmann *et al.* 2010). Los machos sin territorio también pueden moverse libremente e incluso pueden reproducirse con las hembras siendo estos machos padres del 50% de las crías que nacen anualmente (Meise *et al.* 2013). Los lobos marinos tienen un largo período reproductivo que dura de septiembre a diciembre, el cuidado de las crías es cíclico, las madres que tienen crías de 4-10 días de edad se alternan 1-2 días de viajes para alimentarse y 1-2 días de lactancia (Jeglinski *et al.* 2012). Las hembras entran en estro a las 4 semanas del nacimiento (Meise *et al.* 2013). Las crías de 3 a 6 meses crecen rápidamente y empiezan su primer nado, los juveniles de 6 meses pueden depender completamente de su madre para alimentarse cuando esta escasea, a los 12 meses las crías siguen su consumo de leche pero realizan buceos de forrajeo cuando la comida es abundante y a los 18 meses si la comida escasea sólo consumen leche aunque continúan con el buceo, ocurriendo así el destete aproximadamente entre los 2 y 3 años (Jeglinski *et al.* 2012). Durante los primeros años de vida las hembras poseen una alta fidelidad de su sitio de nacimiento, mientras que los machos no territoriales aunque presentan una preferencia por ciertas áreas de algunas colonias tienden a no regresar (Meise *et al.* 2013)

2.2.2 Nicho ecológico y conservación del Lobo marino de Galápagos

Este pinnípedo juega un papel ecológico muy importante en el ecosistema como depredador tope de la cadena alimenticia (Wolf *et al.* 2008), principalmente de peces pelágicos y mesopelágicos, como algunas sardinas y arenques aunque posee distintas estrategias de forrajeo que pueden ser utilizadas en diferentes zonas, lo cual los lleva a cazar peces de zonas bénticas, como algunos serránidos y lisas (Villegas-Amtmann *et al.* 2008; Villegas-Amtmann *et al.* 2011). El lobo marino de Galápagos es acarreador de altas concentraciones de nutrientes marinos a suelos del ecosistema terrestre, que posteriormente son usadas por las plantas situadas a las orillas de las playas, un efecto que parece estar limitado a islas (Fariña *et al.* 2003).



Figura 1. Lobo marino de Galápagos, *Zalophus wollebaeki*. Se muestra el dimorfismo sexual. Tomado de Jefferson *et al.* (2008).

La mayor parte de los mamíferos marinos se encuentra en alguna categoría de riesgo, y *Z. wollebaeki* no es la excepción pues se ubica en peligro de extinción (Schipper *et al.* 2008; IUCN 2013). Sus poblaciones están entre 14,000 y 16,000 individuos, lo cual representa 50% de la población reportada para 1970, que era de 40,000 (Wolf *et al.* 2007; Coria-Galindo *et al.* 2009).

El declive de la población se ha asociado con muerte accidental debido a la pesca ó golpes con botes (Schipper *et al.* 2008) y eventos climáticos como el fenómeno ENSO, durante el cual, como reflejo de la alta temperatura y baja productividad primaria (Trillmich & Limberger 1985; OMM 2014) aumenta la mortalidad por escasez de alimento (Coria-Galindo *et al.* 2009). Por ejemplo, se sabe que en años “Niño” la producción de crías baja en un 30% pero aun así la población se recupera (Trillmich & Limberger 1985). La contaminación también resulta un problema importante para los lobos marinos pues existen muchos casos de derrames de aceites y combustibles (Coria-Galindo *et al.* 2009). Recordando que todos estos contaminantes tienden a bioacumularse en las redes tróficas y magnificarse en nivel trófico de los depredadores, se comprende que comprometen la salud y estado reproductivo de las poblaciones al alterar su sistema inmune y endocrino (Alava *et al.* 2011b). La caza ilegal, cambio climático, los sonares parecen tener una contribución al descenso poblacional, así mismo las enfermedades, y principalmente aquellas transmitidas por ratas o perros (Schipper *et al.* 2008; Alava *et al.* 2011a).

2.3 La Brucelosis

El lobo marino de Galápagos mantiene un contacto poco común con residentes de loberas ubicadas en asentamientos humanos, como en La Isla San Cristóbal y su alto crecimiento de perros y gatos domésticos, y ratas en la ciudad; aunque también existen loberas sin estos residentes como en Isla Santa Fe, en donde si bien llegan a visitar turistas o científicos, las excursiones se limitan en tiempo y existen ciertas medidas y protocolos de conservación para evitar daños en la zona (Brock *et al.* 2013a). Por esta razón al estudiar si, la fauna doméstica tiene un impacto sobre la transmisión de patógenos en la fauna silvestre, se puede iniciar un análisis de enfermedades que son comunes en los animales domésticos y que tendrían un efecto importante a nivel poblacional, principalmente por el potencial de causar morbilidad, mortalidad y fracaso reproductivo (Calle *et al.* 2002; Roe *et al.* 2010), tales es el caso de la brucelosis.

La brucelosis es una de las enfermedades zoonóticas más comunes en todo el mundo, afecta a humanos y a sus animales domésticos incluyendo a la fauna silvestre (Jensen *et al.* 2013). Es producida por una α -proteobacteria gram negativa que pertenece al género *Brucella*, que es un pequeño cocobacilo y parásito intracelular que infecta a gran variedad de hospederos incluyendo animales y humanos (Nymo *et al.* 2011). El género *Brucella* está filogenéticamente relacionado a otros géneros como *Agrobacterium*, *Phyllobacterium*, *Ochrobacterium* y *Rhizobium*, posee dos cromosomas, uno de 2.1 megapares de bases y otro de 1.5. No existen plásmidos naturales asociados (Corbel 1997).

2.3.1 Breve historia del género *Brucella*

La brucelosis o “Fiebre de Malta” fue descubierta por Sir David Bruce en 1886, a la cual llamó *Micrococcus mellitensis*, después de haberla aislado de un soldado inglés (Corbel 1997; Godfroid *et al.* 2005; Nymo 2013). Tiempo después se describieron nuevas especies, en 1895 Bernhard Bang identificó *Bacillus abortus* en el ganado bovino (*Bos taurus*); en 1914 Jacob Traum aisló *Brucella suis* en material abortado en cerdos (*Sus scrofa domesticus*), pasado este tiempo se encontraron biovariedades en otras especies (Nymo 2013). Para 1953 se encontró *B. ovis* en borregos (*Ovis aries*), *B. neotomae* en ratas del desierto (*Neotoma lepida*) por Stoenner y Lackman en 1957, y en 1996 *B. canis* en perros (*Canis lupus familiaris*) (Nymo 2013).

Estas especies son tradicionalmente las reconocidas (Godfroid *et al.* 2005) sin embargo hay autores que sugieren que se trata de una sola especie (Nymo *et al.* 2011). Recientemente se sumaron dos nuevas especies; *B. microti*, aislada de las eses de un ratón topillo de República Checa (*Microtus arvalis*), y del suelo de la misma área y de los nódulos linfáticos de un zorro rojo en Austria (*Vulpes vulpes*), y se incluyó en el género en 2008 (Godfroid *et al.* 2005; Nymo 2013). En 2009 *B. inopinata* fue encontrada en una herida de un implante de una mujer con signos clínicos de brucelosis (Godfroid *et al.* 2005; Dawson *et al.* 2008b).

2.3.2 Transmisión y patología

La transmisión de *Brucella* puede ocurrir de diferentes formas, la principal es cuando existe contacto o ingesta de material abortado; en pocos casos por exposición respiratoria (Lynch *et al.* 2011a), inoculación conjuntival, a través de piel dañada o mucosas, y también puede ser transmitida durante la reproducción y la lactancia (Nielsen *et al.* 2005; Nymo *et al.* 2011).

Esta bacteria no puede multiplicarse fuera de su hospedero, pero consigue permanecer durante horas a temperaturas que oscilan entre los 45 a 50 °C, durante meses en condiciones templadas de 10 a 15 °C y durante años congelada en fetos o placentas abortadas. Un caso diferente es *B. microti* que puede persistir en suelos (Nymo *et al.* 2011).

La infección de *Brucella* inicia cuando las bacterias entran al torrente sanguíneo, después son engullidos por los macrófagos y por células polimorfonucleares que pueden viajar a otros tejidos, de esta manera puede evadir otros “sistemas bactericidas” del cuerpo (Nielsen *et al.* 2005). Después las bacterias son llevadas a los nódulos linfáticos esparcidos a todos los tejidos linfáticos, incluido el bazo (Nymo 2013). La atracción hacia ciertos tejidos como aquellos pertenecientes al útero grávido en hembras o del epidídimo en machos es desconocida, pero un factor es atribuido a la producción de eritritol por parte de estas células (Nymo *et al.* 2011), y que *Brucella* posee en gen deshidrogenasa erytrolosa-1-fosfato (ery) (Corbel 1997). Por esta razón, la brucelosis está asociada con fallas reproductivas al producir abortos e infertilidad, ocasionando así pérdidas económicas en cuanto está presente en ganado, y en otros casos sólo produce inflamación (Burek *et al.* 2005; Lynch *et al.* 2011a).

2.3.3 Brucelosis en mamíferos marinos

La brucelosis en mamíferos marinos ha sido descrita desde 1994, al ser aislada de delfines (*Tursiops truncatus*) y desde entonces se han agregado al género dos nuevas especies, *B. ceti* y *B. pinnipedialis* que tienen como hospederos a cetáceos y pinnípedos respectivamente, pero no fue hasta 2007 cuando se decidió separar como otras especies (Godfroid *et al.* 2005; Dawson *et al.* 2008b; Nymo *et al.* 2011).

Casi todos los mamíferos marinos parecen ser potenciales hospederos de *Brucella*, aunque sólo se han descrito 53 especies como seropositivos (Hernández-Mora *et al.* 2013). La brucelosis sólo produce abortos en cetáceos y pocas especies de pinnípedos (Hernández-Mora *et al.* 2013; Nymo 2013) además de hiperemia de meninges y cerebro, meningoencefalitis, en algunos delfines puede producir bronconeumonía, micro calcificaciones o puede ser asintomática (Burek *et al.* 2005; Lynch *et al.* 2011a; Hernández-Mora *et al.* 2013).

Generalmente la transmisión en cetáceos ocurre entre individuos infectados a hospederos susceptibles por contacto sexual, leche materna y de madre a feto, así mismo diferentes estudios han mostrado que diferentes especies de cetáceos asisten partos por lo que pueden estar en contacto con material infectado y contagiarse (Guzmán-Verri *et al.* 2012). Otras vías de posible transmisión es por la ingestión de peces infectados con *Brucella* y helmintos, principalmente parásitos pulmonares como *Halocercus* y *Pseudalius* que infectan delfines y marsopas, que parecen tener una asociación a *Brucella*, en ambos casos la bacteria tiene la capacidad de replicarse en estos nuevos hospederos (Guzmán-Verri *et al.* 2012; Hernández-Mora *et al.* 2013). En pinnípedos existe menor número de patologías asociadas a *Brucella* con sólo algunas neumonías, inflamación de nódulos linfáticos, hígado y bazo (Lynch *et al.* 2011a; Nymo *et al.* 2011; Hernández-Mora *et al.* 2013). La transmisión en este grupo es poco entendida algunos consideran que ocurre por contacto con animales en tierra, mientras otros postulan que al igual que en cetáceos ocurre por un posible vector, en este caso por *Parafilaroides* spp. también un parásito pulmonar y del cual los pinnípedos se infectan al consumir peces (Garner *et al.* 1997; Dawson *et al.* 2008a; Lynch *et al.* 2011a).

Sí bien se sabe que *Brucella* ha sido aislada de mamíferos marinos como la foca común (*Phoca vitulina*), de la marsopa (*Phocoena Phocoena*) y del delfín común (*Delphinus delphis*) (Nymo *et al.* 2011; Hernández-Mora *et al.* 2013), la foca de casco (*Cystophora Cristata*) (Nymo *et al.* 2014) sigue existiendo un riesgo de transmisión de especies de *Brucella* domésticas hacia los mamíferos marinos pues éstas, a pesar de estar asociadas a un hospedero, tienen el potencial de infectar a otros. En el lobo fino de Australia (*Arctocephalus pusillus doriferus*) se ha reportado ver alta prevalencia de anticuerpos (57%) posiblemente pertenecientes a *B. mellitensis* que afectan al 37% de las hembras preñadas, aunque esta bacteria no parece estar jugando un papel de

regulador de la población y hacen falta algunos estudios para determinar su impacto (Lynch *et al.* 2011b). En el lobo fino de Nueva Zelanda (*Arctocephalus forsteri*) se reporta que *B. abortus* esta prevalente en el 1% de la población sin causar demasiados estragos (Mackereth *et al.* 2005) de igual forma en la foca común (*Phoca vitulina*), la foca gris (*Halichoerus grypus*) y en la morsa (*Odobenus rosmarus*) con prevalencias del 12.5, 3.9 y 5 % respectivamente (Nielsen *et al.* 2001). En el lobo marino de Nueva Zelanda (*Phocarctos hookeri*) las investigaciones no marcan tampoco una alta prevalencia (Roe *et al.* 2010), por esta razón se deduce que la baja prevalencia de anticuerpos no necesariamente juega un papel en el control de la población, pero sí debió haber sido transmitida por animales domésticos, y debe seguir un monitoreo.

2.3.4 Diagnóstico

Las primeras pruebas serológicas para diagnosticar brucelosis fueron empleados en 1897, algunas pruebas mediante de detección de anticuerpos, algunas de estas pruebas incluyen Rosa de Bengala o la de antígeno tamponado que muestran presencia o ausencia de antígenos (Uzal *et al.* 1995; Muñoz *et al.* 2005). Las pruebas como prueba de aglutinación en tubo (SAT) y la 2-mercaptoetanol (2ME) se usan para corroborar las pruebas anteriormente mencionadas, aunque existen pruebas que proveen de un mejor diagnostico y que permiten una medición cuantitativa de antígenos o anticuerpos según el caso, algunas de estas pruebas son el ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) (Nielsen *et al.* 1996), del cual existen distintas variantes dentro de las que destacan la ELISA indirecta (ELISA-i) con una especificidad de 98.9%, y la ELISA competitiva (ELISA-c) con una especificidad de 99% o la prueba de fijación del complemento que posee una especificidad del 97.2 % (Uzal *et al.* 1995; Muñoz *et al.* 2005). Algunos autores sugieren aislar las cepas y cultivarlas en medio Farrell para corroborar la presencia de *Brucella* pero la capacidad para sobrevivir y replicarse en líneas celulares de macrófagos es muy importante para infecciones únicas (Nymo 2013). Las técnicas moleculares son métodos altamente aceptados para detectar cepas y variedades. Se realizan mediante uso de ADN bacteriano y mediante secuenciación del genoma a investigar (Nielsen *et al.* 2005; Nymo 2013).

2.4 La epidemiología y ecología de comunidades

La epidemiología se define como el estudio de distribución, frecuencia, control y demás propiedades relacionadas con la salud, esta información es destinada al control de las diferentes enfermedades (OMS 2014). Todas estas investigaciones pueden aprovecharse desde un punto de vista de ecología de comunidades, ya que tanto la epidemiología como la ecología de comunidades, envuelven múltiples hospederos, ya sea a nivel de cadenas y niveles tróficos, así como averiguar la influencia de otros factores como el impacto antropogénico. Así en conjunto, estos estudios pueden predecir cambios en la estructura de la comunidad que simultáneamente altera la vía de una enfermedad, y viceversa (Collinge & Ray 2006).

Ambas disciplinas tienen como base distintos cuestionamientos para empezar a ligar el funcionamiento de una enfermedad, como por ejemplo entender las principales interacciones en la comunidad de estudio y su intervención en la transmisión y/o prevalencia de un patógeno en un sistema; así como, la parte de la comunidad que se pueden considerar para predecir realmente esta dinámica (Collinge & Ray 2006). Una parte importante es entender los conceptos clave en epidemiología (Ver glosario) y ecología de comunidades. Siguiendo así, debemos comprender que la estructura de toda comunidad puede influir en emergencia de enfermedades por muchas vías (Holt & Dobson 2006). Una de ellas es que la mayor parte de las enfermedades poseen uno o más huéspedes que funcionan como reservorio para un patógeno y que puede cambiar entre cada especie sin que esté adaptado a ella, y puede tener o no una oportunidad para propagarse en toda una población y establecerse (Altizer *et al.* 2011; Cunningham *et al.* 2012). La llegada de un patógeno puede darse por tres razones, una está dada por su historia de vida, otra es la densidad del hospedero y, por último, los distintos factores ambientales (Roberts *et al.* 2002).

Respecto a la historia de vida de un patógeno podemos destacar que tienen especies hospederas núcleo, donde siempre están presentes y, de las especies hospederas satélite, donde entran ocasionalmente (Roberts *et al.* 2002). Esto es comparable con una comunidad de patógenos, que actúa similar a un sistema ecológico donde tenemos interacciones de cadenas alimenticias, competencia y

nichos ecológicos, y que toda esta dinámica puede permitir el cambio a un hospedero (Holt & Dobson 2006).

La densidad del hospedero tiene un efecto catastrófico cuando son pequeñas poblaciones, ya que las poblaciones grandes tienen una mayor capacidad de recuperarse de un evento epidémico (Cleaveland *et al.* 2002). Aunque cabe mencionar que cualquier tipo de densidad de población puede verse afectada por eventos de introducción de especies exóticas y exposición a nuevas enfermedades, algunos eventos de migración también son incluidos y esta es la parte que los trabajos de conservación donde sus programas no prevén esto, siendo así las poblaciones pequeñas poseen un mayor riesgo (Daszak *et al.* 2000; Deem *et al.* 2000; Cleaveland *et al.* 2002; Cunningham 2003; Altizer *et al.* 2011).

Por último los factores ambientales son un punto importante para la transmisión de un patógeno, anteriormente hemos mencionado que los factores de pérdida de especies también juegan un papel importante y están íntimamente relacionados la alteración del ambiente que afecta también al hospedero (Poteet 2006; Skelly *et al.* 2006). El impacto humano de los últimos años ha modificado estos factores ambientales, diferentes investigaciones han mostrado que influencias antropogénicas, como la urbanización, dan paso a la emergencia o reemergencia de enfermedades infecciosas (Skelly *et al.* 2006).

2.4.1 Ecoepidemiología, inmuno-epidemiología y otras herramientas para el estudio de enfermedades

Actualmente, debe considerarse el uso cualquier herramienta para el estudio de enfermedades debido al reciente aumento de incidencia, distribución geográfica de enfermedades endémicas y aquellas emergentes (Medina-Vogel 2010). Una de estas herramientas es la ecoepidemiología que se encarga de la búsqueda de como interaccionan factores ambientales con las personas y poblaciones y su influencia en la evolución de enfermedades, mediante uso de herramientas ecológicas (Ariza *et al.* 2004). Esta disciplina considera a cada nivel de organización, para poder aportar información a en cada nivel y poder elaborar teorías que permitan comprender una enfermedad, para así prevenirla o controlarla, también puede incluir herramientas moleculares y genéticas (Ariza *et al.* 2004).

La inmuno-epidemiología se encarga de estudiar las enfermedades desde el punto de vista del sistema inmune (Grenfell *et al.* 2002; Brock *et al.* 2013a). El sistema inmune es el encargado de proteger a un individuo de una infección y comprende principalmente de dos partes una innata y una adaptativa (Brock 2012). El sistema inmune innato es la primera línea de defensa y está conformado por diferentes tipos celulares como los neutrófilos, los monocitos, los eosinófilos y los basófilos, mientras que el sistema inmune adaptativo, que es la parte donde se genera memoria, incluye linfocitos clasificados en B o T (Winkelstein *et al.* 1998; Walker 2008; Brock 2012; Goenka *et al.* 2012; Brock *et al.* 2013a). Ver glosario.

Por lo tanto, la inmuno-epidemiología permite valorar la respuesta de la conformación de la inmunidad poblacional sobre los patrones epidemiológicos (Grenfell *et al.* 2002; Brock 2012; Brock *et al.* 2013b, a). Por lo tanto, esta visión también permite hacer estudios para complementar no solo aspectos epidemiológicos si no de conservación, pues esta herramienta complementaria la planificación y evaluación de los programas de intervención, el reconocimiento rápido y la investigación de las enfermedades emergentes (Grenfell *et al.* 2002).

Otras herramientas a considerar son: la genética donde se puede aprovechar la interacción genética con los patógenos y hospederos, a incluso ver aspectos evolutivos, así mismo estudios del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) y su diversidad para ver interacciones y algunos autores manejan posible control genético de patógenos (Grenfell *et al.* 2002).

La estadística, también resulta un instrumento que en estudios de epidemiología ayudan a predecir variaciones que impactan sobre el curso de una enfermedad (Grenfell *et al.* 2002). Los análisis estadísticos son una herramienta que en general, pueden ayudar a integrar factores numéricos y variaciones aleatorias, que pueden abarcar variaciones individuales hasta de un ecosistema o ecología y evolución (Bolker *et al.* 2009).

2.4.2 Modelos epidemiológicos

Los modelos son una herramienta en epidemiología que mezcla lenguaje matemático para predecir y explicar el comportamiento de una enfermedad y los potenciales daños a nivel poblacional (Basáñez & Rodríguez 2004). En los modelos epidemiológicos básicamente se clasifica a los hospederos en tres categorías: susceptibles (S), infectados (I) y recuperados (R). S son aquellos individuos que nunca han tenido una experiencia de infección con el patógeno, I son los individuos que se encuentran infectados con el patógeno de estudio y los individuos R son aquellos que tuvieron una experiencia de infección y se han recuperado, algunos individuos llegan a ser inmunes (Switon *et al.* 2002; Tompkins *et al.* 2002; Basáñez & Rodríguez 2004).

El modelo SIR (“Susceptible-Infectado-Recuperado”) es la representación base de cualquier en modelo de epidemiología, en el cual también se incluye los nacimientos a lo largo de un tiempo y entonces se renuevan los individuos susceptibles y las muertes relacionadas a la enfermedad o que pueden ser de manera natural como se observa en la Figura 2.

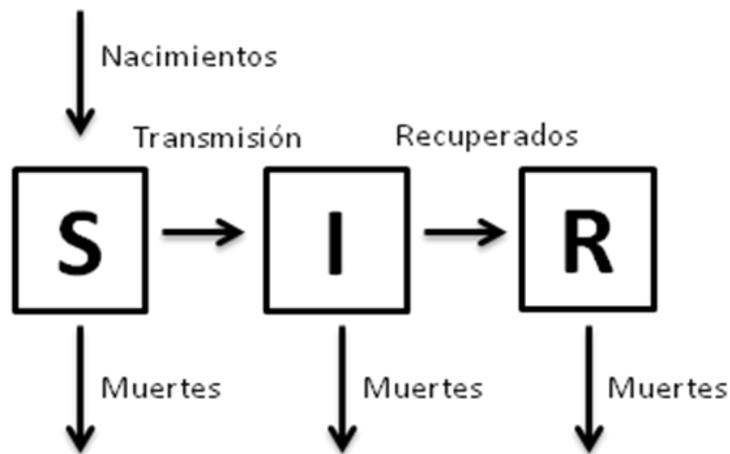


Figura 2. Diagrama representativo del modelo SIR. Se clasifica al hospedero en las tres clases. Los nacimientos forman parte de susceptibles (S), si existe contacto con la infección pasan a ser individuos infectados (I) y estos pueden morir o pasar a ser recuperados (R), algunos pueden llegar a ser inmunes.

Existen tres diferentes escenarios dentro de los modelos SIR que pueden variar según las condiciones que se le pongan (Ver Figura 3). Por ejemplo en caso de ocurrir una infección en una población pero en esta no hay nacimientos, el número de infectados crece y los susceptibles se eliminan de la población, el patógeno desaparece como se muestra en la Figura 3a (Switon *et al.* 2002). En un segundo escenario tenemos una alta tasa de nacimientos estos son susceptibles el patógeno se mantiene y la infección se vuelve endémica como se observa en la Figura 3b, pero si los nacimientos son bajos, la curva epidémica cae y en ese entonces se convierte en una cuestión azarosa si la infección desaparece o persiste como en la Figura 3c (Switon *et al.* 2002; Basáñez & Rodríguez 2004).

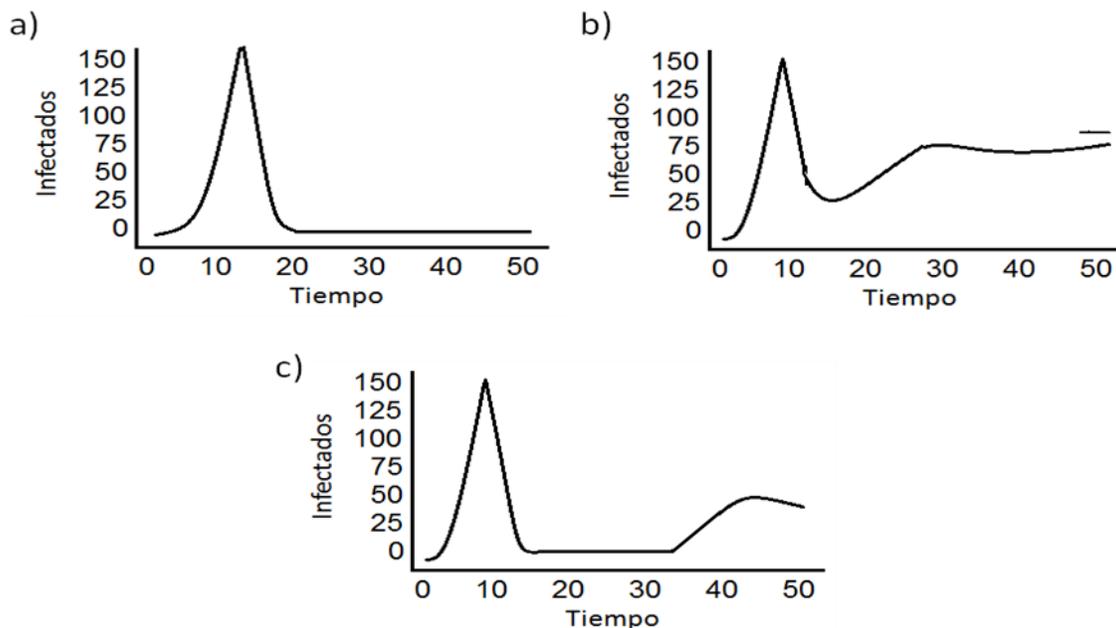


Figura 3. Escenarios posibles del modelo SIR. a) Cuando no hay nacimientos durante el período de la curva epidémica, b) con una alta tasa de nacimientos y, c) baja tasa de nacimientos.

Los modelos SIR, son la base de la cual derivan otros modelos, los cuales consideran otros factores que se consideran determinantes durante una posible epidemia, entre ellos se encuentran la tasa de transmisión, su persistencia, la virulencia y la tasa básica de reproducción (R_0) del agente patógeno (Switon *et al.* 2002).

Los modelos también van a ser diferentes según si el patógeno es microparásito o macroparásito (Ver glosario), debido a las características generales de esta clasificación (Basáñez & Rodríguez 2004). Además también se considera la existencia de vectores, pues se incluye a un nuevo organismo del cual por si sola su biología puede modificar las rutas que permitan o no la diseminación de un patógeno (Basáñez & Rodríguez 2004). La estructura espacial de los hospederos es otra característica a considerarse, por ejemplo una población se puede dividir en subpoblaciones como lo en crías, juveniles y adultos, incluso la diferencia entre machos y hembras pueden alterar la dinámica en donde cada una puede exponerse a diferentes condiciones y por lo tanto ser susceptible o no a una enfermedad, (Switon *et al.* 2002). En general, cada hospedero y patógeno van a ser específicos en su ambiente o ambientes, y algunas características van a resaltar más en un modelo que en otro (Basáñez & Rodríguez 2004).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Debido a que el lobo marino de Galápagos está catalogado como una especie en peligro de extinción, es necesario realizar esfuerzos para su conservación. Una parte de estos esfuerzos debe dedicarse al estudio de enfermedades infecciosas, debido a que han sido pobremente estudiadas y en muchos casos pueden tener repercusiones a nivel poblacional. Otro factor importante a considerar es la evidencia de contacto de los lobos marinos con fauna doméstica, que contribuye a una probable transmisión de patógenos hacia la fauna silvestre. Una de las enfermedades que reúnen las características de influir sobre la mortalidad y éxito reproductivo que se encuentra en animales domésticos es la brucelosis. Esta enfermedad no ha sido estudiada en el lobo marino de Galápagos, aunque sí en otras especies de mamíferos marinos, lo cuál podrá permitir evaluar los riesgos a la salud de sus poblaciones.

4. HIPÓTESIS

Hipótesis 1. Los lobos marinos de Galápagos de colonias ubicadas en islas con asentamientos humanos tendrán una mayor exposición a especies patógenas de *Brucella* a diferencia de las colonias de lobos localizadas en islas sin estos asentamientos.

Hipótesis 2. La cantidad de Inmunoglobulinas G circulantes en las crías van a predecir la presencia de anticuerpos contra *Brucella*.

Hipótesis 3. La cantidad de células blancas circulantes van a estar relacionada con la infección por *Brucella*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo

Proveer de información sobre la exposición a *Brucella* spp. en el lobo marino de Galápagos (*Zalophus wollebaeki*) y valorar el posible riesgo de transmisión de este patógeno, común en animales domésticos, a los lobos marinos del archipiélago.

5.2 Objetivos específicos

- Determinar la seroprevalencia de anticuerpos contra especies patógenos de *Brucella* en crías de lobo marino de Galápagos.
- Comparar la seroprevalencia de anticuerpos entre las dos colonias de estudio de lobo marino de Galápagos, así como de averiguar la relevancia de factores ecológicos sobre la presencia de anticuerpos contra *Brucella*.
- Observar si la cantidad de IgG circulante predicen la infección por *Brucella*.
- Determinar sí la cantidad de células blancas circulantes, así como cuáles van a predecir la infección por *Brucella*.
- Analizar el riesgo epidemiológico de la presencia de *Brucella* en la población del lobo marino de Galápagos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Área de estudio

El área de estudio abarcó el poblado de Puerto Bazquerizo Moreno en San Cristóbal (SC, Figura 2a) y Bahía Paraíso en Santa Fe (SF, Figura 2b), en el archipiélago de las Galápagos, ubicado a 972 km de las costas de Ecuador. La isla SC se encuentra en las coordenadas 0°48'30"S y 89°25'0"O, y es una de las islas que albergan un asentamiento humano, del cual el último censo indica una población de 5600 personas (Brock 2012). En contraste SF se localiza entre 0°49'0"S y 90°3'30', no presenta asentamientos humanos y si acaso turístico y de investigación está restringido (Snell *et al.* 1996).

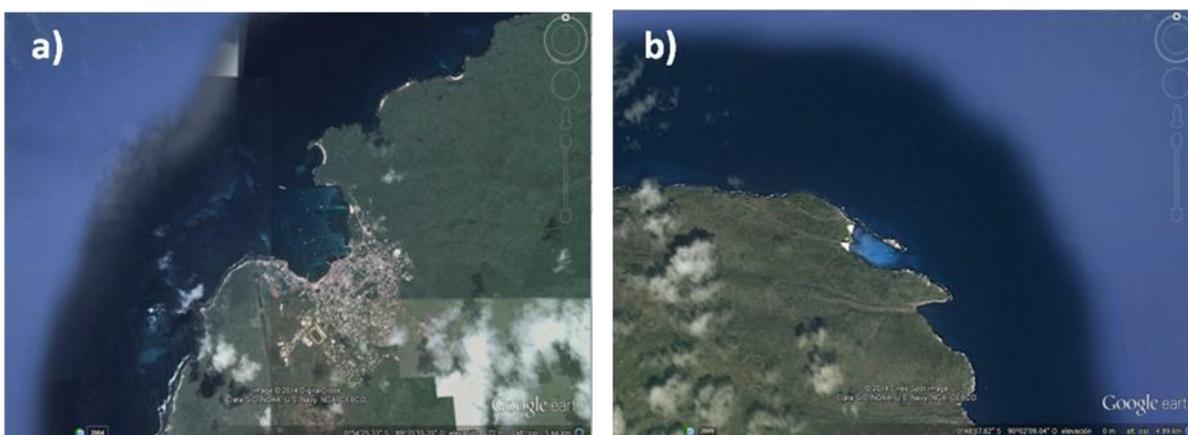


Figura 4. Fotografías de satélite que muestran las colonias de estudio, a) Puerto Bazquerizo Moreno, San Cristóbal (Colonia de estudio con impacto humano) y, b) Bahía Paraíso, Santa Fe (Colonia sin asentamientos humanos) imágenes tomadas de Google Earth 2014.

6.2 Colecta de muestras

Las muestras se obtuvieron durante los años de 2009 y 2010, como parte de un proyecto acerca del desarrollo del sistema inmune en crías de lobo marino de Galápagos (Brock 2012). Donde se colectó 7 mililitros de sangre de la vena glútea caudal de 111 crías de SC y 110 de SF (se incluyen recapturas del 70% de los animales a lo largo de cuatro periodos de muestreo), en tubos Vacutainer sin anticoagulante. Las muestras fueron llevadas al laboratorio de 8 a 16 horas posteriores a su obtención, fueron centrifugadas por 15 minutos a 7000 rpm para poder separar el suero, y este fue congelado a -80 °C hasta su análisis serológico.

También se tomaron datos morfométricos de los lobos y se realizó una bioquímica sanguínea de todas las muestras.

6.3 Análisis serológico

Prueba de tarjeta. Se evaluó la presencia de anticuerpos contra brucellas típicas del tipo de animales domésticos (*Brucella mellitensis*, *B. canis*, *B. suis*) mediante la prueba de aglutinación comercial Brucelloslide Card Test (BioMerieux, Francia). Primero se colocaron los reactivos a temperatura ambiente y se agitaron mediante el uso de un vórtex. Después se agregaron 30 µl de suero del lobo marino a un pozo y 30 µl del antígeno con una micropipeta y enseguida se mezclaron con un asa de plástico nuevo para cada muestra, esto se repitió con una muestra control siguiente e inmediatamente fueron agitados por 4 minutos. Pasado este tiempo se realizó la lectura indicado en el protocolo del fabricante. Este proceso se aplicó para cada una de las 221 muestras.

El criterio de evaluación de los resultados se hizo enfrentando la muestra control contra la mezcla de suero, en donde se consideró como reacción negativa a las muestras que presentaron un color rosado uniforme y sin aglutinación (presencia de grumos). Y se calificó como reacción positiva, a las muestras en las que cuando la mezcla de suero presentó cualquier grado de aglutinación, aunque este fuese mínimo (Figura 5).

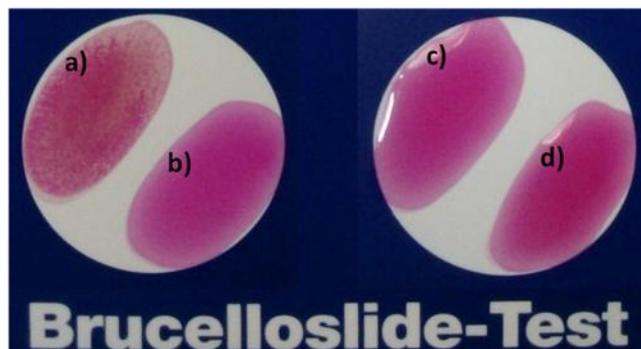


Figura 5. Ejemplo de lectura de prueba de Tarjeta. a) Muestra aglutinación positiva y alta (control); b) Muestra sin aglutinación, reacción negativa; c y d) La aglutinación se mostró baja, típico entre la mayoría de las muestras.

6.4 Análisis estadístico

Se analizó la distribución de datos mediante la creación de histogramas en donde se comparó la seroprevalencia de anticuerpos contra *Brucella* entre colonias, año de muestreo y sexos mediante pruebas de t de dos colas.

Se construyeron modelos multivariados o Modelos Generalizados Lineales (GLM, por sus siglas en inglés) los cuales permitieron evaluar efectos aleatorios en datos con distribución normal u binomial, es decir mezclar la parte estadística con información ecológica (Bolker *et al.* 2009).

Utilizamos los GLM para analizar la contribución de parámetros poblacionales que pudieran contribuir a la prevalencia de *Brucella* entre las crías. Así mismo, se construyeron modelos para observar si la cantidad circulante de IgG predecía la infección y posteriormente revisamos los factores que contribuyeron de manera significativa en conteos leucocitarios. La selección final de cada modelo se determinó por criterio de evaluación de Akaike (AIC, por sus siglas en inglés). Todos los modelos y pruebas se realizaron mediante el programa estadístico R (R Development Core Team 2008).

6.5 Análisis de riesgo de *Brucella* spp. en el lobo marino de Galápagos

Utilizamos un paquete de análisis que simula la dinámica de las enfermedades infecciosas (Outbreak 2.1;(Lacy *et al.* 2012). El programa incorpora la clasificación del hospedero en susceptibles, infecciosos y recuperados (SIR) usada en modelos clásicos de epidemiología, junto con variables de Pre-susceptible (P) y recuperados (V) (Tompkins *et al.* 2002; Bradshaw *et al.* 2012).

Generamos diferentes escenarios a los que el lobo marino de Galápagos podría enfrentarse si tuviese una infección por especies de *Brucella*. Dentro de los parámetros de P se incluye a los individuos en períodos de latencia hasta el momento en que serán susceptibles, esto puede ser por dos vías ya sea por exposición o vía materna (Bradshaw *et al.* 2012), en algunas especies se ha demostrado que este tipo de transmisión oscila entre el 60 y 70% (Díaz Aparicio 2013) pero para el lobo marino de Galápagos está última vía de transmisión no se ha demostrado (Brock 2012) por lo que la hemos descartado para nuestro modelo. En S, consideramos una tasa de encuentro entre especies de 0.515, según observaciones registradas (Brock 2012) y

una tasa de transmisión por fuentes infecciosas, 0.48 en este caso contacto con otros animales domésticos principalmente con perros (Brock 2012). Los expuestos (E) son los individuos que han encontrado con un individuo infeccioso y han contraído el agente patógeno, pero aún no son infecciosos. Para valores de E se tomó en cuenta el período de incubación en casos dados en especies domésticas como *B. abortus*, *B. ovis* y *B. suis* que oscila entre 5 a 60 días (Corbel 1997; Godfroid *et al.* 2005; Nymo 2013). Para la brucelosis no se ha reportado inmunidad a largo plazo o de por vida (Nymo 2013) por lo que las condiciones para Inmunidad fueron descartadas y se consideró que un individuo infeccioso puede permanecer así (Bradshaw *et al.* 2012). Por lo que los individuos V se consideraron pasaron a ser individuos susceptibles.

Para el parámetro I no consideramos a una proporción de individuos como infecciosos indefinidamente, esto debido a que se desconocen este tipo de procesos dentro de los pinnípedos (Guzmán-Verri *et al.* 2012), esto ocurre de igual forma con el período infeccioso, considerando que la transmisión ocurre por la combinación de contactos con perros y posiblemente entre la especie, así como de material abortado. Por esto, combinamos los períodos de exposición como un solo evento de infección, intercalando valores de 1 día donde podríamos encontrar a especies de *Brucella* que perduran en ambientes externos pocas horas o días (Nymo *et al.* 2011). También jugamos con la evolución de la enfermedad ya sea en aumento o disminución. Los factores demográficos fueron considerados como en los registros mencionados por Brock (2012).

La época de reproducción fue tomada de Jeglinski *et al.* (2012), y la edad máxima y mínima para criar fueron considerados mediante los parámetros expuestos en la lista roja de la IUCN (2013).

Para la construcción de las tablas de vida usamos información marcada automáticamente en Outbreak 2.1, que después fue modificada conforme a otros autores como (ejemplo Meise *et al.* 2013), y en otros casos modificamos las tasas de mortalidad de crías y otros datos para simular eventos climático que afectan al Lobo Marino como ENSO-El niño (Trillmich & Limberger 1985). Cada modelación se realizó a un plazo de 50 años por 100 iteraciones (Bradshaw *et al.* 2012).

7. RESULTADOS

Análisis serológico

La prevalencia de anticuerpos contra *Brucella* fue del 23.52% del total de las muestras analizadas, pero con bajos niveles de aglutinación (20%). La prevalencia fue mayor para crías de SC (30.63%) que de SF (16.36%) (Prueba de Chi²; Fisher exacta, $p=0.017$; Figura 6).

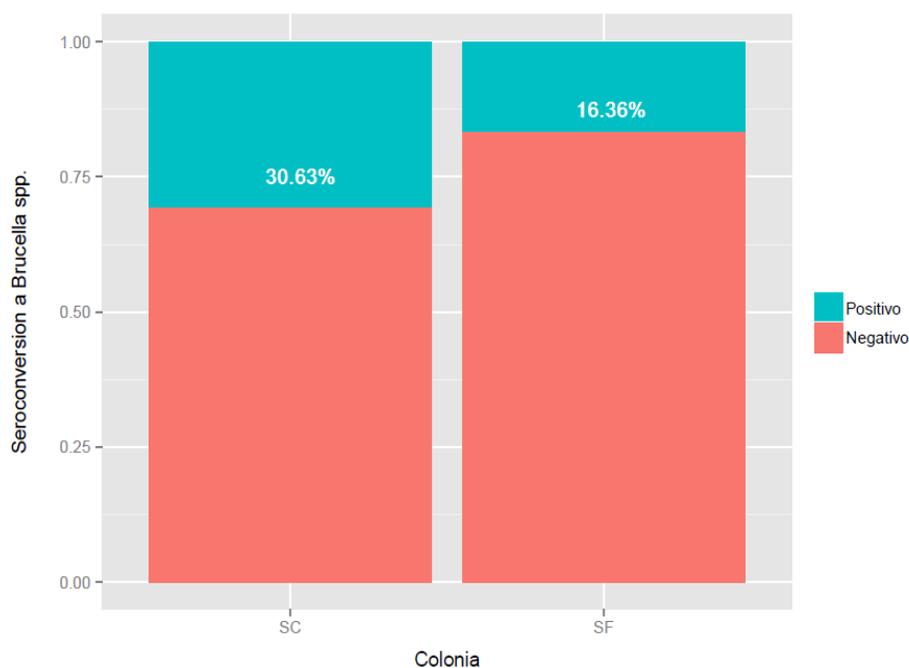


Figura 6. Prevalencia de anticuerpos contra *Brucella* spp. entre colonias. Se muestra una mayor prevalencia en SC, la colonia con asentamientos humanos que en la colonia SF.

La prevalencia de anticuerpos no varió significativamente entre crías hembras y machos (Fisher exacta, $p=0.749$; Figura 7), pero sí entre los años de muestreo (Fisher exacta, $p=0.01$; Figura 8).

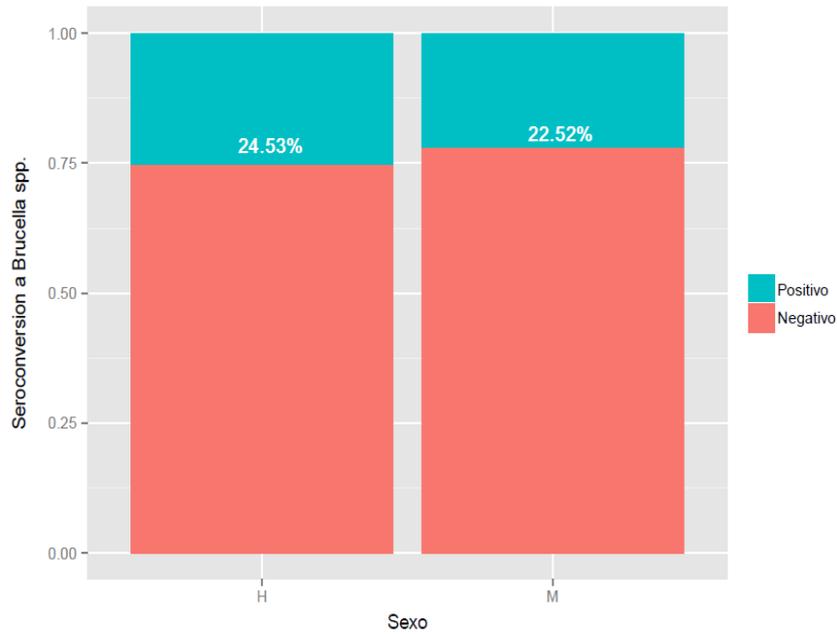


Figura 7. Prevalencia de anticuerpos contra *Brucella* spp. entre sexos. La prevalencia fue similar entre crías hembras (H) y machos (M).

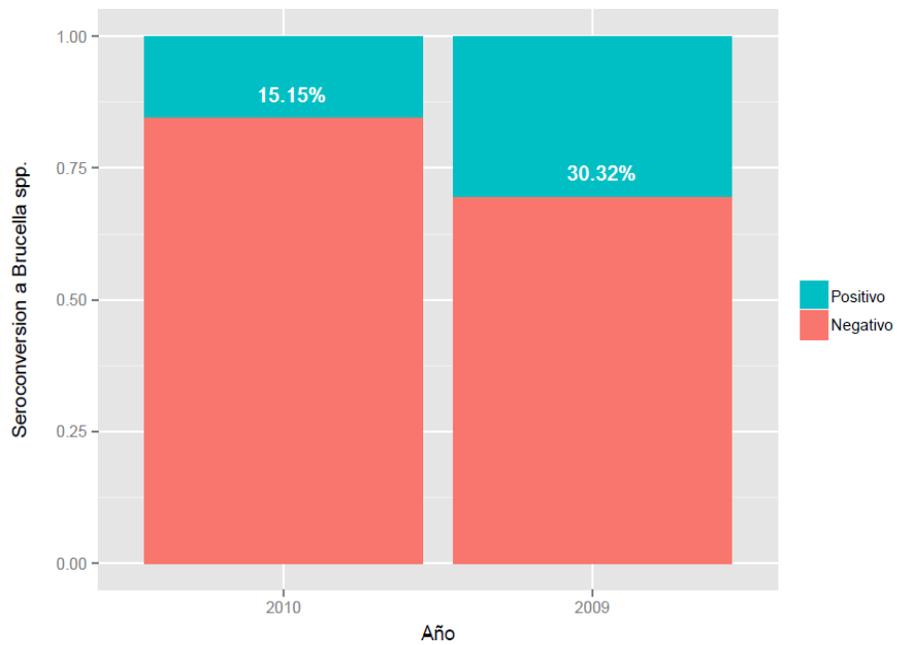


Figura 8. Prevalencia de anticuerpos contra *Brucella* spp. entre años de muestreo. La prevalencia fue mayor en el año 2009 que en 2010.

Para evaluar el efecto de la colonia de nacimiento, condición corporal, sexo, edad y año de muestreo hacia la seroconversión a *Brucella* se construyó un GLM con estas variables explicativas, la presencia o ausencia (1,0) de anticuerpos contra *Brucella* como variable de respuesta. Se vio que la colonia de nacimiento, edad y año de muestreo explicaban la ocurrencia de *Brucella* (Cuadro 1) en las crías donde a mayor edad de las crías, menor era la ocurrencia de anticuerpos (Prueba de χ^2 ; Fisher exacta, $p=0.015$; Figura 9).

Cuadro 1. Modelo lineal generalizado que muestra la contribución de la colonia, edad y año de muestreo en animales seropositivos.

glm(fórmula = *Brucella* ~ Colonia + Edad + Año + Colonia:Edad + Colonia:Año + Edad:Año, familia= binomial)

	Est.	Resid.	Resid. DF	F	P
Colonia	2411.15	6.154	218	6.153	0.013*
Edad	-775.75	9.553	217	9.553	0.002**
Año	-1.0581	4.825	216	4.825	0.028*
Colonia:Edad	0.7221	7.533	215	7.533	0.006**

Valor AIC: 223.38

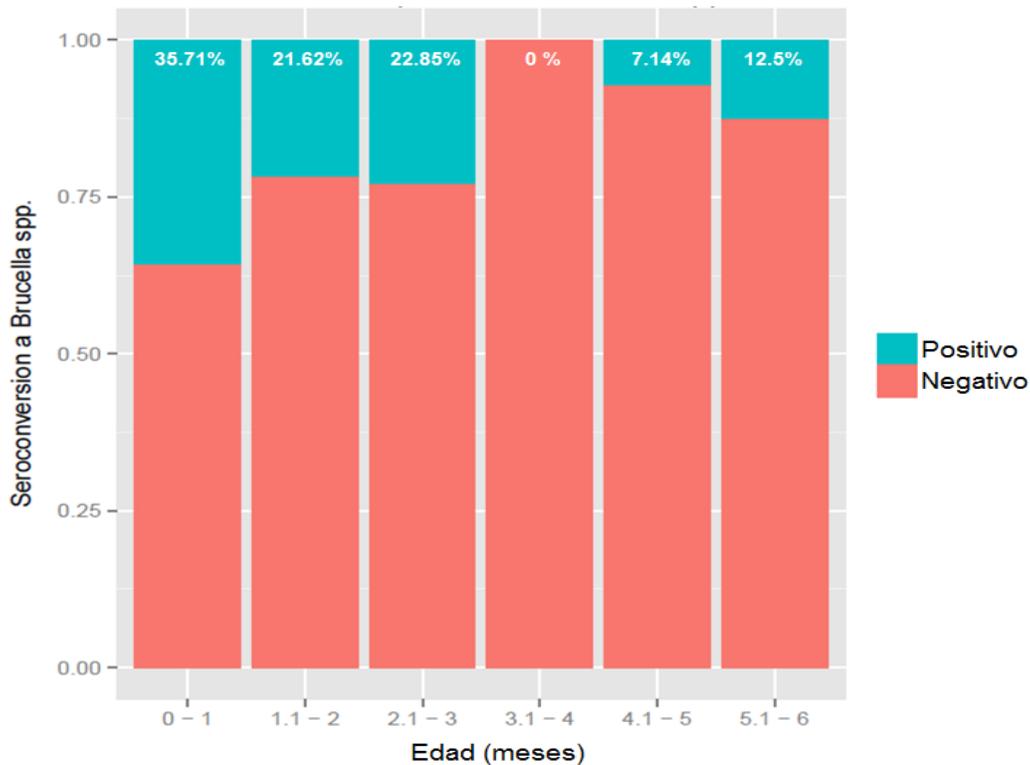


Figura 9. Prevalencia de anticuerpos contra *Brucella* spp. entre edades. La prevalencia fue en crías de entre 0 y 3 meses.

En cuanto a la evaluación de IgG totales y la infección por *Brucella*, se construyó otro GLM con aquellas variables de relevancia en el primer modelo y sólo se agregaron los valores de IgG de cada cría como otra variable explicativa (Cuadro 2). Se encontró que la concentración de inmunoglobulinas G totales no predicen la infección de *Brucella* que estimamos. Los demás parámetros del modelo y sus interacciones se mantuvieron concordantes con el primer modelo.

Cuadro 2. Modelo lineal generalizado que muestra la contribución de inmunoglobulinas G para predecir infección por *Brucella*.

glm(formula = *Brucella* ~ Colonia + IgG + Edad + Año + Colonia:IgG + Colonia:Edad + IgG:Edad + Colonia:Año + IgG:Año + Edad:Año + Colonia:IgG:Edad + Colonia:IgG:Año + Colonia:Edad:Año + IgG:Edad:Año, familia= binomial)

	Est.	Resid.	Resid. DF	F	P
Colonia	-0.0025	6.348	217	6.348	0.011*
IgG	-0.0315	3.766	216	3.766	0.052
Edad	-0.0063	5.368	215	5.368	0.020*
Año	-5.20	5.317	214	5.317	0.021*
Colonia:Edad	0.001	5.285	212	5.285	0.021*
IgG:Año	0.1569	3.562	209	3.562	0.059
IgG:Edad:Año	-0.077	3.604	204	3.604	0.057

Valor AIC: 231.4

Se evaluó el efecto de los parámetros definidos en modelos anteriores (colonia, edad y año de muestreo) y la seropositividad a *Brucella* sobre los conteos leucocitarios diferenciales. El modelo definió como variable respuesta cada uno de los tipos sanguíneos. Se vio que la interacción entre colonia y año de muestreo tiene un efecto inverso sobre los valores circulantes de neutrófilos y linfocitos (Cuadro 3 y 4).

Cuadro 3. Modelo lineal generalizado que muestra la contribución de la colonia, edad y año para explicar conteo de neutrófilos.

glm(formula = Neutrófilos ~ *Brucella* + Colonia + Edad + Año + *Brucella*:Colonia + *Brucella*:Edad + Colonia:Edad + *Brucella*:Año + Colonia:Año + Edad:Año)

	Est.	Resid.	Resid. DF	F	P
<i>Brucella</i>	0.093	5.971	122	2.645	0.106
Colonia	0.008	0.017	121	0.007	0.929
Edad	-0.0124	7.493	120	3.319	0.071
Año	0.0838	1.474	119	0.652	0.420
Colonia:Año	-4.181	10.75	114	4.763	0.031*
Edad:Año	0.6192	7.377	113	3.268	0.073

Valor AIC: 465.34

Cuadro 4. Modelo lineal generalizado que muestra la contribución de la colonia, edad y año para explicar conteo de linfocitos.

glm(formula = Linfocitos ~ *Brucella* + Colonia + Edad + Año + *Brucella*:Colonia + *Brucella*:Edad + Colonia:Edad + *Brucella*:Año + Colonia:Año + Edad:Año + *Brucella*:Colonia:Edad + *Brucella*:Colonia:Año + *Brucella*:Edad:Año + Colonia:Edad:Año)

	Est.	Resid.	Resid. DF	F	P
<i>Brucella</i>	1664.23	0.018	125	0.013	0.908
Colonia	12079.0	0.513	124	0.365	0.546
Edad	874.282	3.959	123	2.820	0.095
Año	1.1798	2.231	122	1.589	0.209
Colonia:Año	- 6.0097	28.59	117	20.36	0.000015***
Edad:Año	- 0.4352	5.543	116	3.948	0.049

Valor AIC: 418.65

Para los valores de Eosinófilos la edad de las crías es un elemento que influye directamente sobre sus valores (Cuadro 5).

Para los monocitos es importante destacar que la infección de *Brucella* predice la variación en los conteos de este tipo celular, así como la colonia, la edad y el año, y algunas interacciones entre estas variables (Cuadro 6). En contraste sólo las interacciones entre colonia y año de muestreo, y la colonia, edad y año explicaron los conteos de Basófilos (Cuadro 7).

Cuadro 5. Modelo lineal generalizado que muestra la contribución de la colonia, edad y año para explicar conteo de eosinófilos.

Glm(formula = Eosinófilos ~ *Brucella* + Colonia + Edad + Año + *Brucella*:Colonia + *Brucella*:Edad + Colonia:Edad + *Brucella*:Año + Colonia:Año + Edad:Año + *Brucella*:Colonia:Edad + *Brucella*:Colonia:Año + *Brucella*:Edad:Año + *Brucella*:Colonia:Edad:Año)

	Est.	Resid.	Resid. DF	F	P
<i>Brucella</i>	0.0015	1.717	122	3.471	0.065
Colonia	0.0879	1.891	121	3.824	0.053
Edad	0.0342	4.735	120	9.574	0.002*
Año	0.3647	0.016	119	0.031	0.855
Colonia:Año	-0.437	1.745	114	3.529	0.062

Valor AIC: 275.87

Cuadro 6. Modelo lineal generalizado que muestra la contribución de la colonia, edad y año para explicar conteo de monocitos.

Glm(formula = Monocitos ~ *Brucella* + Colonia + Edad + Año + *Brucella*:Colonia + *Brucella*:Edad + Colonia:Edad + *Brucella*:Año + Colonia:Año + Edad:Año + *Brucella*:Colonia:Edad + *Brucella*:Colonia:Año + *Brucella*:Edad:Año)

	Est.	Resid.	Resid. DF	F	P
<i>Brucella</i>	0.0252	0.034	122	8.045	0.005**
Colonia	-1.256	0.031	121	7.548	0.007**
Edad	-0.0146	0.018	120	4.323	0.039*
Año	-0.0306	0.015	119	3.739	0.055
<i>Brucella</i>:Edad	-0.0174	0.024	117	5.864	0.017*
Edad:Año	0.0072	0.011	113	2.806	0.096

Valor AIC: -311.62

Cuadro 7. Modelo lineal generalizado que muestra la contribución de la colonia, edad y año para explicar conteo de basófilos.

Glm(formula = Basófilos ~ *Brucella* + Colonia + Edad + Año + *Brucella*:Colonia + *Brucella*:Edad + Colonia:Edad + *Brucella*:Año + Colonia:Año + Edad:Año + *Brucella*:Colonia:Edad + *Brucella*:Colonia:Año + *Brucella*:Edad:Año + Colonia:Edad:Año)

	Est.	Resid.	Resid. DF	F	P
<i>Brucella</i>	212.6520	0.005	122	1.047	0.308
Colonia	1229.711	6.2e-5	121	0.011	0.913
Edad	98.8498	0.005	120	1.102	0.296
Año	0.09671	0.007	119	1.457	0.229
Colonia:Año	-0.61183	0.108	114	20.54	0.00001***
Colonia:Edad:Año	0.12032	0.004	110	8.350	0.004**

Valor AIC: -283.07

Análisis de riesgo de Brucella spp. en el lobo marino de Galápagos

Para el análisis de riesgo se construyeron varios modelos epidemiológicos derivados de cambiar los diferentes valores de cada estado del individuo (P, S, E, I, R). Destacaron tres modelos, el primero se obtuvo al simular el inicio de una epidemia de brucelosis cuando la población del lobo marino está en condiciones basales, es decir que no están bajo ninguna condición atmosféricas-oceanográficas anormal ni provocada por el hombre. En esta primera simulación se observó que inicialmente la enfermedad aumentó exponencialmente durante los primeros 15 años y luego se estabilizó.

Se observó que dentro de este modelo se mantuvo de entre un 80 a 90% de la población infectada, y que el 100% de la población fue expuesta al patógeno; también se observó aunque en menor proporción, que el 50% de la población parece recuperarse (Figura 10a). Por lo tanto la prevalencia de la enfermedad se quedó en un 100% (Figura 13a). La población afectada fue principalmente adulta de ambos sexos, así como los juveniles (este caso consideramos como parte a este grupo, a las crías), mientras que los individuos subadultos formaron la mayor parte de la población (Ver Figura 10b).

En un segundo modelo, se usaron valores similares al primer modelo pero se cambió el número de individuos infectados inicialmente a un 31% de la población, para simular los primeros hallazgos como resultado de la evaluación de la prevalencia de anticuerpos contra *Brucella*, para este caso se simuló que esta proporción de individuos estuviesen infectados. Se observó que bajo estas condiciones la población disminuyó el primer año, y no aumentó durante aproximadamente 25 años. A partir del año 30 de la simulación, la población empezó a aumentar lentamente donde los individuos subadultos fueron los primeros en aumentar en número (Figura 11b). La epidemia en esta simulación no se mantiene ya que no se observan individuos expuestos o infectados que permitan mantener la enfermedad (Figura 13b) y tampoco se observan individuos recuperados (Figura 11a).

En un tercer modelo, se agregó un evento climático del cual el lobo marino de Galápagos está expuesto de manera cíclica, el fenómeno ENSO-EI Niño que impacta sobre la mortalidad de la población al afectar la disponibilidad de alimentos. En este modelo se incluyeron niveles basales de mortalidad más altos. Lo que encontramos fue que la infección por *Brucella* no prevalece (Figura 13c), ya que no existe el mínimo de individuos que la mantengan presente (Figura 12b). La dinámica de la población mostró una pérdida rápida del lobo marino, y pasado el año 30 esta creció exponencialmente y siguió en aumento (Figura 12a), no se observa un límite donde se detenga, a diferencia del segundo modelo.

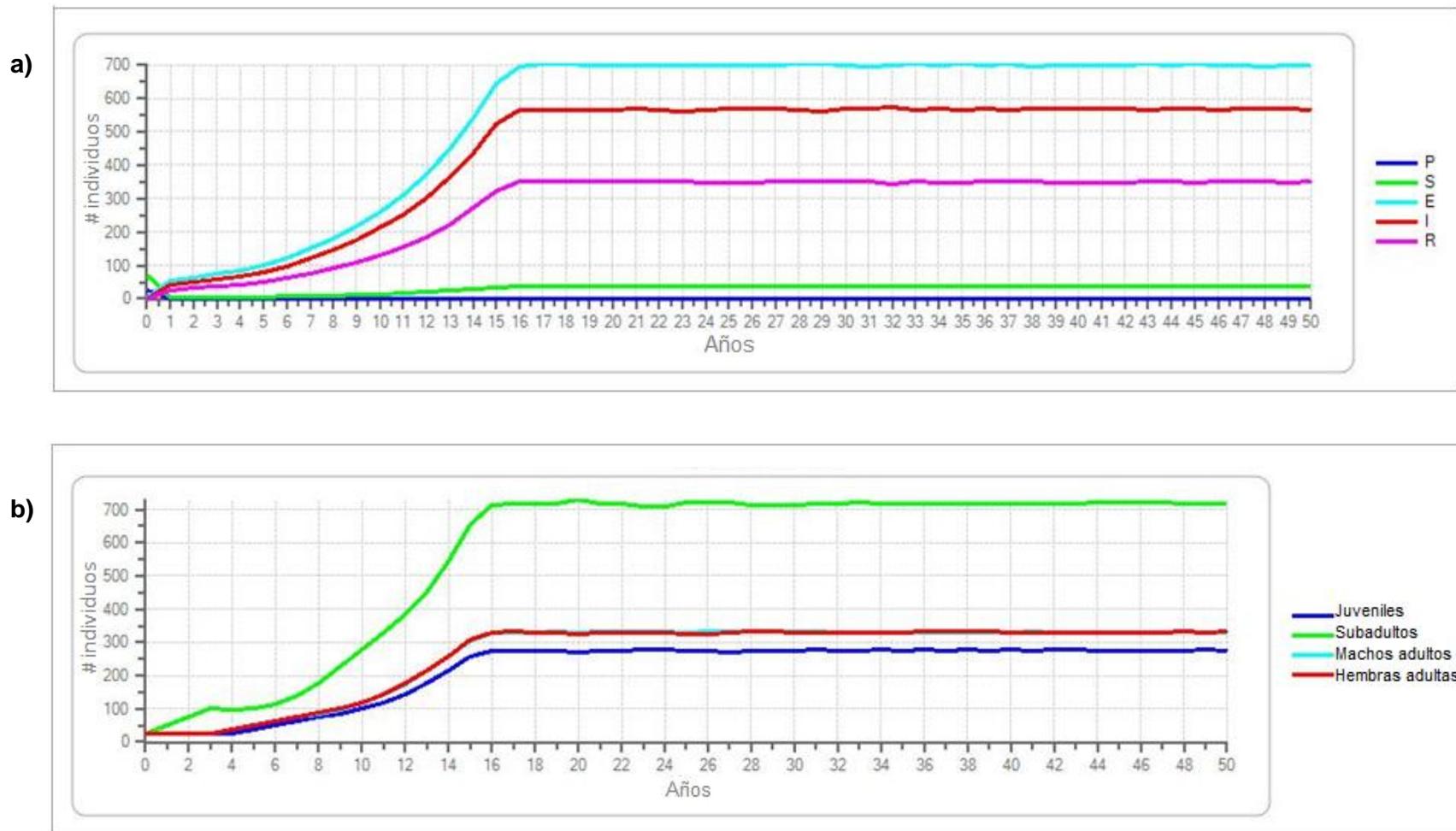


Figura 10. Dinámica de la enfermedad y dinámica de la demografía del lobo marino en un modelo de simulación de una infección por *Brucella* spp. a) Dinámica de la enfermedad, el modelo muestra una buena parte de la población infectada y que ha sido expuesta, así mismo presenta a la b) Demografía, en donde el grupo de subadultos, presenta un número mayor de individuos respecto a adultos y juveniles. P=Pre-susceptible, S=Susceptible, E=Expuesto, I=Infectados, R=Recuperados.

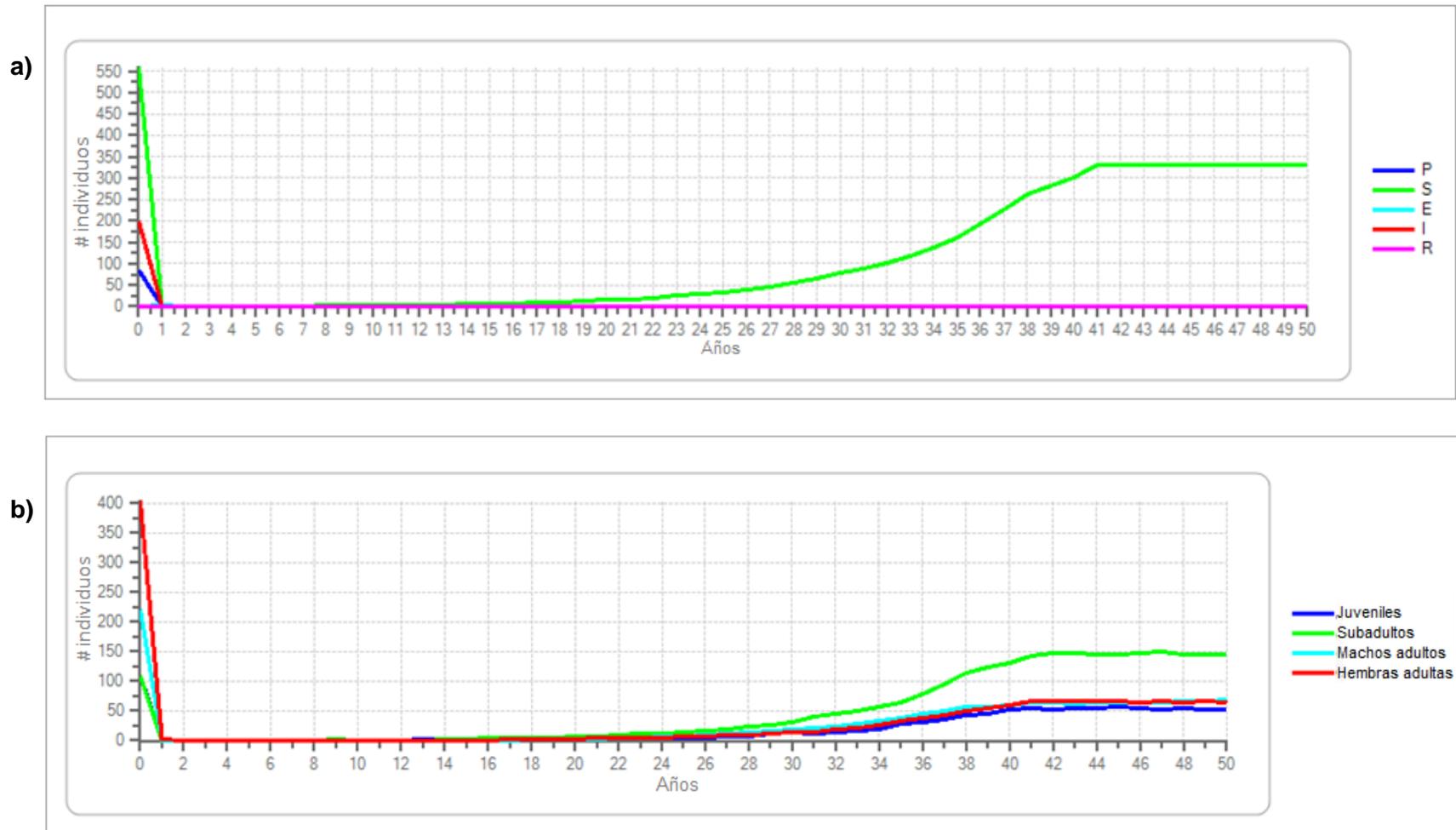
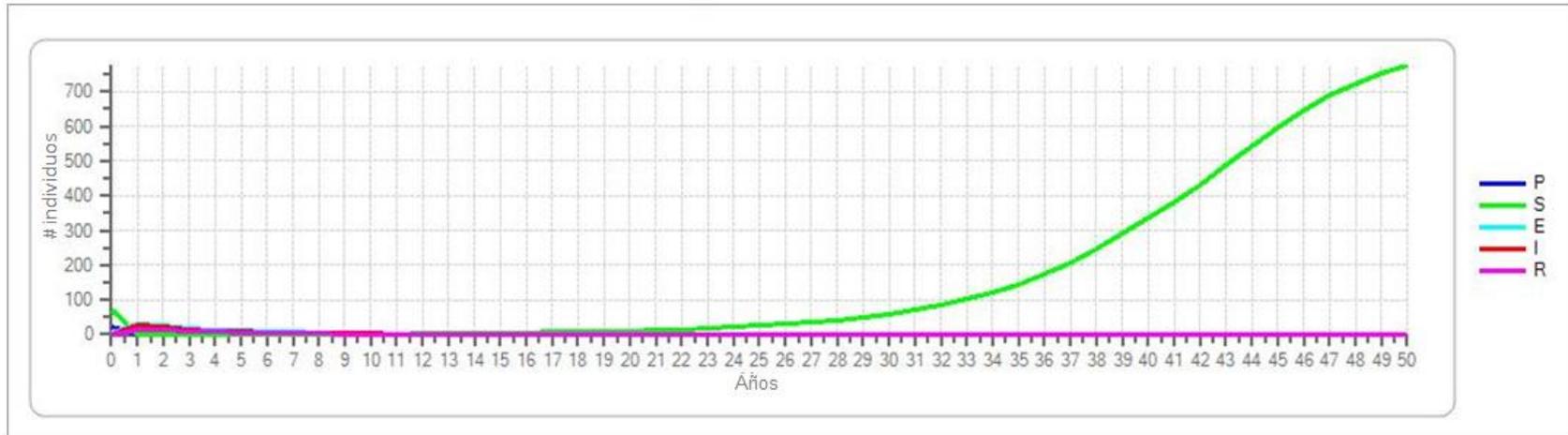


Figura 11. Efecto de una infección por *Brucella* spp. sobre la demografía del lobo marino de Galápagos cuando el número inicial de individuos infectados es del 31%. a) Modelo simula una infección inicial de casi una tercera parte de la población y que no se mantiene, pues la dinámica de esta sólo muestra a individuos que son susceptibles, y b) la población decae bastante, pero tienden a mantenerse. P=Pre-susceptible, S=Susceptible, E=Expuesto, I=Infectados, R=Recuperados

a)



b)

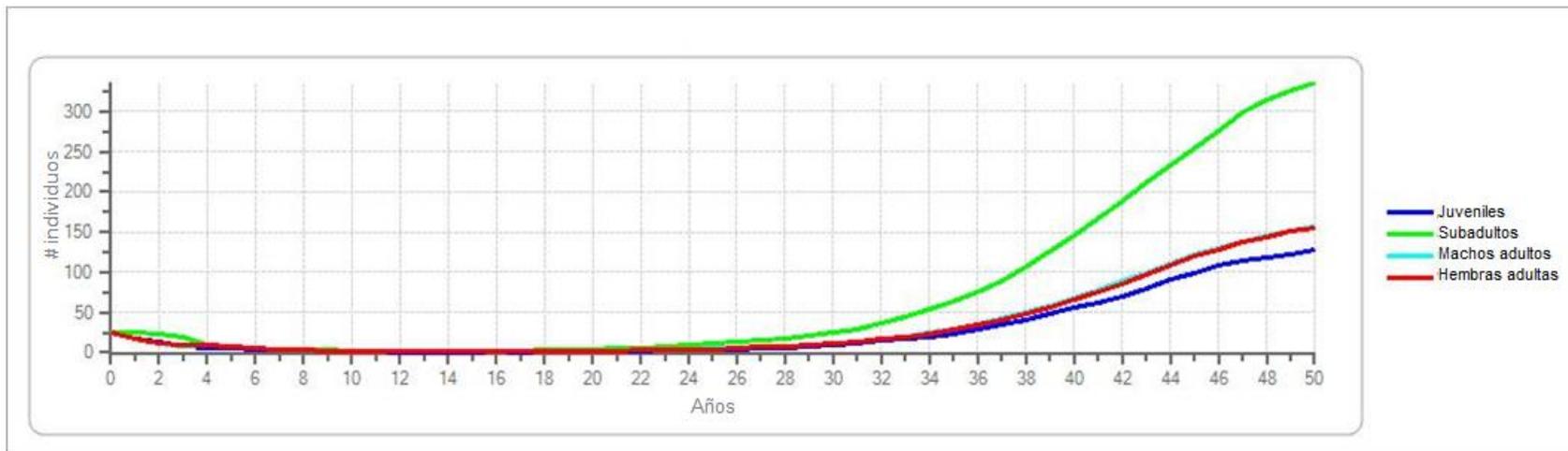
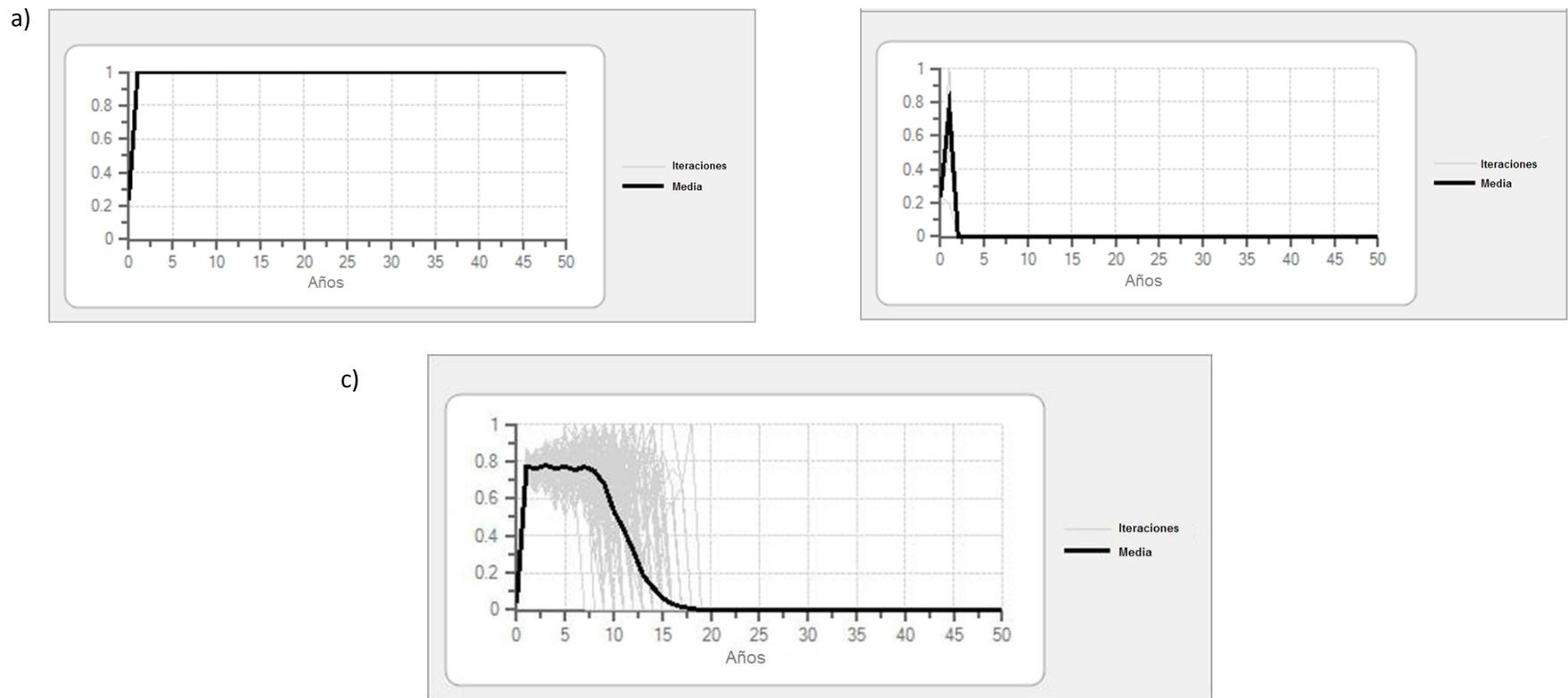


Figura 12. Efecto de una infección por *Brucella* spp. sobre la dinámica de la demografía del lobo marino de Galápagos en una simulación de un evento climático como ENSO-EI niño. a) La enfermedad también se pierde en estos eventos, pero en este caso la b) población tiende a recuperarse rápidamente. P=Pre-susceptible, S=Susceptible, E=Expuesto, I=Infectados, R=Recuperados.

Figura 13. Prevalencia de infección por *Brucella* spp. de tres escenarios posibles de simulación para el lobo marino de Galápagos. a) Muestra una prevalencia de infección cuando población inicial afectada es un individuo y de ahí la diseminación, rápidamente pasa a toda la población y se mantiene 100%, b) Prevalencia de la infección al considerar una proporción inicial de individuos infectados del 31%, prevalencia pasado poco tiempo decae a cero y, c) Prevalencia de infección en una simulación de un efecto climático ENSO-El niño, esta permanece 70% en la población después de 15 años esta decae nuevamente a cero.



8. DISCUSIÓN

En esta tesis se quiso explorar el impacto de una enfermedad común en animales domésticos y transmisibles a fauna silvestre, para evaluar el riesgo de exposición y de transmisión para el lobo marino de Galápagos, especie catalogada en riesgo de extinción. Una de las enfermedades que reunieron estos requisitos fue la brucelosis que además, tiene el potencial de influir sobre la mortalidad y éxito reproductivo de sus hospederos, lo cual es importante para especies en peligro de conservación.

Se encontró que la presencia de anticuerpos contra *Brucella* de ambas loberas prevalece en un 23.52% en el total de los animales muestreados. Hay que resaltar que la presencia de anticuerpos contra especies de *Brucella* en las crías de lobo marino no indica que los animales tienen una infección activa, es decir que estén enfermos, sólo muestra que en algún punto del tiempo hubo una exposición ante la bacteria que provocó una seroconversión o producción de anticuerpos (Jensen *et al.* 2013). Por otro lado, la ausencia de anticuerpos no descarta la posibilidad de alguna exposición a *Brucella*, esto quiere decir que la capacidad de una prueba serológica para detectar anticuerpos puede depender de muchos factores como el tiempo en el que se realizó el estudio (Nymo 2013).

Algunos otros estudios sugieren que la forma en la que se mantiene una infección dentro de una población ya sea, por que se comporte como una enfermedad enzoótica o por una exposición repetida a una fuente de infecciosa, va a tener una influencia en la detección de anticuerpos evaluados por las distintas pruebas serológicas (Lynch *et al.* 2011a). Además algunos test pueden llegar a reaccionar con otras especies de bacterias y generar falsos positivos, pero en especies silvestres es difícil evaluar este tipo de reacciones cuando se conoce poco de toda la carga bacteriana potencialmente presente en los hospederos (Jensen *et al.* 2013; Nymo 2013). Así que a pesar de las dificultades que se puedan presentar con la evaluación de anticuerpos mediante las pruebas serológicas no se descartan para estos estudios debido a que en general son métodos validos, usados a gran escala y adecuados para este tipo de investigaciones.

La prueba comercial aquí utilizada evalúa la presencia de anticuerpos contra especies de *B. bovis*, *B. mellitensis*, *B. canis* típicas de animales domésticos por lo que se sugiere que refleja una transmisión por parte de la fauna doméstica en las islas. Este test detecta anticuerpos contra el lipopolisacárido S de la membrana de *Brucella*, la cual es importante para evadir el sistema inmune durante períodos tempranos de la infección (Muñoz *et al.* 2005). En apoyo a nuestra hipótesis se vio que SC fue la colonia con prevalencia más alta y es probable que se deba a la relación estrecha de los lobos con los animales domésticos (Skelly *et al.* 2006) y posiblemente a la mayor contaminación en esta zona, hecho que incrementa la susceptibilidad a patógenos (Alava *et al.* 2011b). Sin embargo, SF también tuvo animales seropositivos, lo que podría indicar que las crías de esta isla tendrían exposición a *Brucella* debido al movimiento que realizan las madres para alimentarse (Fariña *et al.* 2003; Villegas-Amtmann *et al.* 2008) y que por lo tanto ellas les pasen anticuerpos, lo que aun no se ha confirmado ni tampoco descartado en algunos de los estudios previos (Brock 2012). Una vía alterna sugiere que los individuos pudieron haber sido expuestos por otras rutas como inhalación o ingestión con material infectado proveniente de otros individuos que ya se había contagiado (Lynch *et al.* 2011a) y que se encontraban en SF. Además, la población se ha demostrado que la población de lobos marinos de SF se encuentran en mejor estado de salud, por lo tanto están mejor preparados para defenderse contra infecciones, al destinar más recursos a diferencia de aquellos encontrados en lugares perturbados (Brock 2012).

La diferencia en la prevalencia de anticuerpos contra *Brucella* entre los años de muestreo, pudo estar relacionado a un posible evento de contaminación. Algunas investigaciones estiman que las emisiones anuales de DDTs ocurridas en distintas partes del mundo tienen influencia en la región de Ecuador, esto debido a que el transporte de DDTs puede ocurrir mediante la afluencia de vientos de noreste y de sureste, así como de corrientes oceanográficas, como la corriente de Panamá y la de Humboldt que contribuyen con la distribución de estos contaminantes (Alava *et al.* 2011a). La presencia de DDTs disminuyen la actividad del sistema inmune y por ello pudieron hacer que los lobos marinos fueran más propensos a la exposición (Alava *et al.* 2011b; Brock 2012). Sumando que para los últimos años de entre 2005 y 2008 se han registrado un crecimiento en los niveles de este tipo de contaminantes (Alava *et al.* 2011b).

El evento ENSO-El niño donde los ocurren cambios ambientales que afectan directamente la dinámica de la cadena trófica por el aumento de la temperatura en la columna de agua (Trillmich & Limberger 1985; Trillmich *et al.* 1991). Según la OMM (2014) la temporada del 2009 fue un año Niño de moderada intensidad, esto sugiere la escasez de alimentos hizo limitar la cantidad de alimentos obtenidos en ese periodo de tiempo y que estas condiciones de vida que orillaran a la búsqueda de comida en otra zona, incluso adentrándose aún más a las zonas costeras impactadas y especialmente incrementar los contactos en tierra, tal caso es comparable a los ocurrido con el lobo fino de Australia (Lynch *et al.* 2011a) donde la prevalencia de *Brucella* en diferentes años correspondía a este tipo de cambios en la temperatura del agua y por lo tanto el cambio de dieta por parte de estos lobos cambiaba, lo cual los exponía a tener contacto con especies de esta bacteria.

La aproximación multivariada utilizada en esta tesis permitió observar que para el lobo marino de Galápagos el riesgo de infección por *Brucella*, están determinados por la colonia de nacimiento, el año de muestreo y la edad de las crías. Por la colonia y año se ha discutido sobre su papel en la seroconversión. En relación con la edad, se ha observado que juega un papel importante sobre la presencia de anticuerpos en especies como el lobo fino de Australia (Lynch *et al.* 2011a), y que existe un patrón donde se muestra que entre más joven existe una menor probabilidad de ser seropositivo, al cumplir un año esta probabilidad aumenta y pasado esto, nuevamente decrece (Lynch *et al.* 2011b; Nymo 2013), esto puede deberse a los diferentes cambios de comportamiento y alimentación (Jeglinski *et al.* 2012) que preceden a un mayor riesgo de exponerse a patógenos.

En cuanto a las Inmunoglobulinas G con la infección de *Brucella* no encontramos una relación. Se sabe que las IgG son producidas por las propias crías, pero no se descarta una transmisión vertical (Brock 2012). Otros estudios muestran altos niveles de IgG en la isla impactada, como lo es SC. En este caso la presencia de IgG tiene una relación negativa en la presencia o ausencia de anticuerpos contra *Brucella*, por lo que se sugiere que este tipo de anticuerpos puede estar presente solo en infecciones por otros agentes. Algunos estudios en ganado vacuno muestran que las inmunoglobulinas M (IgM) son las que se les encuentra presentes en mayor concentración en el suero de animales infectados por *Brucella* (Goenka *et al.* 2012).

Por lo que la relación negativa con IgG confirma este tipo de relación y que se debe buscar una relación con las IgM. Además, la diferencia entre ambas clases de anticuerpos radica en que IgM se le encuentra después de la exposición a una enfermedad mientras que IgG, se le encuentra a largo plazo en el cuerpo (Winkelstein *et al.* 1998; Goenka *et al.* 2012). Por lo que se deben estudiar las concentraciones de IgM en las crías pues podrían ser un indicador de una infección actual, mientras que las IgG nos indican una exposición reciente o pasada. Otro problema en cuanto a la relación negativa de IgG, es que sólo se evalúa la presencia y ausencia de anticuerpos contra *Brucella* y no observamos un conteo diferencial por lo que también puede estar sesgada esta relación y se deberá realizar para descartarla.

Los efectos observados de la infección por *Brucella* sobre los neutrófilos y linfocitos fueron explicados principalmente por la interacción entre colonia y el año de muestreo. Los neutrófilos son la primera línea de defensa contra patógenos y los linfocitos son células del sistema inmune adquirido que están asociadas infecciones bacterianas o virales agudas (Winkelstein *et al.* 1998). Por lo que en una infección por *Brucella* estas se encargan de fagocitar algunas de las bacterias que entran al hospedero aunque, la mayoría de las bacterias evaden este tipo de células. Mientras que los linfocitos son células que reaccionan primordialmente a antígenos y encargados de la inmunidad a largo plazo (Winkelstein *et al.* 1998). Se ha demostrado que algunos linfocitos como los del tipo B son utilizados por *Brucella* para evadir el sistema inmune ya que estos no tiene la capacidad de detectarlos (Goenka *et al.* 2012). A pesar de que *Brucella* no puede replicarse en estas células un buen porcentaje de la infección persiste en este tipo celular, ya que en estudios *in vitro* 10% de células infectadas por esta bacteria son linfocitos B y suele ser facilitada por (Goenka *et al.* 2012).

De acuerdo con los resultados observados y a estudios anteriores un elemento importante en la inmunidad del lobo marino de Galápagos es la colonia de nacimiento (Brock 2012). Ya sea SC una zona con asentamientos humanos donde se esperaría que las crías estuvieran inmuno-suprimidas a diferencia de SF, donde no existe el alto impacto humano de SC, y los lobos estarían mejor en términos de inmunidad.

Además, agregar que un posible evento ocurrido en 2009 hubiera impactado sobre los lobos, como El niño (OMM 2014), no sería difícil concretar que ambos factores son determinantes en el conteo de las células blancas circulantes. La evidencia fue que esto ocurrió al evaluar en todos los valores circulantes de las células blancas.

La variación en eosinófilos resultó inesperada, pues *Brucella* y la colonia por sí solos podían predecir los valores circulantes, este tipo de células son típicamente de defensa antiparasitaria o alergias (Winkelstein *et al.* 1998). No obstante, existen reportes de transmisión de especies patógenas de *Brucella* en otros pinnípedos, donde la infección primaria es por medio de parásitos pulmonares (Garner *et al.* 1997; Dawson *et al.* 2008a; Lynch *et al.* 2011a; Hernández-Mora *et al.* 2013), por lo que la asociación entre los eosinófilos y la infección por *Brucella* podría ser indirecta y más bien reflejar infecciones parasitarias en crías seropositivas. Además, se ha reportado que un receptor de integrinas en *B. abortus* puede mediar la interacción entre la bacteria y el parásito coinfectante (Garner *et al.* 1997). Otro parásito pulmonar que se ha reportado como vector de especies de *Brucella* es *Pseudalius inflexus*, que infecta marsopas (Dawson *et al.* 2008a). Sin embargo, *P. inflexus* nunca ha sido descrito en pinnípedos, mientras que *Parafilaroides* spp. es un parásito común en varias especies de pinnípedos, incluyendo al lobo marino de Galápagos (Acevedo-Whitehouse, datos no publicados). Nuestro resultado es importante debido a que aún se tiene poco conocimiento sobre las vías de transmisión de *Brucella* hacia pinnípedos, y aunque la vía principal se propone que obedece a contactos con animales en tierra (Hernández-Mora *et al.* 2013), es posible que esta sea una vía de transmisión de igual relevancia.

Los monocitos son células fagocitarias encargadas de eliminar parásitos intracelulares (Winkelstein *et al.* 1998; Walker 2008) y estas variaron conforme a la presencia o ausencia de *Brucella* ya que esta bacteria es un parásito intracelular (Nymo *et al.* 2011) y que existe la probabilidad de que en caso de haber una infección activa el sistema inmune estuviera respondiendo, es interesante hacer mención que este tipo de células blancas forman parte del ciclo de infección de *Brucella* (Nielsen *et al.* 2005).

Algunos estudios han evaluado el potencial patogénico de algunas variedades de *Brucella* hacia los monocitos tisulares (macrófagos) y se observa que las brucellas son eliminadas a las 96 horas; incluso algunas focas de casco (*Cystophora cristata*) los eliminan a las 48 horas (Nymo *et al.* 2014). Esto sugiere que una infección por *Brucella* puede ser combatida por el sistema inmune innato del lobo marino de Galápagos. El problema es que esta función puede ser alterada por la presencia de contaminantes como PBCs (Nymo 2013) o DDTs (Alava *et al.* 2011b), y se ha demostrado que existe la presencia de estos últimos en las islas Galápagos (Alava *et al.* 2011a; Alava *et al.* 2011b), por lo que no se puede descartar la posibilidad de que la combinación de estos eventos estén permitiendo cambiar los valores circulantes de monocitos en estos hospederos.

Además se ha observado que en el lobo fino de Australia la especie de *Brucella* que está produciendo los abortos durante la mitad del período de embarazo en más del 37% de las hembras es *B. melitensis* (Lynch *et al.* 2011a). Esto quiere decir que una especie de bacteria común de fauna doméstica tiene el potencial de producir, en el caso de *Brucella*, abortos a diferencia de aquellas especies relacionadas a hospederos de mamíferos marinos como *B. pinnipedalis*, de la cual sólo se ha mostrado que inducen otro tipo de patologías y no abortos directamente en los pinnípedos (Nymo *et al.* 2011; Hernández-Mora *et al.* 2013).

Los basófilos son un tipo de células blancas que intervienen en reacciones alérgicas y algunas ocasiones contra parásitos multicelulares (Winkelstein *et al.* 1998). El conteo de estas células sólo fue modificado por factores que debían interactuar entre ellos, como la colonia de nacimiento, la edad y el año de muestreo. Este tipo de leucocito es el menos abundante en la en la sangre, y algunos miden los niveles de abundancia cuando se sospecha la presencia de parásitos (Walker 2008), lo cual podría ayudar a determinar en una primera aproximación si los lobos marinos están infectados por parásitos, que pudieran estar asociados a *Brucella*.

En esta tesis también se evaluó el riesgo epidemiológico que representa *Brucella* para el lobo marino de Galápagos. Resulta difícil determinar la dinámica de la población y los problemas que causa un patógenos cuando ocurre una infección emergente o no emergente, incluso aquellas enzoóticas o epizoóticas cuando algunas características del patógeno o del hospedero se ven modificadas, pero las simulaciones son capaces de permitirnos ver una posibilidad cercana a la realidad (Bradshaw *et al.* 2012).

Un primer modelo demostró un escenario en el que la brucelosis se mantiene en la población del lobo marino a lo largo del tiempo y en una alta prevalencia. La persistencia de un patógeno deriva en primera instancia de cómo este se ha transmitido, esto depende propiamente de la tasa de reproducción del patógeno (R_0), además de la biología del mismo (Roberts *et al.* 2002). En el caso de *Brucella*, la transmisión ocurre por contacto entre individuos o ingesta de material abortado, exposición a secreciones o heridas (Nielsen *et al.* 2005; Lynch *et al.* 2011a; Nymo *et al.* 2011), un último caso es la reproducción y la lactancia (Nielsen *et al.* 2005; Nymo *et al.* 2011), que para el lobo marino de Galápagos no ha sido descrito (Brock 2012), lo que puede resultar como una limitante para este estudio y para el modelo en sí.

Después de que un patógeno ha entrado a su hospedero debe ser transmitido para mantenerse en la población, este primer modelo remarca que el lobo marino resulta un hospedero factible, ya que todas las condiciones que presenta lo permiten prevalecer dentro de esta población, y para que esto ocurra puede usar distintas estrategias, algunos ejemplos de ellas es usar a su hospedero reservorio, tener un largo período de incubación ó usar una única estructura espacial del hospedero (Switon *et al.* 2002).

Esta última es relevante debido a que todas las especies poseen una estructura social en forma de colonia, en donde un patógeno puede invadir un grupo, saltar a otra susceptible y dejar recuperar a otra a través de la inmigración por ejemplo (Hess *et al.* 2002). En nuestro modelo este proceso puede explicar el que la población de subadultos tiende a mantenerse en un mayor número y los adultos y juveniles sean los afectados. Por otra parte, los hábitos de cada estructura de la población también pueden aportar información del porqué una estructura de este grupo es más probable que sea más susceptible o no. La misma biología del lobo nos dice que, por ejemplo, en el caso de los adultos machos, estos tienden a moverse más para establecer

territorio reproductivo (Jeglinski *et al.* 2012). En crías, una exposición a *Brucella* produce mayores riesgos de alterar su eficacia biológica y sus supervivencia (Mos *et al.* 2006; Alava *et al.* 2011b). La tasa de contacto también puede variar en tierra o agua, las estrategias de alimentación y forrajeo pueden variar también entre grupos de la misma especie y esto puede interferir en el efecto de la prevalencia en cada grupo del lobo (Villegas-Amtmann *et al.* 2008; Villegas-Amtmann *et al.* 2011).

El segundo modelo mostró que una alta prevalencia produce altos niveles de mortalidad. Se sabe que la Brucelosis en alta prevalencia puede ocasionar abortos, probablemente en conjunto con otras bacterias o enfermedades (Jensen *et al.* 2013). Al tener una alta mortalidad no hay hospederos donde continuar, es entonces donde la prevalencia de *Brucella* baja a cero es decir, desaparece de la población. Esto puede sugerir que este parásito es un ejemplo de una transmisión denso dependiente, como ocurre con otros casos en fauna silvestre (Switon *et al.* 2002). De ser así, entonces la población puede recuperarse pasado el tiempo, pero su tasa de crecimiento es baja, pueden ocurrir otros eventos que impidan un aumento mayor de la población.

Similar situación ocurre al simular un evento climático (ENSO-El niño), pero en este caso la población experimenta un aumento exponencial. En este caso, podemos sugerir que el período de cuidados maternos por parte de la hembra mantiene estable el crecimiento de la población pasado este tiempo, una adaptación registrada para el lobo marino de Galápagos (Trillmich & Limberger 1985) y que habilita el crecimiento de la población. Esto insinúa un acierto de los modelos epidemiológicos, pero incluso una limitante pues el programa no permite incluir estos eventos como un factor independiente. Lo mismo ocurre en eventos de partida de nuestro estudio. El impacto humano que es aunque es difícil de cuantificar por lo que es una limitante en los modelos, ya que es posible que este tipo de sucesos promuevan la emergencia de enfermedades (Skelly *et al.* 2006). Otra limitante para estos programas es el cambio en las tasas de virulencia del patógeno que no pueden ser incluidos en este tipo de programas, y las tasas de mortalidad diferencial de los hospederos, en donde en este caso podría ser exclusivo de crías en caso de presentarse ocasionaran abortos (Guzmán-Verri *et al.* 2012) en el lobo marino de Galápagos.

Hace falta construir modelos que tomen en cuenta estos parámetros, esto podría hacerlos aún más cercanos a la realidad. También se debe considerar si un patógeno es transmitida por vectores, en el posible caso de que parásitos pulmonares como *Parafilaroides* spp. puedan influir en la transmisión de especies de *Brucella* (Garner *et al.* 1997; Dawson *et al.* 2008a; Lynch *et al.* 2011a). Ya que se podrían realizar algunos otros modelos de estudio independientes en lo que se agregue esta variable y se pueda mejorar las simulaciones. Aún faltan muchos estudios para ver el impacto de esta bacteria sobre el lobo marino de Galápagos, este estudio es un parte inicial y deben integrarse más estudios para que los nuestros resultados puedan ser incluidos en un plan de conservación para esta especie en peligro.

Esta tesis tuvo como objetivo integrar diferentes ramas de la epidemiología para proveer de información sobre la exposición a *Brucella* spp. en el lobo marino de Galápagos (*Zalophus wollebaekii*). Esta información podría ser utilizada para cuantificar el riesgo de manera relativa para incluir en la toma de decisiones en los planes de conservación, con el fin de reducir el riesgo de enfermedades en el lobo marino, que se encuentra en riesgo de extinción. Esta tesis integró diferentes disciplinas de la epidemiología lo cual permitió que la información obtenida de la variación inmunológica, los factores aleatorios (edad, año de muestro, colonia) y el uso de diferentes herramientas como el modelaje epidemiológico permitieran complementar y corroborar cada resultado a lo largo de este análisis. Por esta razón, los análisis multidisciplinarios pueden ser utilizados en distintas especies o patógenos de estudio (Grenfell *et al.* 2002).

Desde el punto de vista de la conservación del lobo marino de Galápagos aún hace falta estudios a cerca de la presencia de agentes patógenos para la especie, ya que tampoco se tiene descrita la causa de su declive poblacional (Schipper *et al.* 2008; Coria-Galindo *et al.* 2009). También se demostró que los asentamientos humanos si impactan sobre la fauna silvestre, pues trae cambios drásticos al ambiente que no muchas especies pueden superar (Skelly *et al.* 2006), por lo que se deben haber cambios o medidas para no altera los ecosistemas. A pesar de que se tiene un manejo dentro de estas islas. Además de que se espera que los estudios sobre *Brucella* continúen a largo plazo, y que se complete la información sobre esta bacteria para toda la población del lobo marino.

9. CONCLUSIONES

- Este es el primer reporte de *Brucella* en el lobo marino de Galápagos.
- Se concluye que existe riesgo de aparición y establecimiento de enfermedades infecciosas derivadas de los asentamientos humanos, y que su transmisión no se restringe a las colonias “urbanas”.
- Contrario a nuestra hipótesis la cantidad de IgG circulantes no predicen la presencia de anticuerpos contra *Brucella*
- La cantidad de células blancas circulantes se ve modificada por la presencia de anticuerpos contra *Brucella*, principalmente Monocitos los cuales se relacionan directamente en el ciclo de infección de *Brucella*.
- Los resultados obtenidos permiten tener una vista inicial de lo que podría pasar si existiera una infección activa en una población en términos de los planes de manejo que impidan un proceso que lleve a la extinción de una especie.
- Los modelos epidemiológicos son complejos, pero la complementación con otras áreas de estudio como eco-epidemiología, inmuno-epidemiología o la estadística multivariada pueden complementar los resultados obtenidos. El modelaje de enfermedades puede ser un implemento importante para agregar a estudios de conservación, ya que los patógenos suelen ser ignorados en estos estudios.

10. REFERENCIAS

- Acevedo-Whitehouse, K. (2009). The importance of disease management programmes for wildlife conservation *Animal Conservation*, 12, 185–186.
- Acevedo-Withehouse, K. (2009). The importance of disease management programmes for wildlife conservation. *Animal Conservation*, pp. 185-186.
- Alava, J.J., Ross, P.S., Ikonomidou, M.G., Cruz, M., Jimenez-Uzcátegui, G., Dubetz, C. *et al.* (2011a). DDT in endangered Galapagos sea lions (*Zalophus wollebaeki*). *Mar Pollut Bull*, 62, 660-671.
- Alava, J.J., Salazar, S., Cruz, M., Jiménez-Uzcátegui, G., Villegas-Amtmann, S., Paéz-Rosas, D. *et al.* (2011b). DDT Strikes Back: Galapagos Sea Lions Face Increasing Health Risks *Ambio*, 40, 425-430.
- Altizer, S., Bartel, R. & Han, B.A. (2011). Animal migration and infectious disease risk. *Science*, 331, 296-302.
- Ariza, E.Y., López, C.M., Martínez, O. & Arias, S.A. (2004). Ecoepidemiología: el futuro posible de la epidemiología *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 22, 139-145.
- Basáñez, M.-G. & Rodríguez, D.J. (2004). Dinámica de transmisión y modelos matemáticos en enfermedades transmitidas por vectores *Entomotropica*, 19, 113-134.
- Bolker, B.M., Brooks, M.E., Clark, C.J., Geange, S.W., Poulsen, J.R., Stevens, M.H. *et al.* (2009). Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends Ecol Evol*, 24, 127-135.
- Bradshaw, C.J.A., McMahon, C.R., Miller, P.S., Lacy, R.C., Watts, M.J., Verant, M.L. *et al.* (2012). Novel coupling of individual-based epidemiological and demographic models predicts realistic dynamics of tuberculosis in alien buffalo *Journal of Applied Ecology*, 49, 268–277.
- Brock, P.M. (2012). Immunity, life history and conservation in the Galapagos sea lion In: *Faculty of Biological Sciences*. University of Leeds United Kingdom, p. 202.
- Brock, P.M., Hall, A.J., Goodman, S.J., Cruz, M. & Acevedo-Whitehouse, K. (2013a). Applying the tools of ecological immunology to conservation: a test case in the Galapagos sea lion. *Animal Conservation*, 16, 19-31.
- Brock, P.M., Hall, A.J., Goodman, S.J., Cruz, M. & Acevedo-Whitehouse, K. (2013b). Immune activity, body condition and human-associated environmental impacts in a wild marine mammal. *PLoS One*, 8, e67132.
- Burek, K.A., Gulland, F.M., Sheffield, G., Beckmen, K.B., Keyes, E., Spraker, T.R. *et al.* (2005). Infectious disease and the decline of Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*) in Alaska, USA: insights from serologic data. *J Wildl Dis*, 41, 512-524.
- Calle, P.P., Seagars, D.J., McClave, C., Senne, D., House, C. & House, J.A. (2002). Viral and bacterial serology of free-ranging Pacific walrus. *J Wildl Dis*, 38, 93-100.

- Cleaveland, S., Hess, G.R., Dobson, A.P., Laurenson, M.K., McCallum, H.I., Roberts, M.G. *et al.* (2002). The role of pathogens in biological conservation. In: *The ecology of wildlife diseases* (eds. Hudson, P, Rizzoli, A, Grenfell, b, Heesterbeek, H & Dobson, A). Oxford University Press United States, pp. 139-150.
- Collinge, S.K. & Ray, C. (2006). Community Epidemiology. In: *Disease Ecology: Community structure and pathogen dynamics* (eds. Collinge, SK & Ray, C). Oxford University Press United States, pp. 1-5.
- Corbel, M.J. (1997). Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis*, 3, 213-221.
- Coria-Galindo, E., Rangel-Huerta, E., Verdugo-Rodríguez, A., Brousset, D., Salazar, S. & Padilla-Noriega, L. (2009). Rotavirus infections in Galapagos sea lions. *J Wildl Dis*, 45, 722-728.
- Cunningham, A.A. (2003). Pathogen pollution: Defining a parasitological threat to biodiversity conservation. (eds. Daszak, P & Rodríguez, JP). *Journal Of Parasitology*, pp. 78-83.
- Cunningham, A.A., Dobson, A.P. & Hudson, P.J. (2012). Disease invasion: impacts on biodiversity and human health. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 367, 2804-2806.
- Daszak, P., Cunningham, A.A. & Hyatt, A.D. (2000). Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. *Science*, 287, 443-449.
- Daszak, P., Cunningham, A.A. & Hyatt, A.D. (2001). Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Trop*, 78, 103-116.
- Daszak, P., Tabor, G.M., Kilpatrick, A.M., Epstein, J. & Plowright, R. (2004). Conservation medicine and a new agenda for emerging diseases. *Ann N Y Acad Sci*, 1026, 1-11.
- Dawson, C.E., Perrett, L.L., Stubberfield, E.J., Stack, J.A., Farrelly, S.S., Cooley, W.A. *et al.* (2008a). Isolation and characterization of *Brucella* from the lungworms of a harbor porpoise (*Phocoena phocoena*). *J Wildl Dis*, 44, 237-246.
- Dawson, C.E., Stubberfield, E.J., Perrett, L.L., King, A.C., Whatmore, A.M., Bashiruddin, J.B. *et al.* (2008b). Phenotypic and molecular characterisation of *Brucella* isolates from marine mammals. *BMC Microbiol*, 8, 224.
- Deem, S.L., Karesh, W.B. & Weisman, W. (2000). Theory into practice: Wildlife health in conservation. *Conservation Biology*, pp. 1224-1233.
- Díaz Aparicio, E. (2013). Epidemiology of brucellosis in domestic animals caused by *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Brucella abortus*. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 32(1), 53-60.
- Fariña, J.M., Salazar, S., Wallem, K.P., Witman, J.D. & Ellis, J.C. (2003). Nutrient exchanges between marine and terrestrial ecosystems: the case of the Galapagos sea lion *Zalophus wollebaecki*. *Journal of Animal Ecology*, 72, 873-887.
- Garner, M.M., Lambourn, D.M., Jeffries, S.J., Hall, P.B., Rhyan, J.C., Ewalt, D.R. *et al.* (1997). Evidence of *Brucella* infection in Parafilaroides lungworms in a Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*). *J Vet Diagn Invest*, 9, 298-303.

- Godfroid, J., Cloeckert, A., Liautard, J.P., Kohler, S., Fretin, D., Walravens, K. *et al.* (2005). From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet Res*, 36, 313-326.
- Goenka, R., Guirnalda, P.D., Black, S.J. & Baldwin, C.L. (2012). B Lymphocytes provide an infection niche for intracellular bacterium *Brucella abortus*. *J Infect Dis*, 206, 91-98.
- Grenfell, B.T., Amos, W., Arneberg, P., Bjornstad, O.N., Greenman, J.V., Harwood, J. *et al.* (2002). Visions for future research in wildlife epidemiology. In: *The ecology of wildlife diseases* (eds. Hudson, P, Rizzoli, A, Grenfell, B, Heesterbeek, H & Dobson, A). Oxford University Press United States, pp. 151-166.
- Guzmán-Verri, C., González-Barrientos, R., Hernández-Mora, G., Morales, J.A., Baquero-Calvo, E., Chaves-Olarte, E. *et al.* (2012). *Brucella ceti* and brucellosis in cetaceans. *Front Cell Infect Microbiol*, 2, 3.
- Harvell, C.D., Kim, K., Burkholder, J.M., Colwell, R.R., Epstein, P.R., Grimes, D.J. *et al.* (1999). Emerging marine diseases--climate links and anthropogenic factors. *Science*, 285, 1505-1510.
- Harvell, C.D., Mitchell, C.E., Ward, J.R., Altizer, S., Dobson, A.P., Ostfeld, R.S. *et al.* (2002). Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science*, 296, 2158-2162.
- Hernández-Mora, G., Palacios-Alfaro, J.D. & González-Barrientos, R. (2013). Wildlife reservoirs of brucellosis: *Brucella* in aquatic environments. *Rev Sci Tech*, 32, 89-103.
- Hess, G.R., Randolph, S.E., Arneberg, P., Chemini, C., Furlanello, C., Harwood, J. *et al.* (2002). Spatial aspects of disease dynamics. In: *The ecology of wildlife diseases* (eds. Hudson, P, Rizzoli, A, Grenfell, b, Heesterbeek, H & Dobson, A). Oxford University Press United States, pp. 102-118.
- Hoffmann, M., Hilton-Taylor, C., Angulo, A., Böhm, M., Brooks, T.M., Butchart, S.H. *et al.* (2010). The impact of conservation on the status of the world's vertebrates. *Science*, 330, 1503-1509.
- Holt, R.D. & Dobson, A.P. (2006). Extending the principles of community ecology to address the epidemiology of host-pathogen systems. In: *Disease ecology: community structure and pathogen dynamics* (eds. Collinge, SK & Ray, C). Oxford University Press United States, pp. 6-27.
- IUCN (2013). IUCN Red List of Threatened Species. Available at: www.iucnredlist.org Last accessed **10 December 2013** Version 2013.2. .
- Jefferson, T.A., Webber, M.A. & Pitman, R.L. (2008). *Mammals of the world: a comprehensive guide to their identification*. First edition edn. Elsevier, Canada.
- Jeglinski, J.W.E., Werner, C., Robinson, P.W., Costa, D.P. & Trillmich, F. (2012). Age, body mass and environmental variation shape the foraging ontogeny of Galapagos sea lions *Marine Ecology Progress Series*, 279–296, 279–296.

- Jensen, S.K., Nymo, I.H., Forcada, J., Hall, A. & Godfroid, J. (2013). Brucella antibody seroprevalence in Antarctic seals (*Arctocephalus gazella*, *Leptonychotes weddellii* and *Mirounga leonina*). *Dis Aquat Organ*, 105, 175-181.
- Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L. *et al.* (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451, 990-993.
- Lacy, R.C., Pollak, J.P., Miller, J.P., Hungerford, P.S.L. & Bright, P. (2012). Outbreak version 2.0. . Available at: (<http://www.vortex9.org/outbreak.html>).
- Lynch, M., Duignan, P.J., Taylor, T., Nielsen, O., Kirkwood, R., Gibbens, J. *et al.* (2011a). Epizootiology of Brucella infection in Australian fur seals. *J Wildl Dis*, 47, 352-363.
- Lynch, M., Nielsen, O., Duignan, P.J., Kirkwood, R., Hoskins, A. & Arnould, J.P. (2011b). Serologic survey for potential pathogens and assessment of disease risk in Australian fur seals. *J Wildl Dis*, 47, 555-565.
- Mackereth, G.F., Webb, K.M., O'keefe, J.S., Duignan, P.J. & Kittelberger, R. (2005). Serological survey of pre-weaned New Zealand fur seals (*Arctocephalus forsteri*) for brucellosis and leptospirosis. *N Z Vet J*, 53, 428-432.
- McCallum, H. & Dobson, A. (2002). Disease, habitat fragmentation and conservation. *Proc Biol Sci*, 269, 2041-2049.
- Medina-Vogel, G. (2010). Ecología de enfermedades infecciosas emergentes y conservación de especies silvestres *Archivo Médico Veterinario*, 42, 11-24.
- Meise, K., Krüger, O., Piedrahita, P. & Trillmich, F. (2013). Site fidelity of male Galápagos sea lions: a lifetime perspective. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 67, 1001-1011.
- Mos, L., Morse, B., Jeffries, S.J., Yunker, M.B., Raverty, S., De Guise, S. *et al.* (2006). Chemical and biological pollution contribute to the immunological profiles of free-ranging harbor seals. *Environ Toxicol Chem*, 25, 3110-3117.
- Muñoz, P.M., Marín, C.M., Monreal, D., González, D., Garin-Bastuji, B., Díaz, R. *et al.* (2005). Efficacy of several serological tests and antigens for diagnosis of bovine brucellosis in the presence of false-positive serological results due to *Yersinia enterocolitica* O:9. *Clin Diagn Lab Immunol*, 12, 141-151.
- Nielsen, K.H., Kelly, L., Gall, D., Balsevicius, S., Bosse, J., Nicoletti, P. *et al.* (1996). Comparison of enzyme immunoassays for the diagnosis of bovine brucellosis. *Preventive Veterinary Medicine*, 26, 17-32.
- Nielsen, O., Nielsen, K., Braun, R. & Kelly, L. (2005). A comparison of four serologic assays in screening for Brucella exposure in Hawaiian monk seals. *J Wildl Dis*, 41, 126-133.
- Nielsen, O., Stewart, R.E., Nielsen, K., Measures, L. & Duignan, P. (2001). Serologic survey of Brucella spp. antibodies in some marine mammals of North America. *J Wildl Dis*, 37, 89-100.
- Nymo, I.H. (2013). Brucella pinnipedialis in hooded seals (*Cystophora cristata*): infection biology and effect of PCB 153 exposure under experimental conditions In: *The*

Norwegian School of Veterinary Science, Section for Arctic Veterinary Medicine. Universite de Namur Tromsø, Norway, p. 275.

- Nymo, I.H., das Neves, C.G., Tryland, M., Bårdsen, B.-J., Santos, R.L., Turchetti, A.P. *et al.* (2014). *Brucella pinnipedialis* hooded seal (*Cystophora cristata*) strain in the mouse model with concurrent exposure to PCB 153. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*.
- Nymo, I.H., Tryland, M. & Godfroid, J. (2011). A review of *Brucella* infection in marine mammals, with special emphasis on *Brucella pinnipedialis* in the hooded seal (*Cystophora cristata*). *Vet Res*, 42, 93.
- OMM (2014). Organización Meteorológica Mundial. Available at: http://www.wmo.int/pages/disclaimer/guidelines_es.html 12 March 2014.
- OMS (2014). Organización Mundial de la Salud. Available at: <http://www.who.int/topics/epidemiology/es/> Last accessed **9 de enero del 2014**.
- Poteet, M.F. (2006). Shifting roles of abiotic and biotic regulation of a multi-host parasite following disturbance. In: *Disease ecology: Community structure and pathogen dynamics* (eds. Collinge, SK & Ray, C). Oxford University Press United States, pp. 135-151.
- Pörschmann, U., Trillmich, F., Mueller, B. & Wolf, J.B. (2010). Male reproductive success and its behavioural correlates in a polygynous mammal, the Galápagos sea lion (*Zalophus wollebaeki*). *Mol Ecol*, 19, 2574-2586.
- R Development Core Team, R. (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Reynolds, J.E., Marsh, H. & Ragen, T.J. (2009). Marine mammal conservation. *Endangered Species Research*, 7, 23-28.
- Roberts, M.G., Dobson, A.P., Arneberg, P., de Leo, G.A., Krecek, R.C., Manfredi, M.T. *et al.* (2002). Parasite community ecology and biodiversity. In: *The ecology of wildlife diseases* (eds. Hudson, P, Rizzoli, A, Grenfell, b, Heesterbeek, H & Dobson, A). Oxford University Press United States, pp. 63-82.
- Roe, W.D., Rogers, L.E., Gartrell, B.D., Chilvers, B.L. & Duignan, P.J. (2010). Serologic evaluation of New Zealand sea lions for exposure to *Brucella* and *Leptospira* spp. *J Wildl Dis*, 46, 1295-1299.
- Ryser-Degiorgis, M.P. (2013). Wildlife health investigations: needs, challenges and recommendations. *BMC Vet Res*, 9, 223.
- Schipper, J., Chanson, J.S., Chiozza, F., Cox, N.A., Hoffmann, M., Katariya, V. *et al.* (2008). The status of the world's land and marine mammals: diversity, threat, and knowledge. *Science*, 322, 225-230.
- Schramm, Y., Mesnick, S.L., Rosa, J., Palacios, D.M., Lowry, M.S., Auriolles-Gamboa, D. *et al.* (2009). Phylogeography of California and Galápagos sea lions and population structure within the California sea lion. *Marine Biology*, 156, 1375-1387.

- Skelly, D.K., Bolden, S.R., Holland, M.P., Kealoha Freidenburg, L., Freidenfels, N.A. & Malcolm, T.R. (2006). Urbanization and disease in amphibians. In: *Disease ecology: community structure and pathogen dynamics* (eds. Collinge, SK & Ray, C). Oxford University Press United States, pp. 153-165.
- Smith, K.F., Acevedo-Whitehouse, K. & Pedersen, A.B. (2009). The role of infectious diseases in biological conservation. *Animal Conservation*, 12, 1-12.
- Snell, H.M., Stone, P.A. & Snell, H.L. (1996). A summary of geographical characteristics of the Galapagos Islands. *Journal of Biogeography*, 23, 619-624.
- Switon, J., Woolhouse, M.E.J., Begon, M.E., Dobson, A.P., Ferroglio, E., Grenfell, B.T. *et al.* (2002). Microparasite transmission and persistence. In: *The ecology of wildlife diseases* (eds. Hudson, P, Rizzoli, A, Grenfell, b, Heesterbeek, H & Dobson, A). Oxford University Press United States, pp. 83-101.
- Tompkins, D.M., Dobson, A.P., Arneberg, P., Begon, M.E., Cattadori, I.M., Greenman, J.V. *et al.* (2002). Parasites and host population dynamics. In: *The ecology of wildlife diseases* (eds. Hudson, P, Rizzoli, A, Grenfell, b, Heesterbeek, H & Dobson, A). Oxford University Press United States, pp. 45-62.
- Trillmich, F. & Limberger, D. (1985). Drastic effects of El Niño on Galapagos pinnipeds. *Oecología*, 67, 19-22.
- Trillmich, F., Ono, K., Trillmich, F. & Dellinger, T. (1991). The Effects of El Niño on Galapagos Pinnipeds. In: *Pinnipeds and El Niño*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 66-74.
- Uzal, F.A., Carrasco, A.E., Echaide, S., Nielsen, K. & Robles, C.A. (1995). Evaluation of an indirect ELISA for the diagnosis of bovine brucellosis. *J Vet Diagn Invest*, 7, 473-475.
- Villegas-Amtmann, S., Costa, D.O., Tremblay, Y., Salazar, S. & Auriolles-Gamboa, D. (2008). Multiple foraging strategies in a marine apex predator, the Galapagos sea lion *Zalophus wollebaeki*. *Marine Ecology Progress Series*, 363, 299-309.
- Villegas-Amtmann, S., Simmons, S.E., Kuhn, C.E., Huckstadt, L.A. & Costa, D.P. (2011). Latitudinal range influences the seasonal variation in the foraging behavior of marine top predators. *PLoS One*, 6, e23166.
- Walker, D. (2008). Peripheral Blood Smears. In: *Diagnostic Cytology and hematology of the Dog and Cat* (eds. Cowell, RL, Tyler, RD, Meinkoth, JH & DeNicola, DB). Elsevier Canada, pp. 390-421.
- Winkelstein, A., Sacher, R.A., Kaplan, S.S. & Roberts, G.T. (1998). *White cell manual*. FA Davis Company, United States.
- Wolf, J.B., Harrod, C., Brunner, S., Salazar, S., Trillmich, F. & Tautz, D. (2008). Tracing early stages of species differentiation: ecological, morphological and genetic divergence of Galápagos sea lion populations. *BMC Evol Biol*, 8, 150.
- Wolf, J.B., Tautz, D. & Trillmich, F. (2007). Galápagos and Californian sea lions are separate species: Genetic analysis of the genus *Zalophus* and its implications for conservation management. *Front Zool*, 4, 20.