



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



Caracterización de la carga parasitaria intestinal en ballenas azules del Golfo de California

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

EN

MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA

LAVINIA FLORES CASCANTE

LA PAZ, B.C.S., 25 DE JUNIO DE 2012



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 04 del mes Junio del año 2012
el (la) que suscribe BM. LAVINIA FLORES CASCANTE alumno(a) del
Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS
con número de registro B101405 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS
manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:
DR. DIANE GENDRON LANIEL

y cede los derechos del trabajo titulado:

"CARACTERIZACIÓN DE LA CARGA PARASITARIA INTESTINAL
EN BALLENAS AZULES DEL GOLFO DE CALIFORNIA"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: biol.lcascante@gmail.com - dgendron@ipn.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


BM. LAVINIA FLORES CASCANTE

nombre y firma

DEDICADA A:

Dios, porque provengo de ti, regresare a ti y has hecho mi paso por este planeta lo más sencillo posible, siempre quitando los obstáculos de mi camino y siempre socorriéndome en los momentos difíciles, porque no tengo miedo porque sé que estas ahí para protegerme. Porque nunca, nunca me he sentido alejada de ti.

Mi Madre, Lavinia: te amo inmensamente. Por enseñarme espiritualidad y sencillez, por ser modelo de madre, esposa, ingeniero y mujer. Porque aun en la distancia cada abrazo que me diste me lleno de fuerza para seguir. Por mostrarme el camino correcto y enseñarme a hacer siempre las cosas BIEN. Por todo, Gracias

Mi Padre, Gilberto: no me podría haberme tocado mejor papa que tu, amoroso padre siempre entregado a su familia. Soy lo que soy porque tuve un hogar fuerte y solido y eso fue gracias a ti. Soy bióloga porque me enseñaste el amor a la naturaleza y la importancia de regresarle a la tierra un poco de lo que nos da. Siempre tuviste respuestas para mis preguntas y tú me contagiaste de tantas ganas de Mar. Esto es para ti y por ti, te amo papa, Mua!.

Mi hermana, Claudia: Mi bebe hermosa, no importa cuántos años pasen siempre serás mi bebe, el amor de mis ojos, todos los días me esfuerzo por ser el tipo de hermana que puedas admirar, porque tu potencial, tu ambición y tu empeño en cada cosa que haces es el impulso que me lleva a ser mejor persona cada día para nunca defraudarte, te amo bebe.

A mi tía, Tania Cascante Carrasco, "Vivos se los llevaron, vivos los queremos" y a mi abuelita Malena... ambos grandes seres de luz.

A mis sobrinos: Chachito, Mayoni, Abigail, Zabdiel, Arisbeth, Denabhi, Josh, Leo y Derek. Cada unas de sus sonrisas me roba el corazón. Gracias por su ternura.

**"The first part of knowledge is getting the names right."
(Chinese proverb)**

AGRADECIMIENTOS:

Al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) por permitirme continuar mi formación como profesionista en sus instalaciones. A CONACYT por la beca de posgrado y a PIFI, COFAA, CONABIO Y SOMEMMA (al programa de apoyo a pequeños proyectos) por los apoyos económicos otorgados a lo largo del desarrollo y presentación de esta tesis.

A mi directora de tesis, Dra. Diane Gendron. Usted creyó en mí, nunca perdió su fe y siempre me apoyo aun cuando yo misma desconfiaba de mí capacidad. Su trabajo de campo y de gabinete es impecable, pocos investigadores mantienen después de tantos años las ganas, ánimos y responsabilidad para con el trabajo de investigación. Usted es la definición misma de una Investigadora completa! Y yo la admiro muchísimo por ello, muchas gracias por todo.

A mi comité, el cual no pudo ser mejor elegido: M.C. María del Carmen por poner a mi disposición todos sus conocimientos sobre parásitos, por la paciencia con la cual me mostro mis errores y por permitirme aprender de usted y trabajar en su laboratorio. A la Dra. Karina Acevedo por su apoyo aun a través de la distancia y por sus muy atinadas observaciones en la recta final del manuscrito. Al Dr. Jaime Gómez por sus oportunos comentarios, por la literatura proporcionada y por adoptarme tantas veces como su becaria PIFI, al M.C. Gustavo de la Cruz quien siempre tuvo tiempo de atenderme y explicarme con paciencia cuando llegaba yo de imprevisto llena de dudas estadísticas y al M.C. Felipe Melo quien a pesar de llegar al final de este pequeño proyecto se tomo su valioso tiempo de revisar mi manuscrito. Esta tesis es lo que es Gracias a todos ustedes.

A C.P. Humberto y Cesar del departamento de servicios escolares por su amable ayuda cada vez que había un trámite que hacer y Susana y Cristian del Centro de Cómputo.

La valiosa información adicional a las muestras no hubiera sido posible sin el magistral trabajo de campo y gabinete que se realiza en el Laboratorio de Cetáceos y Quelonios, estoy especialmente agradecida con MC. Azucena Ugalde de la Cruz,

MC. Fabiola Guerrero, MC. Geraldine Busquets, MC. Mario Pardo, Juan Carlos, Mirsha y Marcia, así como Aurora Paniagua, Fernando Elorriaga y José Raúl Morales por sus valiosos comentarios. El trabajo de campo fue apoyado por el capitán Ciro Arista y el técnico Manuel Zamarrón, quienes hicieron la jornada de trabajo muy amena y nos consintieron a bordo. Agradezco al Lab. de Microbiología de CICIMAR, principalmente a la Dra. Claudia Hernández Guerrero por su apoyo en sus instalaciones a cargo, para llevar a cabo los cultivos de huevos de parásito y al laboratorio de parasitología de UABCS a cargo de la M.C. María del Carmen Gómez por la valiosa ayuda en la tinción y transparentación de parásitos. También estoy agradecida con el Técnico Ariel Cruz (CIBNOR) y con la Dra. Jeanette Murillo.

Agradezco a mi familia paceña: Maribel Carrera, Javier Carrera, Surizaray Espinosa y Ofelia Escobar quienes junto con Joao, hicieron que estos 2 años se fueran volando, entre comidas, segundas y tardes de película. Gracias por ser toda una familia para mí, gracias por soportar mis ocurrencias, vergüenzas y mi comilona forma de ser, Ofelia por la Coca Cola, Mary por el mole, por la comida de mama de Sury que hacía sentirme en casa, la ternura de Derek Said (Tiburonsin, Hu! Ha! Ha!) Joao por las risas y Javier por la carrilla. Por todo lo vivido, ustedes son muy valiosos para mí. Gracias por adoptar a esta ballenita extraviada en lugar de comérsela como usualmente hacen los tiburones. Adicionalmente, gracias Joao por ser suertudo roomie que le toco soportarme 2 años, mil gracias por tu paciencia, tu amistad y tu cariño que me ayudo a nunca caer en la mediocridad y de paso a Angie, tu esposa, quien hizo que una solitaria casa de 2, se convirtiera en un hogar de 3 gracias a la magia de Skype. Itzy acabas de llegar pero ya estás aquí, ojala halla mucho más tiempo para ver pelis y chismear.

Estoy especialmente agradecida con mis compañeros de generación de maestría (el cardumen, aunque el nombre nunca me gusto jaja) que hicieron tan llevadera, llena de sabor y enriquecedora esta experiencia. A mi paisano renegado: Andrés Granados. A un siempre feliz Eduardo Álvarez, a una tierna Marcela, a una maternal Mónica y a una divertida Roció. Estoy adicionalmente agradecida con Jatziry Gracian y Fabián Escobar quienes son maravillosas personas, grandes investigadores y

porque siempre se hicieron un espacio para involucrarse en mi tesis. Iván Cruz, ya no pudiste estar en esta etapa final... te extraño y siempre estaré agradecida contigo por hacerme compañía en las clases de zooplancton y hacerme ver que es importante que sea sería con lo que hago. Dios te bendiga donde quiera que estés, se te extraña.

El máximo sacrificio es siempre dejar a la familia, les quede debiendo muchos momentos a mis hermanos y hermanas. Gracias por la paciencia y gran cariño aun a pesar de la distancia a Luis Alberto Mier y Juan Pablo Bouchot porque esta hermandad sigue intacta y sé que siempre puedo contar con ustedes, a Christian Rodríguez, Ángel Flores, Gabriela Merino, Paola Urbano y Dolly Bello, Las (y los) amo muchísimo. Con igual cariño para Teresa Alcaraz, Lizzeth Domínguez, Jacqueline Rodríguez, Miguel Ángel Arzola, José Julián Barrera, Efrén Antonio Guadarrama, Luis e Ivon Ferrer, Rebeca Rodríguez, Yendy Barragán, Marysol Gutiérrez, David Villeda y al último, pero nunca menos importante, Miguel Ángel Reyes Núñez.

Esta tesis nunca se hubiera podido escribir sin la nocturna vela y cuidado de mi persona por parte de Gorda Flores y *Raduka* sp. (Perrita y Gatita, respectivamente) y de Sheldon, mi difunto gatito negro, quien nos hacia compañía en esas largas noches de estudio de Oceanografía Biológica. Gracias mascotas por hacernos felices.

La revisión de bibliografía de esta tesis conto con el apoyo de muchas personas, estoy muy agradecida especialmente con Murray Dailey (thanks so much for each one of your answers to my questions and for the book that you sent me, your work in parasitology in marine mammals inspired me in the construction of this thesis), Francisco Javier Aznar (Gracias por facilitarme sus valiosos manuscritos), Luis Fleischer Lena Measures, Denise McDonell, Igor Bondarenko, Cristina Lockyer, David Gibson, David Marcogliese, Robert Poulin, Karl W. Flessa, Julian Andrejuk, Andreas Beineke, Maria Paola Maurelli, Simone Sommer, Andrew MacIntosh y Jorge Montor, I thank them for taking the time to answer my emails and send me information and papers sometimes, even, by conventional mail.

CONTENIDO

GLOSARIO	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABLAS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- ANTECEDENTES:	2
2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PARÁSITOS HELMINTOS	2
2.1.1 <i>Platelmintos</i>	2
2.1.2 <i>Nemátodos</i>	3
2.1.3 <i>Acantocéfalos</i>	3
2.2 RELACIONES ENTRE PARÁSITOS Y MAMÍFEROS MARINOS	4
2.3 PARÁSITOS Y PATOLOGÍAS COMUNES EN CETÁCEOS:	4
2.4 CONOCIMIENTO SOBRE PARÁSITOS EN BALLENA AZUL:	5
2.5 EL ESTUDIO CUANTITATIVO DE LAS CARGAS PARASITARIAS EN CETÁCEOS	6
3.- JUSTIFICACIÓN	7
4.- OBJETIVOS	7
4.1 OBJETIVO GENERAL:	7
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES:	7
METODOLOGÍA	8
5.1 POBLACIÓN Y AREA DE ESTUDIO:	8
5.2 TRABAJO DE CAMPO:	9
5.3 TRABAJO DE LABORATORIO	9
5.4 TRABAJO DE GABINETE	14
6.- RESULTADOS	16
6.1 PREVALENCIA DE PARÁSITOS ADULTOS EN LAS MUESTRAS	16
6.1.1 <i>Efecto del método de conservación en la ocurrencia de parásitos adultos</i>	16
6.1.2 <i>Prevalencia de principales grupos de helmintos</i>	16
6.2 INTENSIDAD MEDIA PARASITARIA EN HUEVOS POR GRAMO DE HECES (HPG)	17
6.2.1 <i>Visualización de los huevos</i>	17
6.2.2 <i>Estandarización de técnica McMaster</i>	18

6.2.3 <i>Intensidad Media Parasitaria</i>	18
6.3 IDENTIFICACIÓN PARASITARIA AL MENOR NIVEL TAXONÓMICO POSIBLE	20
6.3.1. <i>Identificación de Larvas</i>	20
6.3.2 <i>Identificación de huevos de helmintos</i>	21
6.3.3 <i>Identificación de parásitos adultos</i>	23
6.4. RELACIONAR LA CARGA PARASITARIA CON EL SEXO Y CATEGORÍA DE EDAD DE LOS INDIVIDUOS Y EL ESTADO REPRODUCTIVO DE LAS HEMBRAS.	25
6.4.1 <i>Sexo y estado reproductivo de las hembras</i>	25
6.4.2 <i>Categoría de edad</i>	26
6.4.3 <i>Individuos con intensidades parasitarias altas (wormy animals)</i>	26
7.- DISCUSIONES	28
7.1 PREVALENCIA	28
7.2 INTENSIDAD MEDIA PARASITARIA	30
7.3 IDENTIFICACIÓN PARASITARIA	32
7.4 RELACIONAR LA CARGA PARASITARIA CON EL SEXO Y LA CATEGORIA DE EDAD DE LOS INDIVIDUOS Y EL ESTADO REPRODUCTIVO DE LAS HEMBRAS.....	36
8.- CONCLUSIONES.....	40
9.- RECOMENDACIONES	40
10.- BIBLIOGRAFÍA.....	41
ANEXO I	55
ANEXO II	55
ANEXO III	58
ANEXO IV.....	61

GLOSARIO

CARGA PARASITARIA: Término usual en medicina humana y veterinaria, para evaluar la intensidad de infección de algunos helmintos y algunos protozoarios en materia fecal, sangre y orina. La cuenta de huevos por gramo de heces ofrece datos aproximados de la carga parasitaria pero no debe considerarse como el total de parásitos “hospedados” presentes (Cruz-Reyes y Camargo-Camargo, 2001).

COLONIZACIÓN: Proceso ecológico que ocurre cuando un parásito es puesto en contacto con nuevos hospederos en condición de ofrecer supervivencia y reproducción al parásito. La colonización se vuelve más factible cuando la fuente de infección (alimento) y el hospedero son filogenéticamente cercanos y las oportunidades aumentan cuando el contacto entre el parásito y el hospedero es a largo plazo (Aznar *et al.*, 2001).

CORACIDIO: Estadio larvario de vida libre entre huevo y procercoide de algunos céstodos. Larva con epitelio ciliado (Cruz-Reyes y Camargo-Camargo, 2001).

GLÁNDULAS DE CEMENTO: Las glándulas de cemento son órganos accesorios importantes. Producen y almacenan “cemento” una sustancia que ayuda a bloquear el canal genital después de la cópula y lo mantiene cerrado hasta la liberación de los huevos embrionados (Mehlhorn, 2008).

GRANULOMAS: Este término describe el proceso en el cual las células de defensa (macrófagos) del hospedero rodean algún estadio parasitario (Mehlhorn, 2008).

HOSPEDERO FINAL: Hospedero en el cual el parásito alcanza la madurez sexual y se reproduce (Mehlhorn, 2008).

HOSPEDERO INTERMEDIARIO: Hospedero en el cual el parásito experimenta algún tipo de desarrollo pero no alcanza la madurez sexual (Mehlhorn, 2008).

INFECCIÓN PARASITARIA: Momento de introducción/invasión/transmisión de un parásito el cual se reproduce dentro del hospedero (Mehlhorn, 2008).

INTENSIDAD MEDIA: Suma total de los parásitos de una misma especie dividido entre el número de hospederos parasitados (Bush *et al.*, 1997).

INTENSIDAD: Número de parásitos de una especie en particular en un hospedero (Bush *et al.*, 1997).

NEUROPATÍA: Daño en nervios craneales y sistema nervioso periférico (Morimitsu *et al.*, 2008).

PARÁSITO: Es un animal que vive completamente a expensas de plantas, animales o humanos (Mehlhorn, 2008).

PREVALENCIA: Es el número de hospederos infectados con uno o más individuos de una especie de parásitos dividido entre el número de hospederos examinados (Bush *et al.*, 1997).

“WORMY ANIMALS”: Son la fracción de los individuos parasitados que concentran las mayores cargas parasitarias con manifestación de síntomas clínicos y por ende un deterioro de sus capacidades productivas (Morales *et al.*, 1998).

ZONOSIS: Infecciones e infestaciones que se transmiten de forma natural entre humanos y animales domésticos o silvestres (Cruz-Reyes y Camargo-Camargo, 2001).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Área de estudio ubicada en el suroeste del Golfo de California.....	8
Figura 2: Representación de la Cámara McMaster de Chalex Corp.	10
Figura 3: Observación de los huevos de helmintos usando la cámara McMaster.....	11
Figura 4: Aparato de Baermann	13
Figura 5: Modificación de Baermann.....	13
Figura 6: Estructuras parasitarias encontradas mediante tamizado en heces	16
Figura 7: Visualización de los huevos de helmintos	17
Figura 8: Cargas parasitarias por individuo de ballena azul foto-identificado.....	18
Figura 9: Huevos por gramo de heces entre años y periodos estudiados.....	19
Figura 10: Larvas obtenidas en cultivos y coracidio de <i>Diplogonoporus</i> sp.	21
Figura 11: Fotografía del huevo identificado como <i>Crassicauda</i> sp.	21
Figura 12: Fotografía del coracidio identificado como <i>Diplogonoporus</i> sp.	22
Figura 13: Huevo con posibles características de <i>Bolbosoma</i> sp. y <i>Anisakis</i> sp.....	22
Figura 14: Posible huevos no identificado.....	23
Figura 15: Parásito adulto clasificado como <i>Bolbosoma</i> sp..	24
Figura 16: Tinción y transparentación de <i>Bolbosoma</i> sp.	25

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Número de muestras totales por análisis	9
Tabla 2: Prevalencia de helmintos por grupo de similitudes morfológicas	17
Tabla 3: Intensidad media en algunos individuos muestreados varias veces.	19
Tabla 4: Conteos de larvas de helmintos	20
Tabla 5: Promedios de conteos de larvas usando la técnica de Baermann	20
Tabla 6: Intensidad media y número de muestras por categorías de edad.....	26
Tabla 7: Descripción de los individuos altamente parasitados	27

RESUMEN

El monitoreo de la salud de los cetáceos de vida silvestre es un tema difícil de abordar debido a la complejidad del muestreo de los individuos. Los trabajos sobre parasitología intestinal en ballenas barbadas se basaron únicamente en animales varados o cazados. La falta de información sobre parásitos gastrointestinales en poblaciones de misticetos silvestres impide que se aborden preguntas relevantes sobre la ecología parasitaria como la variación en la intensidad de parasitismo entre sexo y categoría de edad de los individuos. El objetivo de este trabajo es caracterizar la carga parasitaria intestinal de individuos de ballena azul que visitan el Golfo de California con el fin de contribuir al monitoreo asociado a la salud de esta población. El trabajo se basó en la presencia de parásitos adultos, huevos o larvas en 82 muestras de heces recolectadas y asociadas a individuos conocidos del catálogo de foto-identificación de ballena azul del CICIMAR-IPN. Se estimó la prevalencia mediante la obtención de parásitos adultos a partir del tamizado de las muestras. La intensidad de parasitismo se estimó mediante conteos de huevos por gramo de heces (HPG) usando el método McMaster adaptado a ballena azul. La identificación parasitaria se realizó mediante el uso de claves taxonómicas especializadas, tinciones, transparentación y microscopía electrónica de barrido. La prevalencia parasitaria fue de 27% y la intensidad media fue de 438 ± 328 (HPG) con un intervalo de 100 a 1400 en los individuos muestreados. No hubo diferencias significativas entre años de muestreo, sexo o categoría de edad. Las intensidades medias fueron 631 HPG para hembras lactantes, 414 HPG para hembras en reposo y 525 HPG para machos. Se identificó al acantocéfalo *Bolbosoma* sp. con una prevalencia de 14.6%, *Crassicauda* sp., *Diplogonoporus* sp. y posiblemente *Anisakis* sp. Esta es la primera identificación parasitaria a nivel género para la ballena azul que visita el Golfo de California y el primer registro de *Diplogonoporus* sp. para la población del Pacífico Noreste. Este trabajo aporta exitosamente un nuevo parámetro útil en el monitoreo de la salud de las poblaciones de ballena azul.

ABSTRACT

Monitoring wild cetacean's health is difficult to achieve due the complexity of sampling individuals. Previous researches on intestinal parasitology in baleen whales are only based on hunted and stranded animals. Such lack of information on baleen whale's gastrointestinal parasites restricts our understanding on the parasite ecology that is relevant for free ranging mysticete populations such as the variation in parasitism load associated with the sex and age category of individuals. The focus of this work is to characterize the intestinal parasite load in individual blue whales that visit the Gulf of California to contribute to the health monitoring of this population. This work is based on the presence of adult parasites, egg and larvae from 82 feces samples linked to known individuals from the CICIMAR blue whale photo-identification catalogue. A prevalence of parasites was estimated from adult worms found in the samples. Intensity parasitism was estimated by counting egg per gram of feces (EPG) using the McMaster technique adapted to the blue whale. The parasite identification was made using specialized taxonomic keys, by staining and soft tissue transparentation of organisms and electronic scanning microscopy. The helminth prevalence was 27% and the mean intensity was estimated in 438 ± 328 (EPG) with a range of 100 – 1400 for the sampled individuals. No statistic difference was found between years, sex or age category. Mean intensity for lactating females was 631 EPG, 414 EPG for resting females and 525 EPG for males. We identified an acanthocephalan, *Bolbosoma* sp. with 14.6% of prevalence, and *Crassicauda* sp., *Diplogonoporus* sp, and possibly *Anisakis* sp. This is the first parasite identification at the genus level for the blue whale that visits the Gulf of California and is the first report of *Diplogonoporus* sp. for the Eastern North Pacific population. This work successfully provides a new parameter useful in monitoring the health of blue whale populations.

1.- INTRODUCCIÓN

Los estudios sobre la salud de cetáceos de vida libre son particularmente difíciles de realizarse (Palacios *et al.*, 2004). El monitoreo continuo de sus poblaciones es complicado debido al extenso hábitat que ocupan, sus dimensiones corporales y al estatus de protección especial al que están sujetos, por lo cual la mayoría de los muestreos se hacen de manera no-invasiva y oportuna (Parsons *et al.*, 2003; Guerrero-Ruiz *et al.*, 2006).

Se han registrado numerosas especies de parásitos en cetáceos, particularmente en animales cazados (Delyamure, 1955; Skrjabin, 1959) y varados (Gibson, 1979; Dailey y Vogelbein, 1991; Dailey *et al.*, 2000; Aguilar-Aguilar *et al.*, 2002; Vlasman y Campbell, 2003; Pinto *et al.*, 2004), siendo las familias Diphyllbothriidae, Campulidae, Anisakidae y Polymorphidae las más frecuentes (Aznar *et al.*, 2001).

En el caso particular de la ballena azul, *Balaenoptera musculus* Linnaeus, 1758, existen pocos trabajos que describan la fauna parasitaria a nivel de género y la información es cualitativa, poco actualizada, con pocos datos cuantitativos (mayormente de prevalencia) y no registrados sistemáticamente (Jagerskiold, 1891; Margolis y Dailey, 1972; Measures, 1992, 1993).

Si bien en la ballena azul no se han registrado muertes causadas por helmintos, es posible que algunos cambios ecológicos, estacionales o ambientales pueden alterar el sistema inmunológico y la equilibrada relación parásito-hospedero provocando así la enfermedad y potencialmente comprometiendo su supervivencia (Kutz *et al.*, 2005). Un ejemplo es la transmisión de *Toxoplasma gondii* de felinos a varios cetáceos debido a las descargas de agua contaminada (Jones y Dubey, 2010).

Recientemente se inició un estudio sobre presencia e identificación de parásitos intestinales en la población de ballena azul del Golfo de California con base en análisis escatológicos (Rocha-Gosselin, 2009) donde se registro la presencia de tres familias de parásitos helmintos (Diphyllbothriidae, Polymorphidae y Anisakidae) de manera cualitativa, por lo cual el presente trabajo pretende caracterizar la carga parasitaria en individuos de ballena azul que visitan el Golfo de California diseñando

una metodología que permita obtener datos cuantitativos con el fin de hacer posible el monitoreo a largo plazo de la salud de esta población e identificar potenciales cambios en el futuro.

2.- ANTECEDENTES:

2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PARÁSITOS HELMINTOS

Los parásitos representan un grupo diverso de organismos que viven en un solo e identificable hábitat. Su estilo de vida ha sido adoptado por muchos seres vivos (Behnke, 1990). El parasitismo es considerado la forma más común de simbiosis entre animales, siendo una relación en la cual el parásito vive a expensas de su hospedero sin que este se beneficie con su presencia (Mehlhorn, 2008), siendo la nutrición el principal beneficio para el parásito en su relación con el hospedador. Los parásitos normalmente no matan a su hospedero, ya que en la mayoría de los casos, la muerte del hospedador podría ser la suya propia (Ruppert y Barnes, 1996), así mismo, la definición de “helminto” no tiene fundamento taxonómico, sin embargo, es usada comúnmente para agrupar a platelmintos, acantocéfalos y nemátodos (Gosling, 2005).

2.1.1 *Platelmintos*

Este filo incluye a gusanos aplanados dorsoventralmente y que tienen simetría bilateral (Mehlhorn, 2008). Son considerados el grupo más primitivo debido a atributos tales como ausencia de sistema circulatorio, el uso de cilios en su estado larval y la presencia de protonefridios (organelos de excreción). Dentro de este grupo existen dos clases, Trematoda a la que pertenecen las duelas y fasciolas y Cestoda que abarca a las conocidas como tenias y solitarias (Ruppert y Barnes, 1996; Mehlhorn, 2008).

Los tremátodos adultos son parásitos externos e internos de los invertebrados y vertebrados. Están menos modificados, a partir de la condición turbelaria ancestral, que los céstodos. Su cuerpo ovalado o alargado está aplanado y cuenta con una ventosa u otros órganos de fijación en la superficie ventral. Tienen intestino y en algunas especies la boca anterior está asociada con una segunda ventosa. Los tremátodos son hermafroditas y sus aparatos reproductores están adaptados para la

cópula, la fecundación interna, el desarrollo de vitelo ectolécito (el vitelo se forma en células especializadas externas al ovocito) y la formación de cascarones para sus huevecillos (Ruppert y Barnes, 1996; Mehlhorn, 2008).

Los céstodos o tenias son parásitos intestinales de los vertebrados. Son estructuralmente más especializados que los tremátodos, su cuerpo consta de un escólex dotado de órganos de sujeción, una región denominada cuello y un estróbilo, que está formado por una cadena de segmentos (proglotideos) producidos por gemación a partir del cuello. No tienen intestino y su aparato reproductor (semejante al de los tremátodos) se repite en cada segmento. Su ciclo de vida tiene una larva oncósfera y necesita de uno o varios hospederos intermediarios (Ruppert y Barnes, 1996; Mehlhorn, 2008).

2.1.2 Nemátodos

Los nemátodos tienen largos cuerpos cilíndricos aguzados en los extremos están adaptados para vivir en espacios diminutos. Los músculos longitudinales de la pared del cuerpo, la compleja cutícula elástica y la presión hidrostática del líquido del pseudoceloma hacen posibles los movimientos ondulatorios que impulsan a los nemátodos a través de los espacios intersticiales. Exhiben una amplia gama de hábitos alimenticios en los cuales ocupan su faringe muscular para la ingestión. Los carnívoros o herbívoros suelen presentar dientes o un estilete. Los nemátodos muestran una amplia gama de estrategias y sus ciclos de vida presentan enormes variaciones (Ruppert y Barnes, 1996; Mehlhorn, 2008).

2.1.3 Acantocéfalos

Los acantocéfalos son parásitos intestinales de vertebrados acuáticos y terrestres. El parásito de cuerpo alargado se engancha a las paredes del intestino mediante una probóscide anterior retráctil armada con “ganchos” o “espinas” recurvadas. No presentan aparato digestivo y el alimento es absorbido a través de la compleja pared del cuerpo. En su ciclo de vida necesitan de un hospedero intermediario, que puede ser un crustáceo o un insecto (Ruppert y Barnes, 1996).

2.2 RELACIONES ENTRE PARÁSITOS Y MAMÍFEROS MARINOS

Los mamíferos marinos son frecuentemente hospederos finales de muchos tipos de parásitos, posiblemente su dieta carnívora (en la mayoría de los casos) ha favorecido la transferencia de parásitos entre los hospederos (Aznar *et al.*, 2001).

Representantes de los nemátodos, platelmintos y acantocéfalos son comunes en casi todos los mamíferos marinos (Dailey y Stroud, 1978; Dailey y Vogelbein, 1991; Gibson *et al.*, 1998; Mignucci-Giannoni *et al.*, 1998). Si bien algunos parásitos son comunes y tolerados en su hospedero bajo cierta intensidad, otros pueden causar severas enfermedades e incluso muerte en su hospedero (Gosling, 2005).

Los céstodos utilizan sus ventosas en el escólex para sujetarse a la mucosa intestinal de los cetáceos donde pueden competir por el alimento de su hospedero y causar obstrucción física del paso de la comida (Vlasman y Campbell, 2003). Los nemátodos son muy comunes en el estómago y tracto intestinal pero se pueden encontrar también en senos nasales y craneales así como en canales auditivos (Vlasman y Campbell, 2003). Los acantocéfalos se encuentran en el intestino de toda clase de vertebrados en los cuales producen pequeñas úlceras en el punto donde se adhieren (Vlasman y Campbell, 2003; Gosling, 2005). Los tremátodos parasitan vertebrados y causan infección en casi todos los sistemas del organismo hospedero (Gosling, 2005).

2.3 PARÁSITOS Y PATOLOGÍAS COMUNES EN CETÁCEOS:

La relación entre un organismo parasitado y el estado de su sistema inmunológico es sumamente complicada (Behnke, 1990). En el Mediterráneo se estima que el 25% de las muertes de los cetáceos son causadas por parásitos (Dhermain, 2004). Estos pueden causar debilitamiento o enfermedad (Gibson *et al.*, 1998). Se han encontrado altas cargas de parásitos en diversas partes del cuerpo de cetáceos varados, aunque en muchos casos nunca se determina si la parasitosis fue la causa principal de la muerte (Dailey y Walker, 1978; Morales-Vela y Olivera-Gómez, 1993). También se ha sugerido que el parasitismo puede ser un factor relevante en varamientos individuales (varamientos de un solo organismo) de odontocetos, debido a la presencia de tremátodos en oídos, senos nasales (Dailey y Walker, 1978) y cavidad

timpánica por la que los parásitos se propagan hacia el octavo nervio craneal, ocasionando neuropatía (Morimitsu *et al.*, 1987). Aunado a lo anterior, un aumento en la carga parasitaria pudiera ser una indicación de una deficiencia en el sistema inmunológico (Beineke *et al.*, 2010).

La mayor parte de los registros sobre parásitos en cetáceos en el mundo provienen de varamientos individuales y en masa en lugares que cuentan con redes activas de atención a varamientos y protocolos para el análisis de las causas de mortalidad (Dailey y Stroud, 1978; Morimitsu *et al.*, 1987; Dailey y Vogelbein, 1991; Chiluíza *et al.*, 1998; Gibson *et al.*, 1998; Mignucci-Giannoni *et al.*, 1998; Dailey *et al.*, 2000; Magalhães-Pinto *et al.*, 2004; Galletti-Vernazzani y Cabrera, 2005; Ortega-Martín *et al.*, 2009). Hasta ahora se ha registrado un solo caso de muerte de balenopteridos probablemente ocasionado por una infección helmíntica que generó granulomas en el tejido infectado y condujo a insuficiencia cardiaca (Mazzariol *et al.*, 2006).

2.4 CONOCIMIENTO SOBRE PARÁSITOS EN BALLENA AZUL:

Se han registrado parásitos platelmintos, acantocéfalos y nemátodos en ballena azul varadas y de animales capturados para investigación científica (Nishiwaki y Hayashi, 1950; Measures, 1992). Los géneros de parásitos registrados hasta ahora son los céstodos *Diplogonoporus*, *Priapocephalus*, *Tetrabothrim* y *Ogmogaster*, el acantocéfalo *Bolbosoma* y los nemátodos *Anisakis*, *Crassicauda*, y *Pseudoterranova* (Jagerskiold, 1891; Delyamure, 1955; Skrjabin, 1959; Rice, 1963; Margolis y Dailey, 1972; Rice, 1978; Gibson y Harris, 1979; Measures, 1992). En el Golfo de California, el único estudio hasta la fecha, reportada de manera cualitativa la presencia de parásitos de las familias Diphyllbothriidae, Polymorphiidae y Anisakidae en heces de ballena azul colectada en el Golfo de California (Rocha-Gosselin, 2009).

La ballena azul ha sido tradicionalmente considerada como zooplanctófaga y puede ingerir casi el 4% de su peso corporal de krill por día durante la época de alimentación (Lockyer, 1981). Algunos peces también se alimentan de aglomeraciones de krill por lo que no es sorprendente que las ballenas azules pueden ingerir algunos de estos peces durante su alimentación, lo cual explicaría la presencia frecuente de *Pseudoterranova* sp. y *Diplogonoporus balaenopterae*,

parásitos que también utilizan peces como hospederos intermedios (Measures, 1993). Un estudio reciente de alimentación de ballena azul del Golfo de California basado en la escatología molecular demuestra la importancia de peces mictófidios como parte de su dieta (Jiménez-Pinedo, 2010).

2.5 EL ESTUDIO CUANTITATIVO DE LAS CARGAS PARASITARIAS EN CETÁCEOS

En la parasitología tradicional existen dos formas de cuantificar una infección parasitaria en una población: la prevalencia, que consiste de datos cualitativos de presencia-ausencia de especies de helmintos en los hospederos y la Intensidad media con la cual se puede cuantificar una infección mediante el conteo total de parásitos en los hospederos dividido entre el número de hospederos parasitados (Bush *et al.*, 1997; Rozsa *et al.*, 2000). En cetáceos solo se ha estimado la prevalencia en organismos varados o cazados (Lonita *et al.*, 2008). La carga parasitaria de los individuos pudiera variar en función del hábito migratorio de los cetáceos los cuales utilizan diferentes hábitats que puede contribuir en adquirir una gran diversidad y abundancia de helmintos (Aznar *et al.*, 1997), también es posible que existan diferencias entre las cargas parasitarias de juveniles y adultos por cantidad y calidad de alimento consumido.

La carga parasitaria se define como el número de parásitos (en este caso, helmintos) que albergan los hospedadores (Habela *et al.*, 2002). Al ser imposible estimar el número total de helmintos en un organismo vivo, éste se puede inferir utilizando la metodología de conteo de huevos por gramo de heces (HPG o EPG por sus siglas en inglés) utilizando la Cámara McMaster (Taranto *et al.*, 2000). Esta metodología es considerada como una estimación de la intensidad de una infección parasitaria (Mehlhorn, 2008), estimando la carga parasitaria a partir de conteo de huevos por gramo de heces (Gibbons *et al.*, 2010). El fundamento se basa en el conteo de huevos en las cámaras y la estimación se basa en la dilución de una cantidad determinada de heces en una solución de flotabilidad, tras lo cual al llevarse a la cámara permite contar los huevos que flotan (Gibbons *et al.*, 2010). Aun existiendo otras opciones en el mercado de instrumental para el conteo de huevos de parásitos (Cringoli *et al.*, 2010) la cámara McMaster tiene un uso relativamente simple con

resultados ampliamente aceptados a un bajo costo (Dunn y Keymer, 1986; Mes, 2003; Cringoli *et al.*, 2004).

3.- JUSTIFICACIÓN

Los Balaenoptéridos ocupan el nivel trófico ápice, sin embargo su señal trófica es baja debido a las presas que consume, cualquier disturbio en la cadena trófica se ve rápidamente reflejado en ellos, por lo cual son indicadores como población de lo que está sucediendo en su medio natural (Bowen, 1997; Pauly *et al.*, 1998; Trites, 2001).

Muchos estudios parasitarios en ganado y especies exóticas (Krief *et al.*, 2005; Schad *et al.*, 2005; Morales *et al.*, 2006) utilizan las muestras fecales para obtener una aproximación parasitaria sobre animales vivos por lo cual se predice que las técnicas cuantitativas utilizadas por la veterinaria tradicional son aplicables al estudio de la ballena azul. También, se hipotetiza que debido a diferencias fisiológicas y ecológicas, la carga parasitaria podría variar entre sexos, categorías de edad o estado reproductivo de las hembras. La obtención de datos cuantitativos sobre la composición de la carga parasitaria junto con una mejor identificación de los ejemplares permitirá obtener la línea base de un parámetro (huevos por gramo de heces) para un monitoreo a largo plazo como una aproximación más fiable al estimar el estado de salud de la población.

4.- OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL:

- Caracterizar la carga parasitaria intestinal en individuos de ballena azul del Golfo de California.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar la prevalencia parasitaria basada en la presencia de parásitos adultos en las muestras
- Cuantificar la intensidad media en huevos por gramo de heces
- Identificar la carga parasitaria al menor nivel taxonómico posible
- Relacionar la carga parasitaria con el sexo y categoría de edad de los individuos y el estado reproductivo de las hembras.

METODOLOGÍA

5.1 POBLACIÓN Y AREA DE ESTUDIO:

El muestreo proviene de una porción de la población de ballenas azules del Pacífico Noreste que visitan el Golfo de California para actividades de alimentación, crianza y reproducción (Gendron, 2002). Las muestras de heces se obtuvieron durante muestreos realizados de Enero a Mayo de cada año desde 1996 al 2011 en el área entre las ciudades de Loreto y La Paz ubicados en el suroeste del Golfo de California (Fig. 1). El Golfo de California se considera un mar marginal de gran importancia por ser la única cuenca de evaporación del Océano Pacífico y caracterizada por su alta productividad biológica dada por sus peculiares características hidrográficas y climáticas (Roden, 1958).

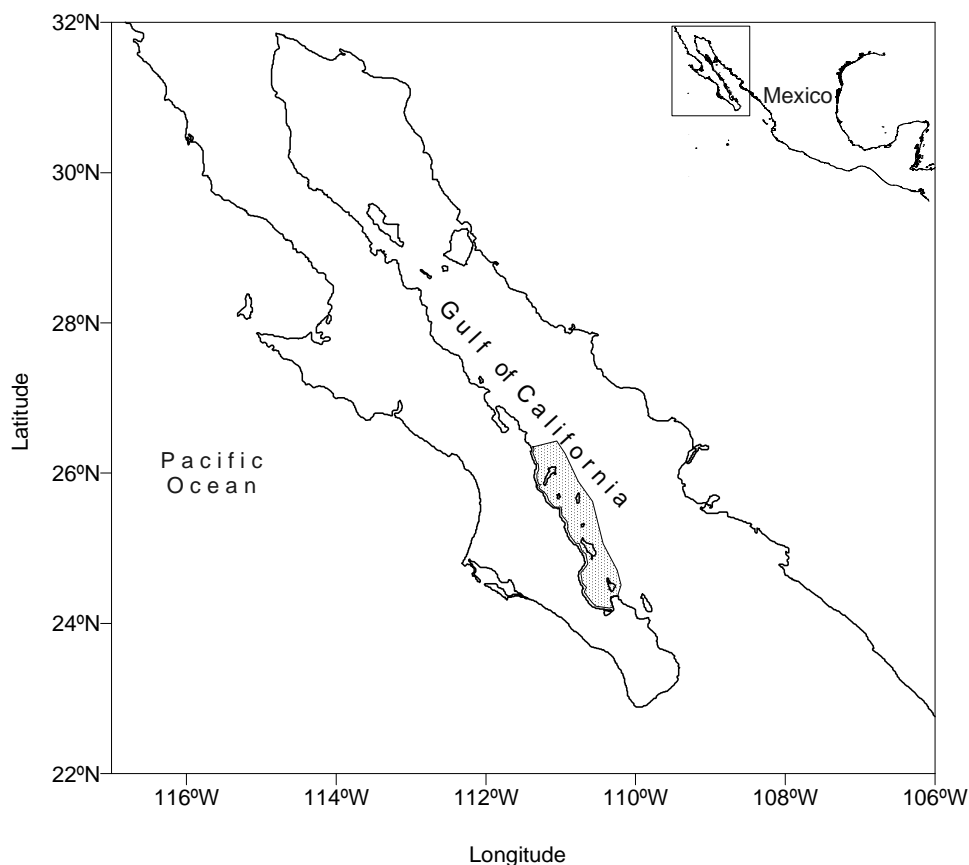


Figura 1: Área de estudio ubicada en el suroeste del Golfo de California (área sombreada). (Tomado de Gendron y Ugalde de la Cruz, 2012)

5.2 TRABAJO DE CAMPO:

Las salidas al campo se realizaron con base en el protocolo del Laboratorio de Cetáceos y Quelonios del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR) del IPN a bordo de embarcaciones menores. Durante un avistamiento de ballena azul se tomaron fotografías de identificación (Gendron y Ugalde de la Cruz, 2012) y ubicación geográfica utilizando un GPS; en caso de excretar, se tomó la muestra y se conservó por alícuotas en alcohol etílico al 96%, en formol amortiguado al 5% y fresca en una bolsa estéril a temperatura ambiente.

5.3 TRABAJO DE LABORATORIO

Debido a que los parásitos que hospedan los grandes cetáceos viven en el intestino o estómago de éstos, tiende a ser mayor la proporción de larvas y huevos que de parásitos adultos en heces; esto se debe a que los adultos están fuertemente aferrados a las paredes del intestino o mucosa estomacal. La metodología que proponemos saca provecho de la presencia de cualquiera de los tres estadios anteriores. El total de muestras preservadas en alcohol etílico o formol a diferentes concentraciones fue de 82 (Tab. 1). El número de muestras y el proceso fue diferente para los objetivos de esta tesis 1) Prevalencia, 2) Intensidad media e 3) Identificación parasitaria, esto debido a que algunas muestras se agotaron al momento de procesarlas para prevalencia.

Tabla 1: Número de muestras totales por análisis

Año	Intensidad	Prevalencia e identificación
1996	1	1
1999	1	3
2000	2	3
2001	5	7
2002	3	4
2007	10	12
2008	11	11
2009	24	27
2010	7	8
2011	6	6
Total	70	82

Prevalencia. Se utilizaron 82 muestras de 1996 a 2011 de las cuales, 18 pertenecen al periodo 1996-2002 y 64 del 2007-2011. Las muestras se filtraron por una serie de tamices de 5mm, 2mm, 1mm, 500 μm y 106 μm . Los parásitos retenidos en los tamices se pusieron en viales con alcohol al 96% para su posterior revisión al microscopio estereoscópico e identificación taxonómica.

Intensidad media parasitaria. Después del procesamiento de las muestras para prevalencia, solo 70 muestras de 1996 a 2011 se pudieron utilizar para intensidad media. Se adaptó la técnica McMaster, utilizando la cámara de conteo McMaster (Flores-Cascante y Gendron, en prensa) (Fig. 2) que fue diseñada para la estimación cuantitativa del número de huevos de parásitos por gramo de heces (HPG) en cabras, ovejas y ganado bovino (Mehlhorn, 2008) (Ver anexo V para metodología detallada de la adaptación al estudio de cetáceos)

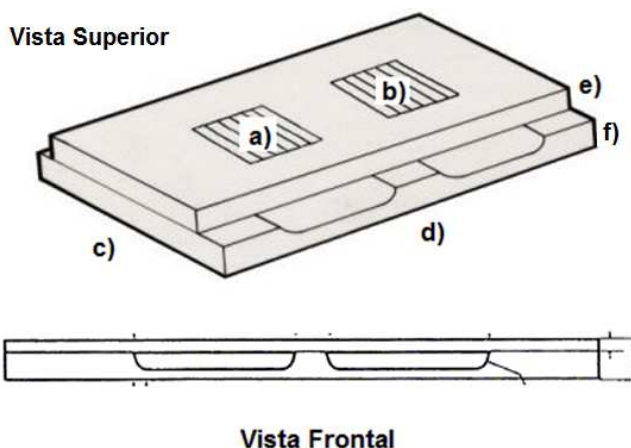


Figura 2: Cámara McMaster de Chalex Corp. a) y b) rejillas de conteo con capacidad de 0.15ml. c) ancho de 2.5 cm. d) largo de 7.5 cm. e) grosor de 1mm de la parte superior y f) grosor de 2mm de parte inferior. Imagen de Chalex Corp, 2012.

Para determinar el tamaño adecuado de muestra se realizó un experimento utilizando 1, 0.5 y 0.3 gramos de heces secas (secadas previamente por 24 horas a temperatura ambiente) de una muestra con el fin de estandarizar la técnica, debido a que se infiere es que entre más grande es la especie a estudiar menor es el tamaño de muestra a utilizar (McDonell, Comm. Pers.¹). No existieron diferencias significativas entre tamaños de muestras (ANOVA, $\Omega=0.10$, $df=2$, $p=0.089$). En

¹ Técnico Parasitólogo, Laboratorio McMaster, Universidad de Sydney.

algunas muestras no se alcanzó a aislar un gramo completo por lo cual se decidió utilizar 0.5 gramos, lo que permitió una lectura limpia en las cámara McMaster y ampliar el número de muestras a utilizar. Los conteos fueron hechos por duplicado utilizando heces conservadas en alcohol etílico (50%, 70% y 96%) y formol (5% y 10%), ya que no se encontró diferencias significativas entre el tipo de preservación (Kruskal Wallis, $\chi^2=5.9$, $p=0.201$). Se probaron dos soluciones de flotación: (1) Sulfato de Zinc con una gravedad específica (GE) de 1.20 y (2) Solución modificada de Sheather con una GE de 1.27 (David y Lindquist, 1982). Se tomaron 0.5 gramos de muestra seca de heces de ballena azul y se mezclaron con 14.5 ml de la solución de flotabilidad, se agitó vigorosamente y con un pipeta Pasteur se rellenaron las cámaras de la Cámara McMaster de 0.15ml cada una, se le adicionó iodo al 2% en solución para una mejor observación de los huevos y se dejó reposar por 10 minutos. Posteriormente se observaron al microscopio con los objetivos de 10x y 40x realizando los conteos solo dentro del área delimitada en la cámara. Los huevos se observaron teñidos de café y ligeramente contraídos y arrugados debido a su previo tratamiento de deshidratación. Solo se contaron los huevos de aspecto íntegro (enteros) y aquellos que parecieran estar rotos pero que mantuvieran aproximadamente un >90% de su forma original (Fig. 3). Tras la aplicación del factor de multiplicación necesario (Ver anexo V) se estandarizaron los conteos a un gramo.

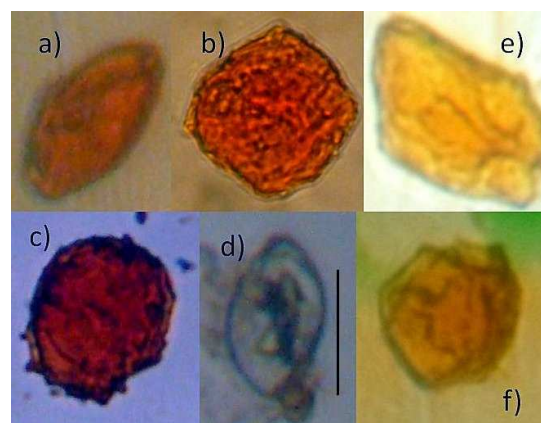


Figura 3: Observación de los huevos de helmintos usando la cámara McMaster: enteros (a-d) y al 90% de su morfología (e-f) Tamaño de la escala: 100 μm

Identificación parasitaria. Se identificaron huevos, larvas y parásitos adultos. Los huevos se extrajeron de 1) heces frescas por medio de flotación al mezclarlos con solución sobresaturada de sulfato de Zinc y 2) del líquido resultante de los cultivos de heces frescas. Una alícuota de la superficie y del fondo de cada una de las anteriores se tomo para su observación al microscopio compuesto (10x, 40x y 100x) después de teñir con Iodo y cristal violeta (por separado) para poder distinguir mejor las estructuras. Los huevos fueron medidos con el programa GNU Image Manipulation Program, versión 2.0 (GIMP 2.0). Se utilizó una clave de identificación orientada a parásitos de mamíferos marinos (Dailey y Gilmartin, 1980) que aunque se redactó en 1980 sigue siendo la única enfocada a parásitos de mamíferos marinos en sus formas de larvas, huevos y adultos.

Para la obtención e identificación de las larvas se llevó a cabo un cultivo piloto. Se procesaron seis muestras frescas obtenidas en el muestreo del año 2011. Estas muestras se cultivaron por duplicado mediante dos técnicas. La primera fue la de Corticelli y Lai (Niec, 1968), la cual se basa en mantener a las heces frescas y húmedas a temperatura ambiente en tres y seis semanas, mientras que la segunda fue con agar nutritivo (Hubert & Kerboeuf, 1984). En esta última los huevos se extrajeron por flotación y se sembraron en agar nutritivo; el cultivo se mantuvo a 37°C por 24 horas para la eclosión, tras lo cual se agregó una solución enriquecida de levadura y se cultivaron por 13 o más días en una incubadora a 37°C ubicada en el Laboratorio de Microbiología de CICIMAR. Ninguna de las técnicas se ha implementado antes para cetáceos, pero se han utilizado con éxito en el diagnóstico de la enfermedad *Estrongilosis* en ganado vacuno (Niec, 1968; Hubert y Kerboeuf, 1984). La extracción de larvas de heces cultivadas en fresco se hizo por el método de Baermann (Meza-Fernández, 2007) (Fig. 4-A). Este método aprovecha el termotropismo e hidrotropismo positivos que poseen las larvas de algunos parásitos. Al colocar las heces en paquetitos en una gasa en un embudo con agua a 37°C, las larvas migran desde las heces hacia al agua, depositándose por gravedad en el fondo donde se colocó un globo para concentrarlas (Fig. 4-B). El líquido recogido en el fondo fue fijado en formol al 4%. A pesar de que en este prototipo hubo presencia de larvas, estas fueron poco visibles debido a la gran

cantidad de materia orgánica y de líquido a analizar (50ml). Para disminuir el líquido a analizar y por ende aumentar la concentración de las larvas se aplicó la modificación basada en la adaptación de Hernández-Chavarría y Avendaño (2001) donde el líquido tibio fue sustituido por solución salina tibia y la muestra de heces se colocó en una manguera de 15 cm, en cuyo extremo final se fijó una gasa, un filtro Whatman #2 (ϕ 125 mm) y otra gasa y se rodeó con un globo que recolectó el líquido filtrado (Fig. 5).

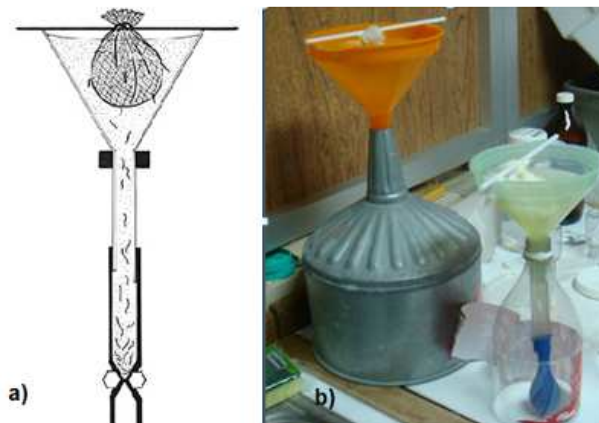


Figura 4: a) Aparato tradicional de Baermann y b) Adaptado



Figura 5: Modificación de Baermann.

Una vez extraídas las larvas en el tubo de ensaye, se dejaron reposar y posteriormente se tomó una muestra del fondo y se observó al microscopio compuesto a 10x, 40x y 100x. Para explorar el éxito de los cultivos se contaron el número de larvas por 0.3 ml con distintos tiempos de cultivos utilizando la cámara

McMaster, esto se obtuvo homogenizando la muestra líquida fijada y tomando 0.3ml para rellenar la cámara McMaster.

La identificación de parásitos adultos se hizo mediante la recopilación de artículos y diversas claves de identificación, debido a que cada clave aborda aspectos de interés para el grupo de estudio (Van-Cleave, 1923; Lopez-Neyra, 1946; Yamaguti, 1963; Dailey y Gilmartin, 1980; Crompton y Nickol, 1985; Amin, 1998). Los especímenes fueron medidos y fotografiados en su observación en microscopio estereoscópico en busca de caracteres externos. Algunos especímenes fueron procesados para microscopía electrónica de barrido la cual fue realizada en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Por último, una porción de organismos encontrados fueron teñidos y otra porción transparentados. Para teñir los organismos previamente fijados en formol al 5% fueron pasados al alcohol etílico al 96% e hidratados hasta alcohol etílico al 70%. Posteriormente, fueron teñidos con carmín acético y nuevamente deshidratados pasándolos de alcohol etílico al 70% hasta alcohol absoluto, para después transparentarlos usando salicilato de metilo y montados entre el cubreobjetos y el portaobjetos con resina sintética. Para transparentar los especímenes éstos fueron deshidratados de alcohol al 96% a alcohol absoluto y colocados en salicilato de metilo y posteriormente montados en resina sintética. Una vez terminado el proceso fueron observados a 10x en un microscopio compuesto en el Laboratorio de Parasitología de la Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS).

5.4 TRABAJO DE GABINETE

Se calculó la prevalencia e intensidad media en la población muestreada de ballena azul de acuerdo a las fórmulas descritas por Bush *et al.* (1997).

$$\text{Prevalencia} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de Hospederos parasitados por una especie de parásito}}{\text{N}^\circ \text{ de Hospederos revisados}} \times 100$$

$$\text{Intensidad promedio} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de Parasitos de una especie en particular}}{\text{N}^\circ \text{ de Hospederos parasitados}}$$

Se estimó el número de huevos por gramo de heces de cada muestra. Debido a la no normalidad de los datos (Shapiro-Wilk W test, $p < 0.001$) se utilizó estadística no paramétrica para encontrar las posibles diferencias que se describen a continuación

Tiempo de conservación: Entre años de estudio con Kruskal Wallis y periodos de estudio (2000-2002 y 2007-20012) con Mann Whitney, descartando años con una sola muestra.

Tipo de conservación: Alcohol etílico a 50%, 70% y 95% y Formol a 5% y 10% utilizando Kruskal Wallis.

Diferencias entre machos y hembras en reposo: Utilizando Mann Whitney

Diferencias entre hembras en reposo y hembras con cría: Utilizando Mann Whitney

Diferencias entre categoría de edad: Entre cinco categorías de edad previamente asignadas con base al método desarrollado por Ortega-Ortiz (2009) y se analizaron utilizando Kruskal Wallis

Designación de individuos con alta intensidad (o coloquialmente conocidos como Wormy Animals): Se seleccionaron utilizando como referencia la desviación estándar y la media de los datos de conteos de HPG.

6.- RESULTADOS

6.1 PREVALENCIA DE PARÁSITOS ADULTOS EN LAS MUESTRAS

Los resultados totales cuantitativos de esta tesis se resumen en la tabla general de resultados en el Anexo III.

6.1.1 Efecto del método de conservación en la ocurrencia de parásitos adultos en heces.

Se revisaron 82 muestras de 1996 a 2011 (Tab. 1), 47 fueron fijadas en alcohol etílico a diferentes concentraciones y 35 en formol. Los parásitos adultos se encontraron mejor conservados en las muestras en formol (cuerpo del parásito entero en muchos casos) mientras que en alcohol etílico se encontraron deshilachados o incompletos. Se encontraron acantocéfalos bien conservados solo en 2.12% de las muestras en alcohol, mientras que el formol esta proporción subió a 34%.

6.1.2 Prevalencia de principales grupos de helmintos.

La prevalencia helmíntica de las 82 muestras fue estimada en 27%. Se clasificaron los parásitos en tres subgrupos con base en similitudes morfológicas (acantocéfalo, coniforme y estructuras amorfas) (Fig. 6).

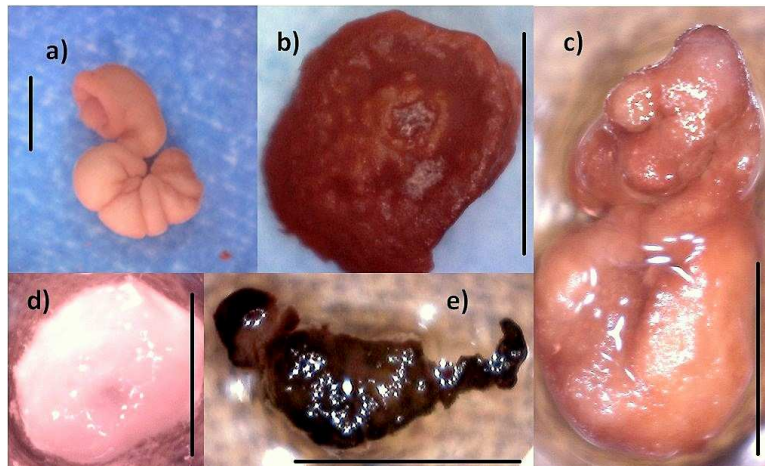


Figura 6: Estructuras parasitarias encontradas mediante tamizado en heces de ballena azul a) *Bolbosoma* sp. b), c) y d) amorfas y e) Coniforme. Tamaño de la escala: 2.5 milímetros

Como se detalla más adelante, se identificó al acantocéfalo como *Bolbosoma* sp. y se calculó la prevalencia de este género y de las estructuras agrupadas por semejanzas morfológicas (Tab. 2).

Tabla 2: Prevalencia de helmintos por grupo de similitudes morfológicas

Estructura	Número de muestras analizadas	Muestras positivas	Prevalencia (%)
<i>Bolbosoma</i> sp.		12	14,6
Coniforme	82	3	3,7
Estructuras Parasitarias Amorfas		19	23.1

Las Figuras 6b y 6d representan estructuras similares a probóscides de acantocéfalos mal conservadas, sin embargo no se pudo confirmar que pertenecieran a este grupo debido al desgaste de las mismas. La prevalencia del acantocéfalo con respecto a 32 muestras preservadas en formol fue de 31%. En las 43 muestras preservadas en alcohol esta proporción bajó a 2.3%.

6.2 INTENSIDAD MEDIA PARASITARIA EN HUEVOS POR GRAMO DE HECES (HPG)

6.2.1 Visualización de los huevos.

Por las características de la cámara McMaster (grosor del acrílico y flotabilidad de los huevos) no fue posible usar el objetivo de aceite de inmersión (100x) y observar diferencias morfológicas que nos permitieran clasificar los huevos, por lo cual la carga parasitaria se estimó a nivel helmintos (Fig.7).

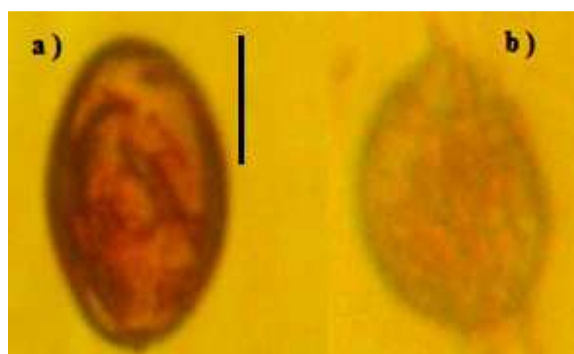


Figura 7: Visualización de los huevos de helmintos en el caso a) al aceite de inmersión y b) a la cámara Mc Máster. Tamaño de la escala: 50 μ m

6.2.2 Estandarización de técnica McMaster

La cantidad de muestra óptima para realizar los conteos de huevos por gramo de heces sería 1 gr. debido a que se evitaría sobreestimar la estimación al re-escalar cualquier otra cantidad a un gramo, sin embargo algunas muestras no contenían 1 g, por lo cual se decidió utilizar el tamaño de muestra de 0.5 g como tamaño adecuado para realizar los conteos en heces de ballena azul y aumentar el número de muestras disponibles para este análisis. Se descartó el uso de la solución de Sheather pese a su alta gravedad específica, debido a que su consistencia espesa aunada a la intensa coloración café de las muestras causó turbidez que no permitió visualizar claramente los huevos.

6.2.3 Intensidad Media Parasitaria

Se procesaron 70 muestras, de las cuales 32 fueron conservadas en formol (5% y 10%) y 38 en alcohol etílico (50%, 70% y 96%). No detectamos diferencias significativas en el número de huevos en función del método de conservación ($\chi^2=5.9$, $p=0.201$). El intervalo fue de 100 HPG a 1400 HPG y la intensidad media fue calculada en 438 ± 328 huevos de helmintos por gramo de heces.

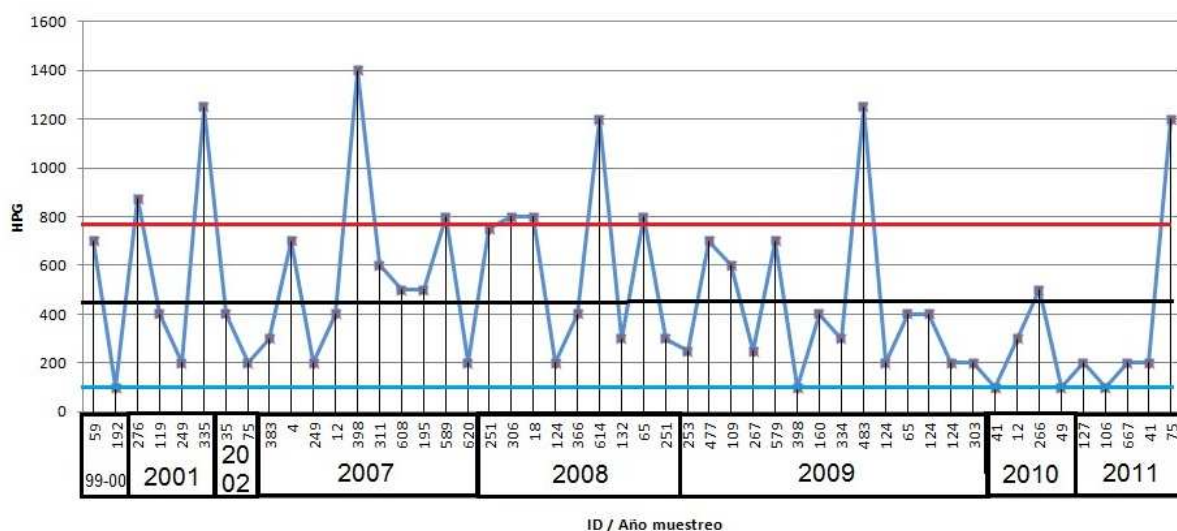


Figura 8: Cargas parasitarias por individuo identificado, intensidad media (línea negra) y desviación estándar (línea roja y azul) en función del año de estudio.

De las 70 muestras analizadas 44 muestras (63%) estuvieron por debajo de la intensidad promedio parasitaria, mientras que 26 (37%) estuvieron por arriba del

promedio. Con referencia al límite superior determinado por la desviación estándar se designaron los posibles individuos con alta intensidad parasitaria (wormy animales), los cuales se encuentran en su mayoría fotoidentificados en el catalogo de CICIMAR-IPN (Fig. 8). Se observaron 10 individuos por arriba del límite superior (771 HPG). Como dato interesante, no se encontró diferencia significativa entre el numero de HPG entre muestras replicadas en el mismo año (Tab. 3).

Tabla 3: Intensidad media en algunos individuos muestreados varias veces en el mismo año (KW= Kruskal Wallis, MW= Mann Whitney).

Individuo	# de conteos (# de muestras)	Valor p	Media (HPG)	Desviación estándar
124	6 (3)	0.56 (KW)	200	178
267	4 (2)	0.61 (MW)	300	200
334	4 (2)	0.22 (MW)	250	191

Las muestras provienen de dos periodos, el primero de 2000 al 2002 y el segundo del 2007 al 2011 (Fig. 9). Adicionalmente se analizó una muestra de 1996 y 1999 (Ver anexo III). Se realizó un análisis entre periodo excluyendo los años con un tamaño de muestra pequeño (<2). No se encontraron diferencias significativas en HPG entre años de muestreo ($\chi^2=9.8$, $p=0.409$) ni entre periodos 2000-2002 ($n=10$) y 2007-2011 ($n=62$) ($U=183$, $p=0.705$).

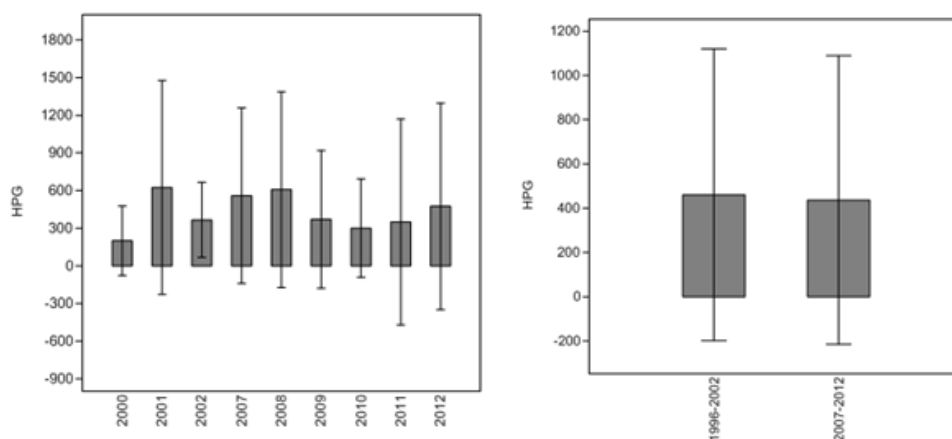


Figura 9: Huevos por gramo de heces entre años y periodos estudiados

6.3 IDENTIFICACIÓN PARASITARIA AL MENOR NIVEL TAXONÓMICO POSIBLE

6.3.1. Identificación de Larvas

6.3.1.1 Eficiencia de cultivos

Visualmente se observaron mas larvas por 0.3 ml. en tiempos de seis semanas con los cultivos en fresco (Tab. 4).

Tabla 4: Conteos de larvas de helmintos en diferentes tipos de cultivos y tiempos de incubación

Eficiencia de cultivo de larvas de helmintos: Promedio de # de larvas por 0.3 ml (desviación estándar)		
Tiempo	Agar	Fresco
3 semanas	1.4 (± 1.2)	1.9 (± 1.3)
6 semanas	2.8 (± 3.3)	3.8 (± 2.7)

La modificación de Baermann (Tab. 5) permitió una mejor observación y búsqueda de larvas sobre la técnica tradicional debido a que se eliminó mucha materia orgánica de la muestra y la cantidad de líquido a analizar disminuyó considerablemente, lo que permitió una mayor concentración de larvas.

Tabla 5: Promedios y desviación estándar de conteos de larvas usando la técnica tradicional de Baermann y con la adaptación.

Método extracción	Promedio # de larvas por 0.3 ml
Baermann regular	1.1 (± 1.1)
Adaptación Baermann	3.1 (± 2.9)

6.3.1.2 Identificación de larvas de helmintos

No se encontraron larvas con desarrollo de estructuras suficiente que nos permitiera identificarlas taxonómicamente (Fig. 10a). Dada el ciclo de vida de estos parásitos, las larvas no se desarrollaron como lo esperado debido a la falta de un hospedero intermedio para su desarrollo. En el caso de algunos cultivos en fresco en tiempo de seis semanas, se encontraron abundantes coracidios de *Diplogonoporus* sp. (Ver sección 6.3.2) el cual necesita entrar en contacto con el agua para desarrollarse en etapa ciliada (Fig. 10b).



Figura 10: a) Larva obtenida en cultivo y b) coracidio de *Diplogonoporus* sp. en cultivos frescos de seis semanas (Tamaño de la escala: 500 μm y 40 μm respectivamente).

6.3.2 Identificación de huevos de helmintos

Se identificó *Crassicauda* sp. el cual presentó una larva en su interior en forma de espiral. El tamaño de este huevo fue de aproximadamente 97 μm de largo por 58 μm de ancho (Fig. 11).



Figura 11: Fotografía del huevo identificado como *Crassicauda* sp. Tamaño de la escala: 50 μm .

Se encontró otro parásito en estado de coracidio, identificado como *Diplogonoporus* sp. al cual no se le observaron cilios al fijarse con yodo, sin embargo al teñirse con cristal violeta se distinguieron estas estructuras (Fig. 12). El tamaño de 46 μm de largo y 33 μm de ancho corresponde a lo registrado para este género que es de 40 μm a 80 μm mm de largo y de 38 μm a 45 μm de ancho dependiendo de la especie (Dailey y Gilmartin, 1980; Chung *et al.*, 1995). La característica de coracidio corresponde solo a este género de los reportados para ballena azul.

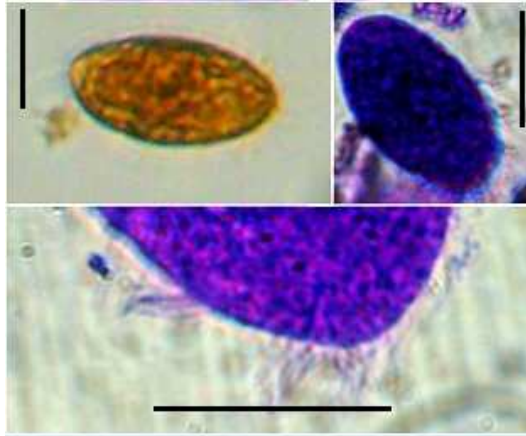


Figura 12: Fotografía del coracidio identificado como *Diplogonoporus* sp. Tamaño de escala: 40 μm
 Posiblemente se pudo encontrar *Bolbosoma* sp. y *Anisakis* sp. La forma elipsoidal de un huevo coincidió con el huevo de *Bolbosoma* sp. (Dailey y Gilmartin, 1980). El tamaño de dicho huevo fue de 132 μm de largo y 76 μm de ancho, concordando con el rango registrado para lo largo pero fue más ancho de lo registrado (intervalos de 120 μm y 200 μm de largo y entre 27 μm y 30 μm de ancho), por ello, no se pudo confirmar si este ensanchamiento corresponda a otro género de parásito o si es artefacto de la fotografía o del tratamiento de la muestra (Fig. 13a). En el caso del posible *Anisakis* sp. el tamaño del huevo de 46 μm de largo y 33 μm de ancho fue ligeramente más pequeño de lo registrado para este género (50 μm de largo y 40 μm de ancho) (Dailey y Gilmartin, 1980) (Fig. 13b).

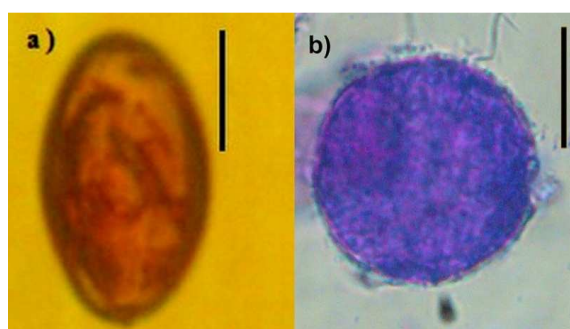


Figura 13: Huevo con posibles características de *Bolbosoma* sp. y *Anisakis* sp. Respectivamente.
 Tamaño de la escala: a) 50 μm b) 26 μm

Adicionalmente en muestras de cultivo se encontró un posible huevo embrionado de nemátodo (Fig. 14) el cual no pudo ser identificado.

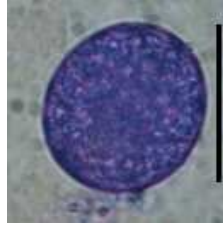


Figura 14: Posible huevos no identificado. Tamaño de la escala: 100 μ m

6.3.3 Identificación de parásitos adultos

Se encontraron 19 acantocéfalos adultos en las muestras. Debido a la fijación y el tiempo de almacenaje, estos fueron encontrados en su mayoría contraídos, enroscados y con la probóscide invaginada dentro de la bolsa receptora, siendo la probóscide clave para la identificación esto la dificultó. La medida promedio de los organismos fue de 10.1 mm. Externamente los acantocéfalos presentaron una pequeña porción de probóscide con abundantes "ganchos" o "espinas" distribuidos en hileras circulares. En la mayoría de los casos esta probóscide se encontraba invaginada en la bolsa receptora en la parte anterior del cuerpo la cual tiene apariencia ensanchada y está cubierta de espinas. A pesar de que los especímenes tenían la probóscide contraída se pudo notar cierto espacio sin "ganchos" (Fig. 15a) lo cual concuerda con la descripción de *Bolbosoma* sp. que tiene la característica de tres campos de espinas, dos juntos después un espacio y el último campo de espinas en la probóscide. El cuerpo se encontraba sin presencia de espinas, tenía consistencia blanda y la piel tenía apariencia transparente (Fig. 15b y Fig. 15d). También se notó la ausencia de espina genital la cual es un carácter taxonómico para definir al género (Fig. 15c).

Los especímenes tuvieron 25 hileras con 7 ganchos cada una (Fig. 15e y Fig. 15f), lo cual coincide con la descripción de Yamaguti (1963) para *Bolbosoma* que registra entre 12 a 26 hileras con 5-9 ganchos cada una para el género. Se realizó la disección de dos acantocéfalos para ver sus estructuras internas. Con la tinción y transparentación se logró observar lo largo de la probóscide invaginada así como la doble pared de la bolsa receptora (Fig. 15g y 15h), la presencia de dos glándulas de cemento largas y tubulares (Fig. 16b) y la ubicación central de los testículos con

respecto al cuerpo (Fig. 16a). Con base en esto último y por el número de hileras y ganchos, se concluyó que los organismos pertenecían al género *Bolbosoma*.

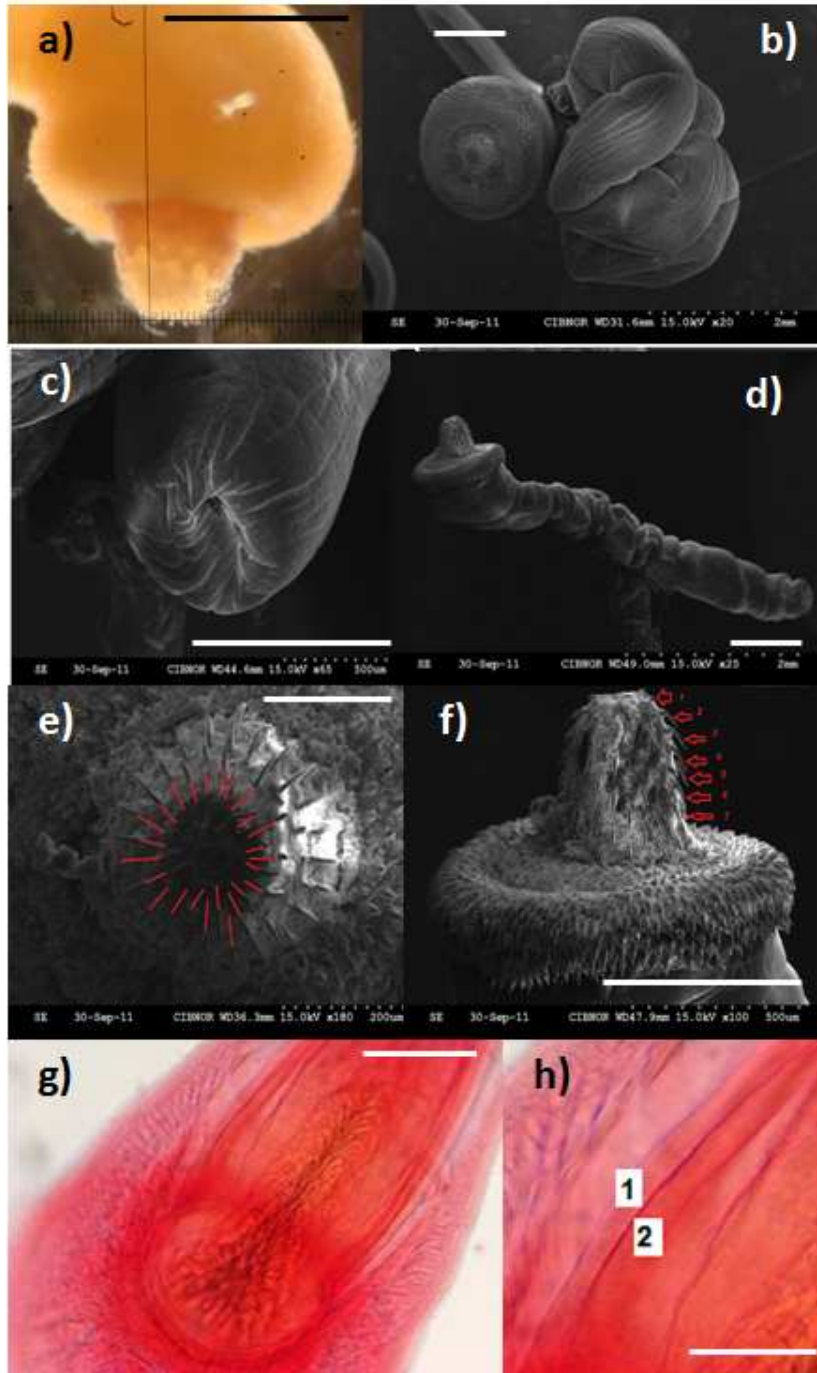


Figura 15: Parásito adulto clasificado como *Bolbosoma* sp. se puede observar a) campo desnudo sin espinas en probóscide b) y d) cuerpo libre de espinas c) ausencia de espina genial e) y f) 25 hileras de ganchos con 7 cada una g) probóscide invaginada en bolsa receptora y h) doble pared de la bolsa receptora (pared 1 y 2). Tamaño de escala: (a, b, c, d, f) 1 mm. (e y h) 200 μm.

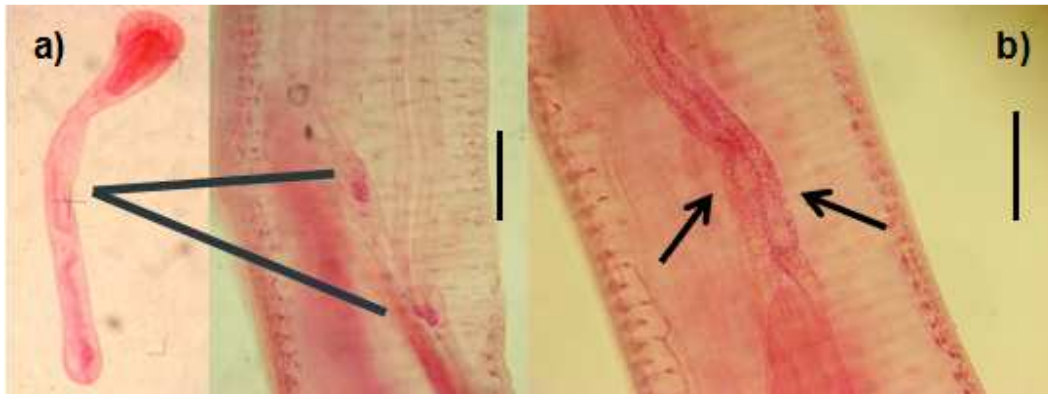


Figura 16: Tinción y transparentación de *Bolbosoma* sp. a) Testículos en parte central del cuerpo y b) dos glándulas de cemento largas y tubulares. Tamaño de escala: 100 μ m

6.4. RELACIONAR LA CARGA PARASITARIA CON EL SEXO Y CATEGORÍA DE EDAD DE LOS INDIVIDUOS Y EL ESTADO REPRODUCTIVO DE LAS HEMBRAS.

Del total de las muestras de heces (82), 56 fueron asociadas a un individuo conocido. Se tienen muestras de 40 individuos diferentes en nueve años de muestreo.

6.4.1 Sexo y estado reproductivo de las hembras

De las 53 muestras 42 provinieron de hembras y 10 correspondientes a machos. La intensidad media parasitaria para las hembras en general fue de 461 ± 347 HPG mientras que para los machos fue de 525 ± 327 . No se encontraron diferencias significativa en intensidades parasitarias entre machos y hembras ($U=179$, $p=0.415$).

Las hembras se dividieron en tres grupos dependiendo de su estado reproductivo/gestante al momento del muestreo: las hembras con cría o lactantes tuvieron una intensidad media de 583 ± 433 HPG ($n=9$), las hembras post crianza (las cuales fueron muestreadas al año siguiente de haberlas visto con cría) tuvieron una intensidad media de 537 ± 249 HPG ($n=4$) y las hembras en reposo (hembras sin reportes de maternidad reciente) tuvieron una intensidad media de 414 ± 329 HPG ($n=29$). No existieron diferencias significativas entre las hembras en reposo y las hembras con cría ($U=106.5$, $p=0.345$).

Para el caso de las posibles tendencias encontradas entre sexo (machos y hembras en reposo) y condición gestante (hembras en reposo y hembras con cría) se determino el poder del análisis y se calculó el número de muestras deseable para

alcanzar un 80% de poder. Con el número de muestras analizadas la prueba tuvo un poder de análisis de 23% para detectar una diferencia con una magnitud alta (valor crítico de t: 2.02) para aumentar el poder del análisis a un 80% se requerirían analizar 107 muestras de hembras en reposo y 54 muestras de hembras con cría. Al comparar la intensidad media en hembras en reposo respecto a machos tampoco hubo diferencias significativas (U=112, p=0.235). En este caso, el poder de análisis fue de 15% (valor crítico de t: 2.02) y para alcanzar un poder del 80% se requerirían analizar al menos 207 muestras de macho y 104 muestras de hembras en reposo.

6.4.2 Categoría de edad

Un total de 38 muestras fueron asociadas a individuos con información sobre su longitud los cuales fueron clasificados en cuatro categorías de edad (Tab. 6). No se encontraron diferencias significativas entre las intensidades medias por categoría de edad ($\chi^2=3.8$, p=0.282).

Tabla 6: Intensidad media y número de muestras por categorías de edad, basado en Ortega-Ortiz (2009). SM= Sexualmente maduros y FM= Físicamente maduros.

Tamaño	Categoría de Edad	Intensidad media
15-18 m	Juveniles	650
19-21 m	Subadultos	333
22-25 m	Adultos SM	523
26-28 m	Adultos FM	364

6.4.3 Individuos con intensidades parasitarias altas (wormy animals)

Las mayores cargas helmínticas fueron aportadas por solo el 16% (11 individuos) de los hospederos, quienes denominamos “individuos con intensidades parasitarias altas” o wormy animals. Ocho fueron hembras, dos machos y un individuo de sexo indeterminado. Las cargas variaron desde 800 a 1400 huevos por gramo de heces y pertenecieron a nueve adultos y un juvenil. Dos de las hembras estaban lactando. La tabla 7 resume los datos relacionados a estas muestras.

Tabla 7: Descripción de los individuos altamente parasitados. ASM= Adulto sexualmente maduro, AFM= Adulto físicamente maduro, M= Macho, H= Hembra y HC= Hembra con cría

#Muestra	ID	Sexo	Categoría de edad	HPG	# de años avistados hasta 2011	Crías
46/2001	335	M	-	1250	2	-
58/2007	398	H	ASM	1400	5	-
73/2008	614	-	Juvenil	1200	3	-
78/2008	65	H	ASM	1200	11	-
102/2009	483	HC	AFM	1250	2	2
125/2011	75	HC	ASM	1200	11	3
42/2001	276	H	ASM	875	4	0
65/2007	589	H	ASM	800	1	1
69/2008	306	H	ASM	800	3	1
70/2008	18	M	ASM	800	5	-

7.- DISCUSIONES

7.1 PREVALENCIA

Aunque históricamente es conocido que el alcohol etílico al 70% es el mejor método de preservación de parásitos helmintos (Johri y Smyth, 1956; Dailey, 1978), se recomienda ampliamente en la bibliografía colocar los parásitos aun vivos en solución salina tibia para una relajación del mismo y la correcta preservación del organismo (Dailey, 1978). Sin embargo, este procedimiento es poco realizable en salidas al mar a bordo de embarcaciones menores ya que la búsqueda de parásitos en las muestras resultaría logísticamente complicado. Una opción alterna sería poner una submuestra de heces frescas en solución salina tibia o colocar en hielo y después fijar la muestra, quizás esto podría permitir tener acantocéfalos preservados con la probóscide elongada en lugar de estar invaginada.

Se logró identificar a *Bolbosoma* sp., un acantocéfalo previamente registrado en ballena azul y otros cetáceos (Measures, 1992). Normalmente se le encuentra adherido con sus ganchos al sistema digestivo (Vlasman y Campbell, 2003). Su ciclo es aún desconocido en el océano Pacífico, aunque se sabe que los acantocéfalos necesitan un vertebrado como hospedero final y un crustáceo como hospedero intermedio, como se pudo observar en el atlántico, donde *Bolbosoma balaenae* infecta a *Nyctiphanes couchii* (Dailey et al., 2000; Gregori et al., 2012).

Es difícil determinar si la prevalencia encontrada en este trabajo (27%) es alta o baja. Actualmente, no existen registros de prevalencias de parásitos en cetáceos vivos. Las prevalencias existentes basadas en animales varados se estiman con necropsias; las observaciones y conteos se realizan con base en lo encontrado en el estómago e intestinos, por lo que no son comparables con los resultados obtenidos a partir de heces. Aun así, la prevalencia general de helmintos (27%) y la de *Bolbosoma* sp. (14.6%) es similar a lo registrado para lobos finos del norte (*Callorhinus ursinus*) de Alaska con 21.7% de acantocéfalos y 6,2% para *Bolbosoma* (Lonita et al., 2008). Asimismo, en *Phocoena spinnipinis* y *Cephalorhynchus eutropia* se registraron prevalencias helmínticas totales de 83% y 87% respectivamente y 67% y 17% respectivamente para acantocéfalos (Torres et al., 1992). En un estudio previo

sobre ballena azul del Golfo de California se registró una prevalencia del 22% para la familia Polymorphiidae (acantocéfalo que muy probablemente sea *Bolbosoma*) (Rocha-Gosellin, 2009).

El alimento es la principal vía entre el parásito y el hospedero (Aznar *et al.*, 2001). La presa principal de la ballena azul son los eufausidos (krill). En el Golfo de California se ha reportado como presa principal a *Nyctiphanes simplex* (Del Ángel-Rodríguez, 1997) y en sus zonas de alimentación del Pacífico Norte (Costa de California y region al sur de las Islas Aleutianas) las especies *Euphausia pacífica* y *Thysanoessa spinifera* fueron las dominantes en la dieta (Nemoto 1957; Fiedler *et al.*, 1998). No obstante, un estudio basado en escatología molecular de la ballena azul del Golfo de California reveló la presencia de ADN de peces de la familia Mictofidae (Jiménez-Pinedo, 2010). Si bien no existe antecedente de infección de *Bolbosoma* sp. en mictófidos y eufáusidos, los estudios sobre parasitología en estos grupos aun son escasos.

Aunque los parásitos son específicos y usan hospederos íntimamente relacionados con sus ciclos de vida, cambios observados en las prevalencias parasitarias podrían indicar cambios en el comportamiento alimenticio del hospedero (Aznar *et al.*, 2001). En un estudio de largo plazo de *Delphinus delphis* varados en Australia, se encontró que la prevalencia de helmintos aumentó entre los años 2005 y 2006, coincidiendo parcialmente con el periodo en el cual la sardina *Sardinops sagax* (alimento de estos delfines) cuadruplicó su producción en la zona (Tomo *et al.*, 2010). Un estudio complementario de parásitos en mictófidos y eufáusidos ayudaría a corroborar la vía de adquisición y el ciclo completo de *Bolbosoma* sp. lo que permitiría monitorear cambios en la prevalencia y determinar su posible relación con cambios en el comportamiento alimenticio de la ballena azul. Recientemente se han realizado trabajos de identificación de parásitos de eufáusidos del Golfo de California (Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2010) los cuales con ayuda de técnicas moleculares (Morales-Ávila,

Comm. Pers.²), proporcionarán información más precisa sobre el ciclo de vida de estos parásitos.

La determinación de las prevalencias para las estructuras parasitarias amorfas no aportó información a nivel taxonómico, sin embargo, es importante si más adelante se pudiera lograr una identificación a mayor resolución. Estas pudieran ser probóscides mal conservadas de acantocéfalos y podrían ser identificadas por medio de estudios moleculares.

7.2 INTENSIDAD MEDIA PARASITARIA

La técnica McMaster ha sido ampliamente usada con diversas modificaciones en pequeños rumiantes, algunas especies exóticas y en humanos (Bondarenko *et al.*, 2009). A la fecha se desconoce de su aplicación en cetáceos de vida libre; su nueva aplicación para la ballena azul representa un precedente cuantitativo para el estudio de salud de poblaciones de cetáceos.

La flotabilidad de los huevos para su conteo en la cámara McMaster depende de las diferencias en la GE de los huevos, los desechos fecales y la solución de flotabilidad (Dryden *et al.*, 2005). Se ha reportado que la GE de la mayoría de los huevos de parásitos se ubica entre 1.05 y 1.23 (David y Lindquist, 1982) y por lo tanto para que floten los huevos ésta debe ser mayor.

Existen varias soluciones de flotabilidad tales como cloruro de sodio, nitrato de sodio, sulfato de magnesio, solución Sheather y sulfato de zinc. Para caballos la solución de flotabilidad más usada es nitrato de sodio mientras que en algunas especies silvestres como lémures y chimpancés se usó iodito de potasio y sulfato de magnesio respectivamente (Schad *et al.*, 2005; Krief *et al.*, 2005). En este estudio encontramos que la solución de sulfato de zinc por su transparencia permitió una mejor observación de huevos de helmintos en comparación con la solución de Sheather. Al desconocerse la GE de los huevos de parásitos de ballena azul, utilizar ZnSO₄ permite maximizar la ocurrencia de huevos por ser la solución con mayor gravedad específica.

² Estudiante de Doctorado, Laboratorio de Zooplancton, CICIMAR-IPN

Los conteos se realizaron a partir de muestras deshidratadas de heces para obtener un peso seco. Se ha registrado que la desecación no afecta significativamente la forma de los huevos de parásitos, incluso se han reportado la recuperación de huevos y larvas de heces humanas prehistóricas (Samuels, 1965). Sin embargo, algunos huevos presentan deformación cuando son extraídos de muestras secas y/o expuestas al medio ambiente como ha sido reportada para *Dipylidium caninum* (Sánchez-Thevenet *et al.*, 2003), lo cual hace difícil la identificación.

Otra limitación es la identificación de los huevos en animales silvestres como el chimpancé *Pan troglodytes* (Krief *et al.*, 2005) y el lemur *Microcebus murinus* (Schad *et al.*, 2005) es la falta de conocimiento acerca de sus parásitos en contraste con los animales domésticos que han sido extensamente estudiados. En el caso del estudio del lémur, este se complementó con un análisis molecular, identificando a 15 morfotipos de nemátodos (Schad *et al.*, 2005). De forma similar, en este trabajo, para la ballena azul, la identificación de la carga parasitaria se restringió a nivel helmintos, separando algunos parásitos adultos para someterles a futuros análisis moleculares.

El tamaño de muestra interviene en el cálculo de los huevos por gramo de heces (Dunn y Keymer, 1986) y en organismos de gran tamaño es recomendable disminuir el tamaño de muestra (McDonell, Comm. Pers.), aun así, el tamaño de muestra adecuado para el conteo de huevos varía en función de la especie estudiada, existiendo una gran variación, yendo desde 0.2 gramos para muestras en humanos, 2 gramos para chimpancés, hasta 5 gramos para guanacos (Beldomenico *et al.*, 2003; Mes, 2003; Krief *et al.*, 2005). Para la ballena azul, 0.5 g nos permitió tener una lectura más limpia en el microscopio y economizar muestra. En el caso de los estudios asociados a mamíferos marinos, el esfuerzo de muestreo es relativamente caro por lo cual las muestras fecales obtenidas se racionan para diversos estudios entre los cuales se incluyen reproducción y alimentación (Diane Gendron, datos no publicados; Jiménez-Pinedo, 2010).

La intensidad media encontrada de 438 HPG es una estimación relevante para futuras comparaciones intraespecíficas e interespecíficas. Las intensidades medias

suelen ser muy diferentes entre especies. Por ejemplo para el chimpancé *Pan troglodytes* se registró 9 HPG (Krief *et al.*, 2005), 603 HPG para el león *Panthera leo* (Smith y Kok, 2006), 2149 HPG para el jabalí *Sus scrofa* (Hälli *et al.*, 2010) y 1600 HPG para burros silvestres (Vercruysse *et al.*, 1986). El intervalo encontrado para ballena azul de 100 a 1400 HPG fue amplio, sin embargo, esta dispersión de datos se observó también en el jabalí, (0 HPG a 102000 HPG) y el burros silvestres (100-9200 HPG) entre otros (Vercruysse *et al.*, 1986; Hälli *et al.*, 2010). Los conteos en ballena azul coinciden con otras especies de mamíferos en las cuales la mayoría de los individuos presentan intensidades parasitarias (HPG) por debajo de la intensidad media, sobresaliendo algunos individuos con valores por arriba de la media y de la desviación estándar (Vercruysse *et al.*, 1986; Krief *et al.*, 2005; Hälli *et al.*, 2010).

7.3 IDENTIFICACIÓN PARASITARIA

Los hospederos de grupos taxonómicos superiores tienen en promedio de cinco a 14 especies de parásitos; en mamíferos el intervalo va de 2 a 41 especies por hospedero (Poulin y Leung, 2010). En este estudio se confirmaron tres géneros con la posible existencia de un cuarto.

HUEVOS.

Se aislaron exitosamente algunos huevos a partir de muestras de heces en fresco, lo que promete ser una técnica alternativa para mejorar la identificación de los parásitos. Contrario al campo de la parasitología en el ganado, existe un notable desconocimiento del desarrollo embrionario y larvario de la mayoría de los parásitos de mamíferos marinos. Solo los nemátodos *Anisakis* sp. y *Pseudoterranova* sp. han sido estudiados extensivamente y eso debido a su presencia en peces de interés comercial y su posible zoonosis en humanos (Torres *et al.*, 2000).

El nematodo *Crassicauda* sp. que fue encontrado en este trabajo ha sido previamente registrado en ballenas azules cazadas o varadas (Skrjabin, 1959; Gibson, 1973; Gibson y Harris, 1979). Aunque no descrita para ballena azul, la patogenia de *Crassicauda* podría ser parecida a la mostrada a continuación en ballena de aleta, debido a la similitud entre estas dos especies.

Crassicauda ha sido registrado mayormente en el sistema urinario de grandes cetáceos, como odontocetos y en el caso de mistecetos, en ballena azul, ballena de aleta (*Balaenoptera physalus*) y ballena jorobada *Megaptera novaeangliae* (Lambertsen, 1992). Se encuentra mayormente en la zona urogenital (Lambertsen, 1986), riñones (Lambertsen, 1985), glándulas mamarias (Geraci *et al.*, 1978) y nervios craneales en el caso de odontocetos (Morimitsu *et al.*, 1992). La migración de *Crassicauda* sp. hacia otros tejidos de sus hospederos causa inflamación y esclerosis de las arterias que irrigan el intestino. En la ubicación final de estos gusanos en el sistema vascular y uretral de los riñones, se alimentan de sangre venosa y llegan a medir hasta dos metros de longitud (Lambertsen, 1986). La obtención de especímenes completos de *Crassicauda* sp. es sumamente difícil (Baylis, 1922) e incluso los huevos solo son observados en biopsias de tejidos parasitados (Dailey y Stroud, 1978). Se han reportado lesiones graves causadas por *Crassicauda* sp. en ballena de aleta que posiblemente contribuyeron a su muerte (Lambertsen, 1985). Lambertsen (1985,1986) encontró masas fibrosas (de hasta 5kg) en venas renales y la vena cava las cuales ocupan los parásitos adultos para llegar a los riñones, resultando en una falla renal congestiva y provocando también heridas severas en el sistema vascular y contribuyeron a la muerte de algunos individuos parasitados. En vista que los efectos de *Crassicauda* sp. en ballena azul pudieran ser parecidos a los de ballena de aleta, se recomienda monitorear de cerca la presencia de este parásito en ballena azul realizando necropsias en organismos varados con especial atención en el sistema urinario.

Limitaciones de la identificación de posibles huevos de Bolbosoma sp y Anisakis sp.: Los huevos que mostraron parecido morfológico a los géneros *Anisakis* y *Bolbosoma* fueron encontrados solo en dos muestras. La clave de identificación de Dailey y Gilmartin (1980) presenta fotos en blanco y negro, las cuales son difíciles de observar pero las medidas que son la principal característica de identificación difieren de nuestras muestras. El posible huevo de *Anisakis* sp. es más pequeño que lo registrado y el posible huevo de *Bolbosoma* sp. es más ancho. Si bien, se logró identificar *Bolbosoma* sp. como parásito adulto, *Anisakis* sp. no fue encontrado en ningún otro estadio de vida en las heces. El género *Anisakis* tiene amplio rango de

parasitismo en mamíferos marinos y los cetáceos son por excelencia sus hospederos finales. Así mismo se ha registrado en *Nyctiphanes simplex* (Gomez-Gutierrez, 2010), la principal presa de la ballena azul en el Golfo de California (Del Angel Rodriguez, 2007). Aunque no hemos confirmado la identidad del huevo, es muy probable que la población de ballena azul que visita el Golfo de California sea hospedero de *Anisakis* sp.

Del género *Diplogonoporus* existen tres registros en ballena azul que datan de 1955, 1963 y 1979. El más reciente corresponde a la descripción de *Diplogonoporus balaenopterae* encontrado en una localidad de Georgia del Sur y el ejemplar fue depositado en la colección del Museo Natural de Historia de Gran Bretaña (Gibson y Harris, 1979). En el artículo no se mencionan lesiones o estado físico de la ballena al momento de la colecta, solo se describe el ejemplar colectado, haciendo hincapié en que existe duda en la correcta identificación del rorcual. Los tres registros existentes provienen de los océanos Atlántico y Ártico (Markowski, 1955; Klumov, 1963; Gibson y Harris, 1979). El presente registro del género *Diplogonoporus* representa el primero en ballena azul para la población del Pacífico Noreste, probablemente porque el esfuerzo por identificar la carga parasitaria en esta población fue limitado.

El céstodo del género *Diplogonoporus*, tiene como primer y segundo hospederos a copépodos y peces y como hospedero final generalmente parasita ballenas con algunos reportes también para perros y humanos donde la infección se da por consumo de peces hospederos intermediarios tales como la Carpa *Cyprinus carpio*, (Delyamure y Skrjabin, 1986; Chung *et al.*, 1995) El ciclo de vida de este céstodo es poco conocido, se sabe que poseen una fase acuática (coracidio) con desarrollo de cilios en el huevo y posteriormente en la larva (Mehlhorn, 2008). Nosotros encontramos huevos de *Diplogonoporus* sp. con cilios después de un tiempo considerable (seis semanas) en cultivos en fresco que se mantuvieron constantemente húmedos, siendo esto quizás el detonante para su desarrollo.

Aunque no existen registros sobre los problemas que *Diplogonoporus* sp. ocasiona a la salud de las ballenas, este parásito puede llegar a medir hasta 1 metro de largo y pudiera ocasionar obstrucción física del alimento en el tracto digestivo y excretor,

como ocurre con varios parásitos céstodos (Chung *et al.*, 1995; Vlasman y Campbell, 2003).

LARVAS.

La obtención de larvas mediante los cultivos de huevos en fresco fue más abundante que el agar nutritivo, contrario a lo reportado en un previo estudio (Reiss *et al.*, 2007). En este trabajo el cultivo en fresco tuvo mayor eficiencia si se toma en cuenta la simplicidad de su implementación.

El cultivo de larvas se utilizó a principios del siglo pasado por White (1927) para identificar a un posible nemátodo en tercer estadio proveniente de perros y gatos que provocaba una enfermedad de la piel en humanos. La técnica inicio como cultivos sencillos utilizando heces frescas en un cultivo sobre carbón, aislando las larvas por el método de Baermann. Más tarde se utilizaron los cultivos en placas de agar con el fin de diagnosticar estrogilosis en ganado detectando en el agar el movimiento de las larvas, confirmando de manera positiva la infección (Hubert y Kerboeuf, 1984).

Basándonos en el método en fresco y agar-agar utilizado por Hubert y Kerboeuf (1984) se modificó por agar nutritivo, el cual aporta un sustrato rico en proteínas de origen animal. Las larvas que se obtuvieron no mostraron características observables que nos permitiera clasificarlas taxonómicamente. Con base a la forma alargada posiblemente sea un nemátodo, pero estos necesitan un hospedero intermedio para llegar al siguiente estadio de desarrollo que permita su identificación.

PARÁSITOS ADULTOS

Para identificar al acantocéfalo de esta sección se reviso a detalle las características morfológicas de los organismos. Aunque la probabilidad de que se dé una nueva relación parasitaria es baja, una nueva colonización siempre es posible, por lo cual es importante llevar a cabo una rigurosa revisión taxonómica de los especímenes (Hoberg, 1987; Hoberg, 1997; Aznar *et al.*, 1998; Aznar *et al.*, 2001).

Los géneros *Bolbosoma* y *Corynosoma* son acantocéfalos de la familia Polymorphidae, única reportada hasta el momento que parasita mamíferos marinos

(Aznar *et al.*, 2001). Si bien la identificación se realizó hasta género, fue difícil tener una resolución a nivel de especie. No se encontraron claves taxonómicas especializadas para el género *Bolbosoma*. Yamaguti (1963) hace una recopilación de lo reportado por artículos científicos para ciertas especies, en el caso de las especies de *Bolbosoma* existen algunas discrepancias entre reportes de identificaciones de algunas especies.

La cantidad de ganchos en nuestros espécimen (25 hileras de 7 ganchos cada una) coincide con el intervalo registrado para *Bolbosoma hamiltoni* (24-26 hileras con 7-8 ganchos cada una), sin embargo, la talla adulta reportada de este organismo es de 50mm. Nosotros no obtuvimos ningún ejemplar de dicho tamaño en las muestras analizadas, aunque no descartamos que pueda existir un acantocéfalo con esa talla dentro del organismo de la ballena azul que no sea expulsado en las heces. La especie con mayor cantidad de registros en ballena azul es *Bolbosoma tubinella*; sin embargo, algunos autores difieren en el número y cantidad de hileras de ganchos reportando 18-19 hileras de 5 a 7 ganchos cada una (Petrochenko, 1958) y 20-22 hileras de 6 a 8 ganchos cada una (Harada, 1931).

7.4 RELACIONAR LA CARGA PARASITARIA CON EL SEXO Y LA CATEGORIA DE EDAD DE LOS INDIVIDUOS Y EL ESTADO REPRODUCTIVO DE LAS HEMBRAS

Los estudios sobre parasitismo en animales silvestres a partir de heces varían en el número de muestras analizado (23 a 434) dependiendo de la dificultad para conseguir las. Sin embargo en la mayoría de los casos no se conoce el origen de la muestra (ver anexo II). En este estudio, se logró asociar a 40 muestras de heces a individuos identificados. Si bien los resultados no mostraron diferencias significativas estadísticamente entre sexo y estado reproductivo de las hembras, se sabe que en muchos casos el limitado número de muestras tiene como resultado la no significancia estadística (Zuk y McKean, 1996).

De acuerdo a su talla, los individuos de ballena azul del Golfo de California se clasificaron en cuatro grupos de edad: juveniles, subadultos, adultos sexualmente maduros y físicamente maduros, cuando llegan a la totalidad de su crecimiento

(Ortega-Ortiz, 2010). Se esperaría que la carga parasitaria varíe de acuerdo a la talla y edad debido a que un organismo acumula parásitos a medida que envejece y aumenta de tamaño (Zuk y McKean, 1996). Existen pocos ejemplos respecto a cargas parasitarias de acuerdo a la edad en animales silvestres, debido a la dificultad de obtener un tamaño de muestras adecuado y asociados a individuos representativos de la población. En general los estudios son limitados por tener un tamaño de muestra pequeño por cada categoría, sobre todo en juveniles (Vanitha *et al.*, 2011). Sin embargo, se han encontrado diferencias significativas en la carga parasitaria entre edades en macacos japoneses (*Macaca fuscata yakui*) y en cabras, en ambos los juveniles presentaron una carga más alta que las otras categorías de edad (Baker, 1975; Kochapakdee *et al.*, 1991; MacIntosh *et al.*, 2010). En ballenas azules se observó que las 4 categorías de edad tienen la misma intensidad media.

El 16% de los hospedadores albergaron las mayores cargas helmínticas. En los estudios parasitarios en ganado se utiliza el término “*wormy animals*” para designar aquellos individuos que concentran las mayores cargas parasitarias (Morales *et al.*, 1998). Para hacer esta selección normalmente ellos toman en cuenta la condición clínica de los organismos y los niveles de hematocrito, que son el porcentaje del volumen de toda la sangre que está compuesta de glóbulos rojos. Aquellos organismos con alta concentración de parásitos y con manifestación de síntomas clínicos son los candidatos a “*wormy animals*” (Morales *et al.*, 2006). Gracias a la aplicación de la técnica McMaster en ballena azul, se cubrió el aspecto cuantitativo del estudio. Al ser el trabajo basado en organismos silvestres de difícil acceso, se utilizó la desviación estándar como indicador de datos anómalos, obteniendo un total de 10 individuos por encima del límite superior. La mayor parte de los individuos, con cargas de 800 a 1400 HPG se encuentran registrados en el catálogo de foto-identificación del CICIMAR-IPN. Tales individuos tuvieron cargas de más del doble de la intensidad media parasitaria y están conformados por tres hembras con cría, cinco hembras en reposo y dos machos. Cualquier explicación relacionada a enfermedad es muy difícil de probar por la dificultad de conocer y evaluar el estado de salud de los individuos muestreados. Actualmente se está analizando los niveles de cortisol en heces en ballena azul, la obtención de esta

información complementará este estudio para una aproximación más real. Es importante mencionar que estos datos pueden considerarse altos si tomamos como ejemplo a la hembra adulta 124, la cual ha sido muestreada 4 veces en diferentes ocasiones y en ningún caso supero los 400 HPG. Aunque estos e es el caso de un solo individuo se espera que el monitoreo continuo sobre esta población proporcione a larga plazo más registros como este, que permitan conocer la variación en el tiempo de las intensidades parasitarias de los individuos.

Los dos machos catalogados como wormy animals no son representativos de la población de estudio, mientras no se tengan muestras frecuentes solo se puede inferir que fueron muestreados en un momento de intensidad parasitaria alta.

Los machos muestreados con alta intensidad fueron adultos maduros y probablemente con una producción de testosterona correspondiente a individuos sexualmente activos. En otros mamíferos se sabe que la testosterona puede reducir la producción de anticuerpos (Klein, 2004). Es imposible determinar todos los factores que intervienen en una intensidad alta la cual no necesariamente indica enfermedad, solo el remuestreo de estos individuos y un mayor tamaño de muestras podría aportar información sobre la salud de estos dos individuos.

En el caso de la condición de las hembras, tres hembras con cría fueron clasificadas como individuos de alta intensidad parasitaria, con cargas de 800 HPG a 1250 HPG.

En animales domésticos y rumiantes, se ha encontrado que la carga parasitaria en hembras se puede ver afectada durante la lactancia por 1) aumento en fecundidad en parásitos debido a cambios hormonales de su hospedero (O'Sullivan y Donald, 1970), por 2) acumulación de larvas en estado latente (Naerland; 1949; Gibbs, 1967; Arundel y Ford, 1969) y 3) disminución de la estimulación de antígenos durante la crianza (Soulsby, 1957; Connan, 1968) lo cual conduce a un aumento en la población de helmintos en el organismo y por lo tanto un mayor aporte de huevos a las heces (Connan, 1976).

Para poder evaluar el estatus de la salud de las poblaciones silvestres se necesitan una variedad de parámetros o indicadores de salud importantes los cuales deben

tener una línea base que sirva de comparación. Por primera vez para cetáceos vivos un estudio aporta datos cuantitativos parasitarios de fácil acceso, si bien las cargas parasitarias no son comparables entre especies de estudio, nos dan una línea base comparable a futuro. Al fundamentar esta línea base parasitológica para el monitoreo a largo plazo de esta población, se logró el principal objetivo de esta tesis.

8.- CONCLUSIONES

1.- El método McMaster fue exitosamente implementado y adaptado para estimar la intensidad media parasitaria en ballena azul. Para la ballena azul del Golfo de California esta fue calculada en 438 huevos por gramo de heces (variando entre 100 y 1400 HPG).

2.- La intensidad media parasitaria no mostro variaciones entre sexo, categoría de edad o condición de las hembras

3.- Se identificaron *Bolbosoma* sp., *Crassicauda* sp. y se obtuvo el primer registro de *Diplogonoporus* sp. en la población de ballena azul del Pacífico Noreste. La prevalencia parasitaria helmíntica fue de 27%, representando *Bolbosoma* sp. un 16%.

4.- Una gran parte de la población muestreada mostro intensidades parasitarias por debajo de la intensidad media y solo el 16% de los individuos, en su mayoría hembras, tuvieron una intensidad parasitaria alta; su historial de avistamientos permite esperar la continuidad de su monitoreo.

9.- RECOMENDACIONES

Se recomienda monitorear de cerca la presencia de *Crassicauda* sp., la cual de acuerdo a reportes previos en balanoptéridos, puede ocasionar serios problemas de salud en individuos inmunosuprimidos.

Se recomienda combinar estudios sobre parásitos de las presas dominantes de la ballena azul para comprender mejor sus ciclos de vida y cambios en el tiempo, así como optimizar la fijación de muestra en campo con el fin de obtener especímenes adultos de parásitos en mejor estado de conservación para su identificación taxonómica.

10.- BIBLIOGRAFÍA

Aguilar-Aguilar, R., R. Moreno-Navarrete & Delgado-Estrella, A. 2002. Presencia de nemátodos del género *Anisakis* en una orca pigmea *Feresa attenuata* (Cetacea: Delphinidae) varada en costas de Veracruz, Mexico. Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Auton. Mexico, Ser. Zool. 73(2):239-240.

Amin, O. M. 1998. Marine flora and fauna of the eastern United States. Acanthocephala. NOAA Tech. Rep., NMFS 135:1-27.

Arundel, J. H. & Ford, G. E. 1969. The use of a single anthelmintic treatment to control the post-parturient rise in faecal worm egg count of sheep. Aust. Vet. J. 45, 89-93.

Aznar, F., J. Raga, Corcuera, J. & Monzón, F. 1997. Los parásitos, un posible método para diferenciar stocks y detectar migraciones en las franciscanas. En: Pinedo, M.C. & Barreto, A.S. (Eds). Anais do 2º Encontro sobre Coordenação de Pesquisa e Manejo da Franciscana. Ed. FURG, Rio Grande. 14pp.

Aznar, F.J., F.J. Badillo, & Raga, J.A. 1998. Gastrointestinal helminths of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from the western Mediterranean: constraints on community structure. J. Parasitol., 84, 474-479.

Aznar, F.J. J.A. Balbuena, Fernández, M. & J.A. Raga. 2001. Living together: the parasites of marine mammals. En: Evans, PGH & Raga, JA (eds). Marine mammals. Biology and conservation. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 385-423 p.

Baker, N.F. 1975. Control of parasitic gastroenteritis in goats. J. Am. Vet. Med. Assoc., 15:1069-1075.

Baylis, H.A. 1922. Note on the habitat and structure of crassicauda [Nematoda]. Parasitology, 14:9-12.

- Behnke, J.M. 1990. Parasites: immunity and pathology. Taylor & Francis, London. 444 pp.
- Beineke, A., U. Siebert, Wohlsein, P. & W. Baumgärtne. 2010. Immunology of whales and dolphins. Vet. Immunol. Immunop. 133 (2-4):81-94 .
- Beldomenico, P.M., M. Uhart, Bono, M.F., C. Marull, Baldi, R. & J.L. Peralta. 2003. Internal parasites of free-ranging guanacos from Patagonia. Vet. Parasitol., 118:71-77.
- Bondarenko, I.G. J. Kinčeková, Várady, M., A. Königová, Kuchta, M. & G. Koňáková. 2009. Use of modified McMaster method for the diagnosis of intestinal helminth infections and estimating parasitic egg load in human faecal samples in non-endemic areas. Helminthologia, 46:62-64.
- Bowen, W. D. 1997. Role of marine mammals in aquatic ecosystems. Mar. Ecol. Prog. Ser., 158:267-274.
- Bush, A. O., K.Lafferty, Lotz, J. & A. Shostak. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. J. Parasitol., 83:575-583.
- Chiluiza, D., W. Aguirre, Félix, F. & B. Haase. 1998. Varamientos de mamíferos marinos en la costa continental ecuatoriana, período 1987-1995. Acta Oceanográfica del Pacífico, INOCAR, Ecuador, 9(1):209-217.
- Chung, D.I., H.H. Kong, Moon, C.H., D.W. Choi, Kim, T.H.; D.W. Lee & Park, J.J. 1995. The first human case of *Diplogonoporus balaenopterae* (Cestoda: Diphyllbothriidae) infection in Korea. Korean. J. Parasitol. 33:225–230.
- Connan, R. M. 1968. Studies on the worm populations in the alimentary tract of breeding ewes. J. Helminthol. 42:9-28.
- Connan, R.M. 1976. Effect of lactation on the immune response to gastrointestinal nematodes. Vet. Rec., 99:476-477.

Cringoli, G., L. Rinaldi, Veneziano, V., G. Capelli & Scala, A. 2004. The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique in estimating the faecal egg counts of gastrointestinal strongyles and *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. Vet. Parasitol. 123: 121–131.

Cringoli, G., L. Rinaldi, Maurelli, M.P. & J. Utzinger. 2010. FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. Nat. Protoc. 5:503-515.

Crompton, D.W.T. & B.B. Nickol. 1985. Biology of the Acanthocephala. Cambridge University Press. 519 pp.

Cruz-Reyes, A. & B. Camargo-Camargo. 2001. Glosario de términos en parasitología y ciencias afines. UNAM, Instituto de Biología, Páiz, Plaza y Valdes Eds. Mexico, 347 pp.

Dailey, M.D. 1978. Preparation of Parasites for Identification and Cataloging. J. Zoo Anim. Med., 9(1):13-15.

Dailey, M.D. & R.K. Stroud. 1978. Parasites and associated pathology observed in cetaceans stranded along the Oregon Coast. J. Wildl. Dis. 14:503-511.

Dailey, M. D. & W. Walker. 1978. Parasitism as a Factor (?) in Single Strandings of Southern California Cetaceans. J. Parasitol., 64(4):593-596.

Dailey, M. & W. Gilmartin. 1980. Diagnostic key to the parasites of some marine mammals. Technical Document 295, Naval Ocean Systems Center, San Diego, California. 44pp.

Dailey, M. & W. Vogelbein. 1991. Parasite Fauna of Three Species of Antarctic Whales with Reference to Their Use as Potential Stock Indicators. Fishery Bulletin. 89:355-365 .

Dailey, M., F. Gulland, Lowenstine, L., P. Silvagni & Howard, D. 2000. Prey, parasites and pathology associated with the mortality of a juvenile gray whale (*Eschrichtius robustus*) stranded along the northern California coast. Dis. Aquat. Organ., 42:111-117.

David, E.D. & W.D. Lindquist. 1982. Determination of the specific gravity of certain helminth eggs using sucrose density gradient centrifugation. J. Parasitol. 68:916-919.

Del Ángel-Rodríguez, J. 1997. Hábitos alimentarios y distribución espacio temporal de los rorcuales, común (*Balaenoptera physalus*) y azul (*Balaenoptera musculus*) en la Bahía de la Paz, B.C.S., México. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN, La Paz, B.C.S., México. 78pp.

Delyamure, S. L. 1955. Helminthofauna of marine mammals. En: K. I. Skrjabin (Ed.) Izdatelstvo Akademii Nauk SSSR, Moscow. 522 pp . Citado en Measures (1993).

Delyamure, S.L. & A.S Skrjabin. 1986. Identification of species of *Diplogonoporus balaenopterae* and *D. grandis* (Cestoda, Diphylobothriidae). Parazitologiya; 20(1):69-72. Citado en Measures (1993).

Dhermain, F. (2004). Cetacean Strandings In The Mediterranean Sea. Regional Activity Centre for Specially Protected Areas, España, 40pp.

Dryden, M.W., P.A. Payne, Ridley, R. & V. Smith. 2005. Comparison of common fecal flotation techniques for the recovery of parasite eggs and oocysts. Vet. Ther. 6(1):15–28.

Dunn, A. & A. Keymer. 1986. Factors affecting the reliability of the McMaster technique. J. Helminthol. 60:260 – 262.

Fiedler, P.C., S.B. Reilly, Hewitt, R.P., D. Demer, Philbrick, V.A., S. Smith, Armstrong, W., D. A. Croll, Tershy, B. R. & B.R. Mate. 1998. Blue whale habitat and prey in the California Channel Islands, Deep Sea Res. Part. II, 45:1781-1801.

Flores-Cascante, L. & D. Gendron. En prensa. Application of McMaster's technique in live blue whales. Vet. Record. Doi: 10.1136/vr.100749.

Galletti-Vernazzani, B. & E. Cabrera. 2005. Varamiento De Cetáceos En Chile 1970-2005 y su relación con impactos antropogénicos. Memorias del Taller de Trabajo sobre el Impacto de las Actividades Antropogénicas en Mamíferos Marinos en el Pacífico Sudeste, 32-37p.

Gendron, D. 2002. Ecología poblacional de la ballena azul *Balaenoptera musculus* de la Península de Baja California. Tesis de doctorado, CICESE, 105 pp.

Gendron, D. & A. Ugalde-De la Cruz. 2012. A new classification method to simplify blue whale photo-identification technique. J. Cetacean. Res. Manage. 12(1): 79–84

Geraci, J. H., M.D. Dailey & St. Aubin, D.J. 1978. Parasitic mastitis in the Atlantic whitesided dolphin, *Lagenorhynchus acutus*, as a probable factor in herd productivity. J. Fish. Res. Board Can. 35:1350-1355.

Gibbons, L.M., D.E. Jacobs, Fox, M.T. & J. Hansen. 2010. Faecal Examination of Farm Animals for Helminth Parasites. The RVC/FAO guide to veterinary diagnostic parasitology. <http://www.rvc.ac.uk/review/Parasitology/Index/Index.htm>. (Accessed December 2012).

Gibbs, H. C. 1967. Some factors involved in the spring rise phenomenon in sheep. En E. J. L. Soulsby (Ed.). Veterinary Medical Review. The Reaction of the Host to Parasitism. Proceedings of the Third International Conference of The World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, Lyons, 160-167pp. Citado en O'Sullivan y Donald (1970).

Gibson, D.I. 1973. Some blue whale nematodes. Parasitology, 67:8-9.

Gibson, D.I. & E.A. Harris. 1979. The helminth-parasites of cetaceans in the collection of the British Museum (Natural History). Investigations on Cetacea 10:309-324.

Gibson, D. I., E.A. Harris, Jepson, P., T. Kuiken, Baker, J. & Simpson, B. 1998. A survey of the helminth parasites of cetaceans stranded on the coast of England and Wales during the period 1990 - 1994. J. Zool., Lond., 244:563-574.

Gómez-Gutiérrez, J., C. Robinson, Kawaguchi, S. & S. Nicol. 2010. Parasite diversity of *Nyctiphanes simplex* and *Nematoscelis difficilis* (Crustacea: Euphausiacea) along the northwestern coast of Mexico. Dis. Aquat. Organ., 88(3):249-66.

Gosling, P. 2005. Dictionary Of Parasitology. CRC Press, 408 pp.

Gregori, M., F.J. Aznar, Abollo, E., Á. Roura, González, Á.F. & S. Pascual. 2012. *Nyctiphanes couchii* as intermediate host for the acanthocephalan *Bolbosoma balaenae* in temperate waters of the NE Atlantic. Dis. Aquat. Org. 99:37-47.

Guerrero-Ruiz, M.; J. Urbán-Ramírez & Rojas-Bracho, L. 2006. Las Ballenas del Golfo de California. Mexico, DF: Instituto Nacional de Ecología (INE-Semarnat).

Habela, M., R. Sevilla, Corchero, E., J. Fruto & Peña, J. 2002. Nematodosis gastrointestinales en ovino. Mundo Ganadero. Mayo:1-6.

Hälli, O., E. Ala-Kurikka, Peltoniemi, O. & M. Heinonen. 2010. The prevalence of internal parasites in wild boar farms in Finland. Acta Vet. Scand., 52(1):S29.

Harada, I. 1931. Das Nervensystem von *Bolbosoma turbinella* (Dies.). Japanese Journal of Zoology, 3:161-199. Citado en Yamaguti (1963).

Hernández-Chavarría, F. & L. Avendaño. 2001. A simple modification of the Baermann method for diagnosis of Strongyloidiasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 96:805-807

Hoberg, E.P. 1987. Recognition of larvae of the Tetrabothriidae (Eucestoda): implications for the origin of tapeworms in marine homeotherms. Can. J. Zool. 65:997-1000.

Hoberg, E.P. 1997. Phylogeny and historical reconstruction: host-parasite systems as keystones in biogeography and ecology. En: M. Reaka-Kudla, E.O. Wilson and D.

Wilson (Ed.). Biodiversity II: understanding and protecting our resources. Joseph Henry Press, National Academy of Sciences, Washington, D.C. 243-261 pp.

Hubert, J. & D. Kerboeuf. 1984. A New Method for Culture of Larvae Used in Diagnosis of Ruminant Gastrointestinal Strongylosis: Comparison with Fecal Cultures. Can. J. Comp. Med., 48:63-71.

Jagerskiold, L. A. 1891. Einiges uber die Schmarotzer der nordatlantischen Balaenopteriden. Biologiska Foreningens Forhandlingar, 3:127-134. Citado en Measures (1993).

Jimenez-Pinedo, N.C. 2010. Hábitos Alimentarios y Relación Interespecífica entre la Ballena Azul (*Balaenoptera Musculus*) y la Ballena de Aleta (*B. Physalus*) en el suroeste del Golfo de California . Tesis de Maestria, CICIMAR-IPN, 84 pp.

Johri, L. N. & J.D. Smyth. 1956. A histochemical approach to the study of helminth morphology. Parasitology, 46 :107-116.

Jones, J.L. & J.P. Dubey. 2010. Waterborne toxoplasmosis—Recent developments. Exp. Parasitol. 124:10-25.

Klein, S. L. 2004. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection Parasite Immunol. 26:247-264.

Klumov, S.K. 1963. Food and helminth fauna of whalebone whales (Mystacoceti) in the main whaling regions of the world ocean. Trudy Instituta Okeanologii 71:94-194. Citado en Measures (1993).

Kochapakdee, S., W. Pralomkarn, Choldumrongkul, S., S. Saithanoo & Norton, B. W. 1991. Prevalence of internal parasite in Thai native female goats. In: Saithanoo, S. & Norton, B.W. (Eds.), Proceedings of workshop in Goat Production in the Asian Humid Tropics, in Hat Yai, Thailand, 128-134

Krief, S., M.A. Huffman, Sevenet, T., J. Guillot, Bories, C., C.M. Hladik & Wrangham, R.W. 2005. Noninvasive monitoring of the health of Pan troglodytes schweinfurthii in the Kibale National Park, Uganda. Int. J. Primatol. 26:467–490.

Kutz, S., E. Hoberg, Polley, L. & E. Jenkins. 2005. Global warming is changing the dynamics of Arctic host–parasite systems. Proc. R. Soc. B. 272:2571–2576 .

Lambertsen, R.H. 1985. Taxonomy and distribution of a *Crassicauda* sp. (Nematoda: Spirurida) infecting the kidney of the common fin whale (*Balaenoptera physalus*). J. Parasitol., 71:485-488.

Lambertsen, R.H. 1986. Disease of the Common Fin Whale (*Balaenoptera physalus*): Crassicaudiosis of the Urinary System. J. Mammal., 67(2):353-366.

Lambertsen, R.H. 1992. Crassicaudosis: a parasitic disease threatening the health and population recovery of large baleen whales. En Health and management of free-ranging mammals – Part One (M. Artois, ed.). Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics) 11:1131–1141.

Lockyer, C. 1981. Growth and energy budgets of large baleen whales from the southern hemisphere. Mammals in the Seas. 5(3):379-484.

Lonita, M., M.G. Varela, Lyons, E.T., T.R. Spraker & Tolliver, S.C. 2008. Hookworms (*Uncinaria lucasi*) and acanthocephalans (*Corynosoma* spp. and *Bolbosoma* spp.) found in dead northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) on St. Paul Island, Alaska in 2007. Parasitol. Res. 103:1025–1029.

Lopez-Neyra, C. R. 1946. Compendio de helmintologica ibérica. Parte II. Capítulo IV. Clase Acanthocephala (Rudolphi, 1808). Revista Iberica de Parasitologia, 4:403-491.

MacIntosh, A., A. Hernandez & Huffman, M. 2010. Primary Title: Host age, sex, and reproductive seasonality affect nematode parasitism in wild Japanese macaques. Primates. 51(4):353-364.

Mackintosh, N.A. & J.F.G. Wheeler. 1929. Southern blue and fin whales. Discovery Reports 1:257-540.

Magalhães-Pinto, R.; L. Muniz-Pereira, Alves, V. y S. Siciliano. 2004. First Report of a Helminth Infectio for Bryde's Whale, *Balaenoptera edeni* Anderson, 1878 (Cetacea, Balaenopteridae). LAJAM 3(2):167-170.

Margolis, L. & M.D. Dailey. 1972. Revised annotated list of parasites from sea mammals caught off the west coast of North America. NOAA technical report NMFS, 64(7):1-23.

Markowski, S. 1955. Cestodes of whales and dolphins from the Discovery collections. Discovery Reports 27:377-395. Citado en Measures (1993).

Mazzariol, S.; G. Di Guardo, Podesta, M. & B. Cozzi. 2006. Post-Mortem Examination on a young Fin Whale (*Balaenoptera Physalus*). The International Whaling Commission, 2pp.

Measures, L. 1992. *Bolbosoma turbinella* (Acanthocephala) in a Blue Whale, *Balaenoptera musculus*, Stranded in the St. Lawrence Estuary, Quebec. J. Helminthol. Soc. Wash, 59(2)206-211.

Measures, L. 1993. Annotated list of metazoan parasites reported from the blue whale, *Balaenoptera musculus*. J. Helminthol. Soc. W., 60(1): 62-66.

Mehlhorn, H. 2008. Encyclopedia of parasitology. Springer, New York, 1592pp.

Mes, T.H.M. 2003. Technical variability and required sample size of helminth egg isolation procedures. Vet. Parasitol., 115:311–320.

Meza-Fernández, H. 2007. Comparación entre el método de Baermann y el método de cultivo de heces con carbón vegetal para el diagnóstico de la infección por *Strongyloides stercoralis*. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 44 pp.

Mignucci-Giannoni, A.; E. Hoberg, Siegel-Causey, D. & Jr. E. Williams. 1998. Metazoan parasites and other symbionts of cetaceans in the Caribbean. J. Parasitol., 84(5):939-946.

Møller, A. P., J. Erritzoe & Saino, N. 2003. Seasonal changes in immune response and parasite impact on hosts. Am. Nat. 161:657-671.

- Morales-Vela, B. & L. Olivera-Gomez. 1993. Varamiento de Calderones *Globicephala macrorhynchus* (Cetacea: Delphinidae) en la isla de Cozumel, Quintana Roo, Mexico. Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Auton. Mexico, Ser. Zool. 64(2):177-180.
- Morales, G.; L.A. Pino, Sandoval, E. y L. Moreno. 1998. Importancia de los animales acumuladores de parásitos (wormy animals) en rebaños de ovinos y caprinos naturalmente infectados. Analecta Vet., 18:1-6.
- Morales, G., L.A. Pino, Sandoval, E., J. Florio. & Jiménez, D. 2006. Niveles de infestación parasitaria, condición corporal y valores de hematocrito en bovinos resistentes, resilientes y acumuladores de parásitos en un rebaño Criollo Río Limón. Zootecnia Trop., 24(3):333-346.
- Morimitsu, T., H. Kawano, Torihara, K., E. Kato & Koono, M. 1992. Histopathology of eighth cranial nerve of mass stranded dolphins at Goto Islands, Japan. J. Wildl. Dis. 28:656-658.
- Morimitsu, T., T. Nagai, Ide, M., H. Kawano, Naichuu, A., M. Koono & otros. 1987. Mass Stranding Of Odontoceti Caused By Parasitogenic Eighth Cranial Neuropathy. J. Wildlife Dis., 23(4):586-590.
- Naerland, G. 1949. Nutrition in relation to nematode parasitism in sheep. Report of the XIVth International Veterinary Congress, London, 2:65-70. Citado en O'Sullivan y Donald (1970).
- Nemoto, T. 1957. Foods of baleen whales in the North Pacific. Sci. Rep. Whales Res. Inst. Tokyo, 12:33-89.
- Niec, R. 1968. Cultivo e Identificación de Larvas Infectantes de Nematodes Gastrointestinales del Bovino y Ovino. Red de helmintología para America Latina y el Caribe, 28 pp.
- Nishiwaki, M. & K. Hayashi. 1950. Biological survey on fin and blue whales taken in the Antarctic season 1947-48 by the Japanese fleet. Sci. Rep. Whales Res. Inst. Tokyo, 3:132-190.

Ortega-Martín, C., M. Vicente-Rubiano & Sanz-Tolón, A. 2009. Estudio de las causas de varamiento y muerte de dos cetáceos en Islas Canarias. R.C.C.V., 3(2):284-292.

Ortega-Ortiz, C.D. 2009. Aspectos de la dinámica poblacional de la ballena azul (*Balaenoptera musculus*) del Pacífico Noreste. Tesis de Doctorado, CICIMAR-IPN 227pp.

O'Sullivan, B.M. & A.D. Donald. 1970. A field study of nematode parasite populations in the lactating ewe. Parasitol., 61:301-315.

Palacios, D.M., S. Salazar & Day, D. 2004. Cetacean Remains and Strandings in the Galápagos Islands, 1923-2003. LAJAM, 3(2):127-150.

Parsons, K.M., J.W. Durban, & Claridge, D.E. 2003. Comparing two alternative methods for sampling small cetaceans for molecular analysis. Mar. Mammal Sci. 19(1):224-31

Pauly, D., A. Trites, Capuli, E. & V. Christensen. 1998. Diet composition and trophic levels of marine mammals. ICES J. Mar.Sci., 55:467-481.

Petrochenko, V. 1958. Acanthocephala of domestic and wild animals. Izdatel stvo Akademii Nauk SSSR. Moscow. 2:458pp. Citado en Yamaguti (1963).

Pinto, R., L. Muniz-Pereira, Alves, V. & S. Siciliano. 2004. First report of a helminth infection for Bryde's Whale, *Balaenoptera edeni* Anderson, 1878 (Cetacea, Balaenopteridae). LAJAM, 3(2):167-170.

Poulin, R. & T.L.F. Leung. 2010. Taxonomic resolution in parasite community studies: are things getting worse?. Parasitology, 137:1967-1973.

Reiss, D., L.M. Harrison, Bungiro, R. & M. Cappello. 2007. An agar plate method for culturing hookworm larvae: analysis of growth kinetics and infectivity compared with standard coproculture techniques. Am. J. Trop. Med. Hyg., 77:1087-1090.

Rice, D. W. 1963 Progress report on biological studies of the larger Cetacea in the waters off California. Norsk Hvalfangst-Tidende, 7:181-187. Citado en Measures (1993).

Rice, D.W. 1978. Blue whale. En: D. Haley, (Ed.) Marine Mammals of Eastern North Pacific and Arctic Waters. Pacific Seattle Press, Seattle. 256 pp. Citado en Measures (1993).

Rocha-Gosselin, A. 2009. Caracterización de la carga microbiana y parasitaria de tres especies de mysticetos en las costas de la Península de Baja California, México. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN, 134pp.

Roden, G.I. 1958. Oceanographic and meteorological aspects of the Gulf of California. Pac. Sci., 12:21-45.

Rolland, R. M., S.E. Parks, Hunt, K.E., M. Castellote, Corkeron, P.J., D.P. Nowacek, Wasser, S.K. & S.D. Kraus. 2012. Evidence that ship noise increases stress in right whales. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, Doi: 10.1098/rspb.2011.2429

Rozsa, L., J. Reiczigel & Majoros, G. 2000. Quantifying parasites in samples of hosts. J. Parasitol. 86:228-232.

Ruppert, E. & B. Barnes. 1996. Zoología de los Invertebrados. Madrid: Mc. Graw Hill, Interamericana, 1114pp.

Samuels, R. 1965. Parasitological study of long-dried fecal samples. Memoirs of the Society for American Archaeology, 19:175-179.

Sánchez-Thevenet, P., O. Jensen & Mellado, I. 2003. Presence and persistence of intestinal parasites in canine fecal material collected from the environment in the Province of Chubut, Argentina, Patagonia. Vet. Parasitol. 117:263-269.

Schad. J., J.U. Ganzhorn. & Sommer, S. 2005. Parasite burden and constitution of major histocompatibility complex in the Malagasy mouse lemur, *Microcebus murinus*. Evolution, 59:439-450.

Skrjabin, A. S. 1959. New helminth species from marine mammals in the Pacific Ocean and far eastern seas. Izvestiya Krimskovo Pedagogicheskogo Instituta M.V. Frunze, 34:99-118. Cited in Measures (1993).

Smith, Y. & O.B. Kok. 2006. Faecal helminth egg and oocyst counts of a small population of African lions (*Panthera leo*) in the southwestern Kalahari, Namibia. Onderstepoort. J.Vet. Res., 73(1):71-75.

Soulsby, E.J.L. 1957. Studies on the Serological Response in Sheep to Naturally Acquired Gastro-intestinal Nematodes. J. Helminthol., 31:145-160.

Taranto, N. J., L. Passamonte, R. Marinconz, De Marzi, M.C., S.P. Cajal & Malchiodi, E.L. 2000. Parasitosis zoonóticas transmitidas por perros en el Chaco Salteño. Medicina, 60(2): 270-272.

Tomo, I., C.M. Kemper & Lavery, T.J. 2010. Eighteen-year study of south Australian dolphins shows variation in lung nematodes by season, year, age class, and location. J. Wildlife Dis., 46:488-498.

Torres, P., J.A. Oporto, Brieva, L.M. & L. Escare. 1992. Gastrointestinal helminths of the cetaceans *Phocoena spinnipinis* (Burmeister, 1865) and *Cephalorhynchus eutropia* (Gray, 1846) from the southern coast of Chile. J. Wildl. Dis., 28:313-315.

Torres, P., R. Moya & Lamilla, J. 2000. Anisakid nematodes of interest in public health in fishes commercialized in Valdivia, Chile. Arch. Med. Vet., 32(1):107-113.

Trites, A.W. 2001. Marine mammal trophic levels and interactions. En: Steele *et al.*, (Eds.), Encyclopedia of Ocean Sciences, Academic Press, London, 1628-1633.

Vanitha, V., K. Thiyagesan & Baskaran, N. 2011. Prevalence of intestinal parasites among captive Asian Elephants *Elephas maximus*: effect of season, host demography, and management systems in Tamil Nadu, India. Journal of Threatened Taxa, 3:1527-1534.

Vercruyse, J., E.A. Harris, Kaboret, Y.Y., L.J. Pangui & Gibson, D.I. 1986. Gastrointestinal helminths of donkeys in Burkina Faso. Zeitschrift für Parasitenkunde. 72:821-825.

Van-Cleave, H.J. 1923. A key to the Genera of Acanthocephala. Transactions of the American Microscopical Society. 42(4)184-191.

Vlasman, K. & G. Campbell. 2003. Field Guide: Diseases And Parasites Of Marine Mammals Of The Eastern Arctic. Canadian Cooperative Wildlife Health Centre, 111pp.

White, G. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from culture. Science, 66:302-303.

Yamaguti, S. 1963. Systema helminthum. Vol. V. Acanthocephala. Interscience Publishers, Inc. New York. 423 pp.

Zuk, M. & K.A. McKean. 1996. Sex differences in parasite infections: patterns and processes. Int. J. Parasitol., 26:1009-1024.

ANEXO I

Cuadro comparativo de número de muestras para estudios fecales en poblaciones silvestres de difícil acceso.

Espece	Hábitat	Localidad	# de muestras	Individuos identificado	Cita
León Africano (<i>Panthera leo</i>)	Desierto	Kalahari, Namibia	23	No	Smith y Kok, 2006
Chimpancé (<i>Pan troglodytes</i>)	Bosque tropical	Kibale Park, Uganda	252	No	Krief <i>et al.</i> , 2005
Macacos	Isla montañosa	Kyushu, Japan	434	Si	MacIntosh <i>et al.</i> , 2010
Ballena Franca	Mar abierto	Fundy, Canada	144	No	Rolland <i>et al.</i> , 2012
Lémur	Selva tropical	Suroeste de Madagascar	82	No	Schad <i>et al.</i> , 2005
Ballena Azul	Mar abierto	Suroeste Golfo de California	80	Si	Este estudio

ANEXO II

Fórmula de soluciones de flotabilidad utilizadas			
Solución de Sulfato de Zinc		Solución modificada de Sheather	
Agua	1 litro	Agua	355 ml.
Sulfato de Zinc	331 gramos	Azúcar granulada	454 gramos
		Formaldehido	6 ml.

ANEXO III

Número de Muestra		Preservación	Año Muestreo	Individuo	Talla (m)	Sexo	Estructuras Parasitarias	HPG
26	Bm	Alcohol Etílico 50%	06/04/1996	-		-	-	200
35	Bm	Alcohol Etílico 50%	26/02/1999	-		H	-	-
36	Bm	Alcohol Etílico 50%	16/05/1999	-		-	-	-
37	Bm	Alcohol Etílico 50%	16/04/1999	59	24	HC	-	700
38	Bm	Alcohol Etílico 50%	18/01/2000	192		H	-	100
39	Bm	Alcohol Etílico 50%	24/02/2000	299		H	-	-
40	Bm	Alcohol Etílico 50%	13/03/2000	-		-	-	300
42	Bm	Alcohol Etílico 50%	24/01/2001	276		H	-	875
43	Bm	Alcohol Etílico 50%	06/02/2001	119	22	HPP	-	500
44	Bm	Alcohol Etílico 50%	06/02/2001	119	22	H	-	300
44	Bm rep	Alcohol Etílico 50%	06/02/2001	-			-	-
45	Bm	Alcohol Etílico 50%	06/02/2001	249	20	M	-	200
46	Bm *	Alcohol Etílico 50%	25/02/2001	335		M	-	1250
47	Bm	Alcohol Etílico 50%	28/02/2001	-		M	-	-
48	Bm	Alcohol Etílico 50%	15/02/2002	35		H	-	400
49	Bm	Alcohol Etílico 50%	05/03/2002	75/223	25	H	-	200
50	Bm	Alcohol Etílico 50%	06/03/2002	-		H	-	500
51	Bm	Alcohol Etílico 50%	23/03/2002	-		-	-	-
54	Bm	Alcohol Etílico 70%	13/03/2007	383	22	M	-	300
55	Bm	Alcohol Etílico 70%	14/03/2007	4	23	HPP	-	700
56	Bm	Alcohol Etílico 70%	14/03/2007	249		M	-	200
57	Bm	Alcohol Etílico 70%	15/03/2007	12	24	M	-	400
58	Bm	Alcohol Etílico 70%	17/03/2007	398	23	H	-	1400
59	Bm	Alcohol Etílico 70%	18/03/2007	290		HC	-	-
60	Bm	Alcohol Etílico 70%	20/03/2007	311	21	M	Si	600
61	Bm	Alcohol Etílico 70%	18/04/2007	608	20	M	-	500
62	Bm	Alcohol Etílico 70%	22/04/2007	195		HC	-	500

63	Bm	Alcohol Etílico 70%	28/04/2007	251		HC	Si	-
65	Bm	Alcohol Etílico 70%	21/05/2007	589/579	24	HC	-	800
66	Bm	Alcohol Etílico 70%	08/06/2007	620	17	-	-	200
68	Bm	Alcohol Etílico 70%	13/02/2008	251	25	HPP	Si	750
69	Bm	Alcohol Etílico 96%	20/02/2008	306	24	H	Si	800
70	Bm	Alcohol Etílico 70%	21/02/2008	18	24	M	-	800
71	Bm	Alcohol Etílico 70%	21/02/2008	124	26	H	-	200
72	Bm	Alcohol Etílico 70%	12/03/2008	366		H	Si	400
73	Bm	Alcohol Etílico 70%	13/03/2008	614	15	-	-	1200
74	Bm	Alcohol Etílico 70%	21/03/2008	132	28	HC	-	300
77	Bm	Alcohol Etílico 70%	22/03/2008	65	25	H	-	400
78	Bm	Alcohol Etílico 70%	22/03/2008	65	25	H	-	1200
80	Bm	Alcohol Etílico 70%	25/03/2008	-		-	Si	125
83	Bm	Alcohol Etílico 70%	07/04/2008	251		H	-	300
85	Bm	Formol 10%	05/02/2009	142		M	Si	-
86	Bm	Formol 10%	08/02/2009	253		H	Si	250
87	Bm	Formol 10%	12/02/2009	477	24	H	-	1000
88	Bm	Formol 10%	12/02/2009	477	24	H	-	400
89	Bm	Formol 10%	16/02/2009	109		-	Si	-
89	Bm rep	Alcohol Etílico 96%	16/02/2009	109		-	-	600
90	Bm	Formol 10%	21/02/2009	267	20	H	-	100
91	Bm	Formol 10%	21/02/2009	267	20	H	-	400
92	Bm	Alcohol Etílico 70%	24/02/2009	-		-	-	300
93	Bm	Formol 10%	25/02/2009	579	15	M	-	700
94	Bm rep	Alcohol Etílico 70%	25/02/2009	-		-	-	100
95	Bm	Formol 10%	27/02/2009	-		-	-	300
96	Bm	Formol 5%	29/02/2009	-		-	-	-
97	Bm	Formol 10%	03/03/2009	398		H	-	100
98	Bm	Formol 10%	11/03/2009	-		-	Si	400
	Bm	Formol 10%	16/03/2009	160		H	Si	400

99								
100	Bm	Formol 10%	20/03/2009	334	24	H	Si	200
101	Bm	Formol 10%	20/03/2009	334	24	H	Si	400
102	Bm	Formol 10%	21/03/2009	483	27	HC	Si	1250
103	Bm	Formol 10%	29/03/2009	124	26	H	Si	100
104	Bm	Formol 10%	29/03/2009	124	26	H	-	300
105	Bm	Formol 10%	30/03/2009	65		H	-	400
106	Bm	Formol 10%	30/03/2009	-		-	Si	200
107	Bm	Alcohol Etílico 96%	30/03/2009	124		H	-	400
108	Bm	Formol 10%	31/03/2009	124		H	-	200
109	Bm	Formol 5%	01/04/2009	303/687M	24	HC	-	200
110	Bm	Formol 5%	02/04/2009	-		-	-	200
113	Bm	Alcohol Etílico 96%	05/03/2010	41	25	HC	-	100
114	Bm	Formol 5%	19/03/2010	12		M	Si	300
115	Bm	Alcohol Etílico 96%	22/03/2010	251		H	-	-
116	Bm	Formol 5%	23/03/2010	266	24	H	-	500
117	Bm	Formol 5%	23/03/2010	49	23	H	-	100
118	Bm	Formol 5%	25/03/2010	-		-	-	500
119	Bm	Formol 5%	26/03/2010	-		-	Si	500
120	Bm	Formol 5%	30/03/2010	-		-	Si	100
121	Bm	Formol 5%	29/01/2011	127	26	HC	Si	200
122	Bm	Formol 5%	31/01/2011	106		H	Si	100
123	Bm	Formol 5%	14/02/2011	667		-	Si	200
124	Bm	Formol 5%	19/02/2011	41	25	HPP	-	200
125	Bm	Formol 5%	30/03/2011	75	25	HC	-	1200
126	Bm	Formol 5%	28/03/2011	-		-	-	200

ANEXO IV

MANUAL DE TÉCNICA MCMaster ADAPTADA A CETÁCEOS

(Flores-Cascante y Gendron, en prensa)

1.- PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se toma alrededor de una cuchara sopera de muestra de heces, esta puede ser de alcohol, formol o fresca. Se extiende sobre papel estraza y se deja secar por 24 horas previas al análisis, tras lo cual se pesan 0.5 gramos para ser procesados.



Figura 1: Preparación de la muestra

2.- PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Para preparar la solución de sulfato de zinc, se pesan 331 gramos de reactivo y se mezclan con 1 litro de agua destilada hasta su completa homogenización y se colocan en una piseta para su posterior uso.

3.- PROCESO

Se mezclan los 0.5 gramos de muestra fecal seca con 14.5 ml de solución de sulfato de zinc (Fig. 2a y 2b). Se mezcla vigorosamente (Fig. 2c) y durante la homogenización rápidamente se toma con una pipeta Pasteur el contenido suficiente

para llenar la cámara McMaster teniendo cuidado que no queden burbujas (Fig. 2d). Se le adiciona una gota de lodo a cada cámara y se deja reposar 10 minutos (Fig. 2e).

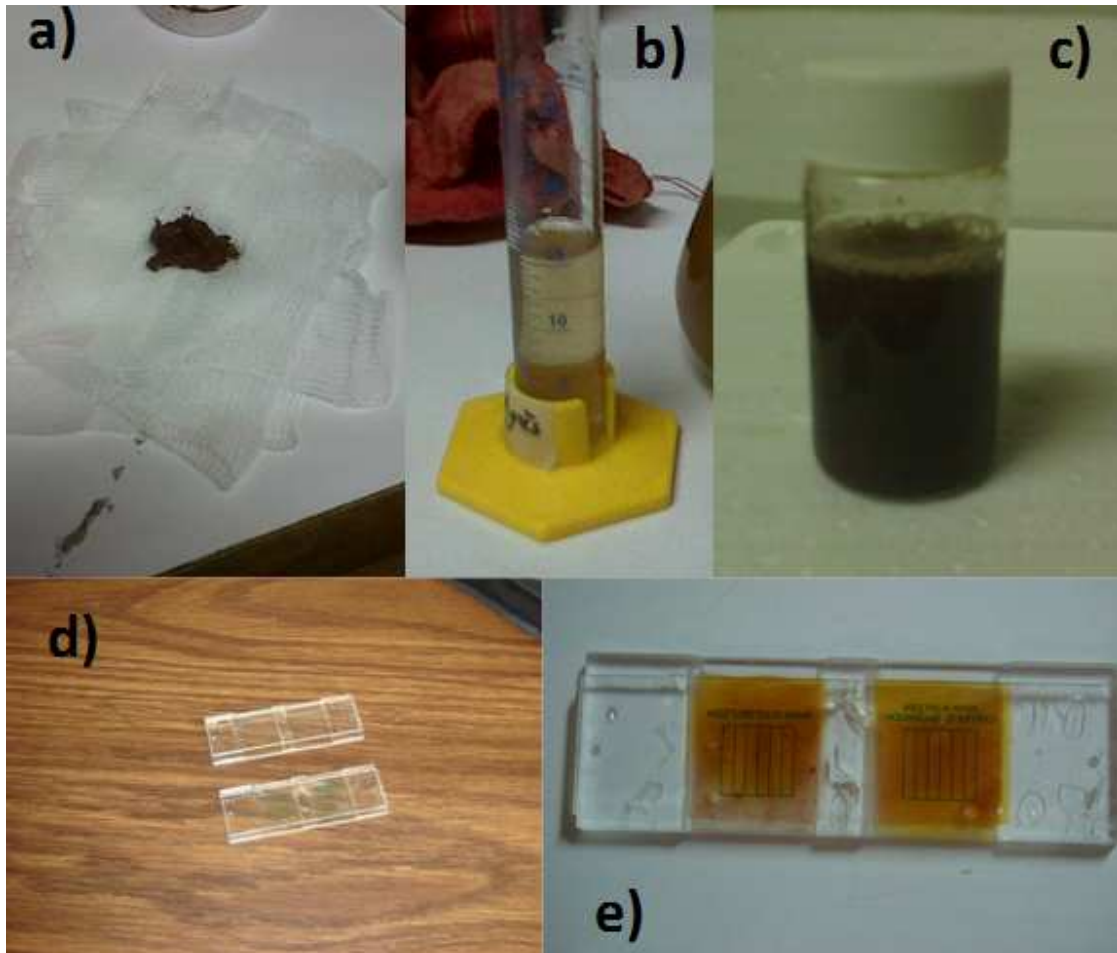


Figura 2: Procesado de la muestra para conteo

4.- LECTURA

La muestra es llevada al microscopio compuesto y es observada a 10x, 20x y 40x (Fig. 3a). Se mueve suavemente el tornillo micrométrico para ubicar la superficie de la cámara en la cual estarán los huevos por efecto de la flotación. Lamentablemente se vio restringida la observación al objetivo aceite de inmersión debido al grosor de la cámara (poco más de 1 milímetro) y a que los huevos por efecto de la flotación se encuentran pegados a la superficie. Se hacen los conteos solo dentro del área delimitada por el fabricante contando solo aquellos huevos que se encuentren

enteros o a un 90% de su morfología (Fig. 3b y 3c). Los conteos se registran por cámara individual.

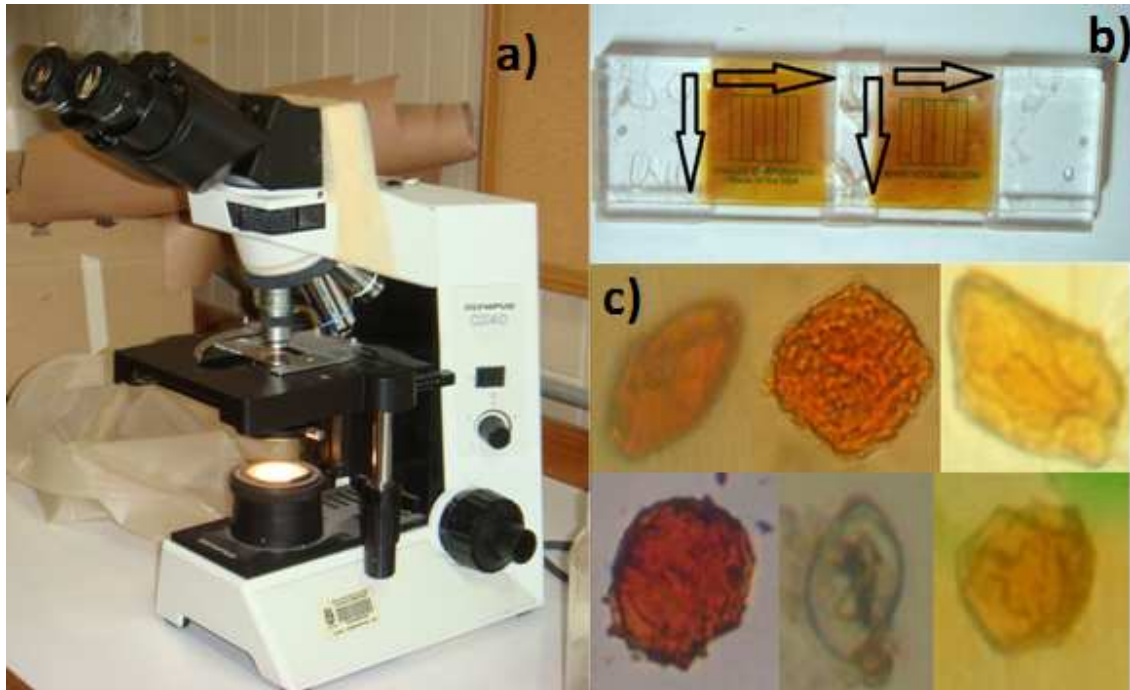


Figura 3: Lectura y conteo de huevos en la Cámara McMaster al microscopio compuesto.

5.- CÁLCULOS DE ESTIMACIÓN DE HUEVOS POR GRAMO DE HECES (HPG)

Si suponemos que en la primera cámara observamos 2 huevos y en la segunda 3 huevos, los cálculos pertinentes serían los siguientes: El volumen total de la mezcla (V_{tm}) es de 15 ml. (14.5 ml. de sulfato de Zinc más 0.5 gramos de heces secas) y la capacidad de volumen de la cámara es de 0.15 mililitros (V_c). Entonces si encontramos 2 huevos en la cámara 1 (HC1) y 3 en la cámara 2 (HC2) y el volumen total a extrapolar es 100 veces mayor, esto resultaría en un total de 200 y 300 huevos respectivamente por 0.5 gr. de muestra, sin embargo los conteos se estandarizan a 1gr. Por lo tanto, el conteo total sería 400 huevos para la primera cámara y 600 para la segunda. La intensidad de infección en huevos por gramo de heces para tal muestra es 500.

$$HPG = \frac{\left(\left(HC1 \times \frac{V_{tm}}{V_c} \right) \times 2 \right) + \left(\left(HC2 \times \frac{V_{tm}}{V_c} \right) \times 2 \right)}{2}$$