



EcoHealth Alliance



TALLER TEÓRICO – PRÁCTICO
“MONITOREO DE LA BIODIVERSIDAD Y LA
CONSERVACIÓN CON UN ENFOQUE ECOSISTÉMICO”



JANOS, CHIHUAHUA

MARZO, 2015



DIRECTORIO



EcoHealth Alliance

Melinda K. Rostal

rostal@ecohealthalliance.org



Asociación Mexicana de Medicina de la Conservación, Kalaan-Kab A.C.

Gerardo Suzán Azpiri
gerardosuz@gmail.com

Jesús Sotomayor Bonilla
chuchomayor16@gmail.com

Osca Rico Chávez
orichvet@gmail.com

Agradecemos el financiamiento del programa Wildlife Without Borders (Vida Libre Sin Fronteras), de la División de Conservación Internacional del U.S. Fish and Wildlife Service (Servicio de Pesca y Vida Libre de EEUU)

ÍNDICE

MÉTODOS PARA MEDIR LA DIVERSIDAD DE ESPECIES 1

CONCEPTO DE DIVERSIDAD BIOLÓGICA	1
DIVERSIDAD DE ESPECIES	2
INDICES PARA MEDIR LA DIVERSIDAD BETA	4
DIVERSIDAD GAMMA	6
DIVERSIDAD FILOGENÉTICA	6
DIVERSIDAD FUNCIONAL	8
REFERENCIAS	9
LECTURAS RECOMENDADAS	10
SOFTWARE RECOMENDADOS	31

GUÍA PARA EL ESTABLECIMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA INVESTIGACIONES EPIDEMIOLÓGICAS DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y NO INFECCIOSAS DE LA REGIÓN NORTE Y SIERRA MADRE 12

INTRODUCCIÓN	12
ORGANIZACIÓN DEL BANCO DE MUESTRAS	15
MÉTODOS PARA LA COLECCIÓN Y REGISTRO DE MUESTRAS NUEVAS	18
PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS ESTANDARIZADOS	20
POLÍTICA DE ACCESO	24
CONCLUSIONES	26
REFERENCIAS	28

MÉTODOS PARA MEDIR LA DIVERSIDAD DE ESPECIES

Oscar Rico Chávez

CONCEPTO DE DIVERSIDAD BIOLÓGICA

La biodiversidad o diversidad biológica se define como “la variabilidad entre los organismos vivientes de todas las fuentes, incluyendo, entre otros, los organismos terrestres, marinos y de otros ecosistemas acuáticos, así como los complejos ecológicos de los que forman parte; esto incluye diversidad dentro de las especies, entre especies y de ecosistemas” (1). El concepto de biodiversidad comprende diferentes escalas biológicas: desde la variabilidad en el contenido genético de los individuos y poblaciones (diversidad filogenética), el conjunto de especies que integran grupos funcionales y comunidades completas (diversidad taxonómica), hasta el conjunto de comunidades de un paisaje o región (Figura 1) (1–3)

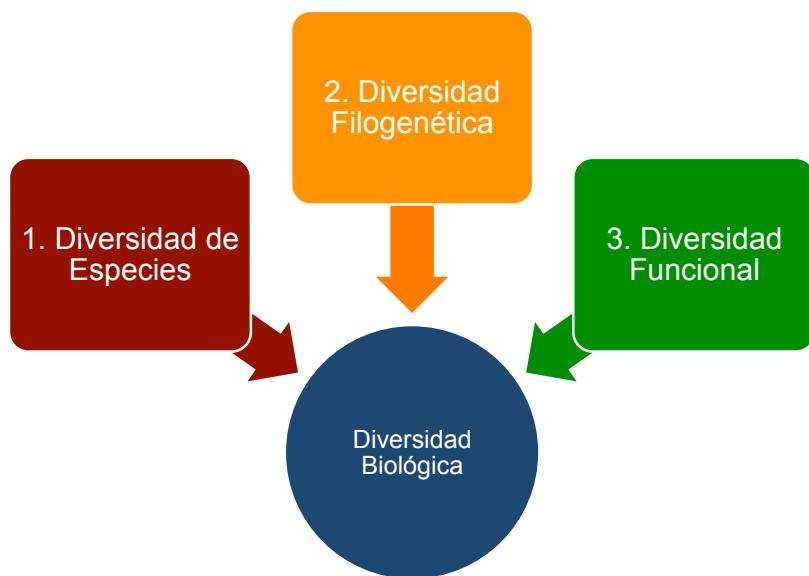


Figura 1. Componentes de la diversidad biológica.

DIVERSIDAD DE ESPECIES

La escala de biodiversidad más usada en inventarios de especies, así como en estudio de comunidades es la diversidad de especies. Con el objetivo de obtener información más allá de un listado de especies, la diversidad de especies puede considerar y dividirse en tres niveles: diversidad alfa, beta y gamma. Estos niveles estarán asociados a las escalas de trabajo requeridas por un objetivo específico, por lo que es importante definir la escala local y regional de nuestro estudio. Esta división de la diversidad de especies nos permitirá comprender los cambios de la biodiversidad con relación a la estructura del paisaje

DIVERSIDAD ALFA

Es el número (riqueza) de especies de una comunidad, definida como el conjunto de poblaciones de especies diferentes. Por lo tanto la diversidad alfa está relacionada a una escala local, por ejemplo una unidad de paisaje, un tipo de bosque, tipo de formaciones vegetales o tipo de asociación vegetal.

ÍNDICES PARA MEDIR LA DIVERSIDAD ALFA

Existen dos principales métodos para medir la diversidad alfa: a) Métodos directos, basados en la cuantificación del número de especies presentes en una localidad (riqueza específica) y b) Métodos basados en la estructura de la comunidad (abundancia relativa de los individuos, su biomasa, cobertura, productividad, etc.). Los métodos basados en la estructura pueden a su vez clasificarse índices de dominancia y en índices de equidad.

a) Métodos directos. La forma más simple de cuantificar la diversidad alfa

- *Riqueza de especies*: Número de especies por sitio de muestreo.
- *Índice de Margalef*: Relaciona el número de especies de un sitio con el número total de individuos.
- *Rarefacción*: Este método se usa cuando se tienen muestras de tamaño diferente. Calcula el número esperado de especies de cada muestra al reducirla la muestra de tamaño mayor para poder compararla con la muestra de tamaño menor.

Curvas de acumulación de especies. Estas curvas se utilizan para estimar el número de especies esperadas a partir de un muestreo. Este método muestra como el número de especies va acumulando en función del número acumulado de muestras.

Métodos no paramétricos. Se utilizan cuando no se asume una distribución estadística conocida de los datos. Generalmente se emplean cuando no se conoce el número de individuos, ya que no hay manera de conocer cómo se comporta la distribución de los individuos por cada especie dentro de la muestra.

- Chao2
- Jakknife
- Bootstrap

b) Métodos basados en la estructura de la comunidad.

Índices de dominancia. Toman en cuenta a las especies que están mejor representadas si tener en cuenta a las demás especies.

- *Índice de Simpson*: Calcula la probabilidad de que dos individuos obtenidos de una muestra de manera aleatoria correspondan a la misma especie.
- *Serie de Hill*: Es una medida del número de especies cuando cada una es

ponderada por su abundancia relativa. A medida que aumenta el número de especies, aquellas más raras se vuelven menos importantes.

Índices de equidad. Toman en cuenta la abundancia de cada una de las especies de la muestra y mide qué tan uniforme se encuentran distribuidas.

- *Índice de Shannon-Wiener.* Asume que todas las especies están representadas en las muestras. Su valor máximo esta representado por el logaritmo natural de la riqueza de especies presentes en la muestra.

DIVERSIDAD BETA

La diversidad beta es la medida de recambio o reemplazo en la composición de especies entre las comunidades que se encuentran en un área mayor. Normalmente los valores de diversidad beta se obtienen de comparaciones entre pares de unidades de paisaje, sin embargo esto dependerá de la definición que se haya hecho de comunidad.

INDICES PARA MEDIR LA DIVERSIDAD BETA

La diversidad beta (grado de recambio de especies entre dos o más localidades), se evalúa tomando en cuenta las diferencias o proporciones con la ayuda de índices o coeficientes que nos dicen que tan parecidas o no son dos localidades o muestras. Estas similitudes o disimilitudes se pueden cuantificar tanto con datos cualitativos (presencia – ausencia) como con datos cuantitativos (abundancia de especies). Los métodos para medir la diversidad beta se pueden dividir en: a) Métodos de similitud/disimilitud y b) Métodos de reemplazo/recambio de especies.

También es posible cuantificar la diversidad beta por medio de métodos de ordenación, los cuales usan matrices a partir de datos cualitativos o cuantitativos, en la que las muestras (comunidades o localidades) se ordenan

según las especies encontradas en cada una de ellas, para poder construir dendogramas o realizar análisis de agrupamiento.

Métodos de similitud/disimilitud

La similitud o disimilitud expresa qué tanto se parece la composición de especies y sus abundancias en dos muestras que pertenecen a comunidades o localidades diferentes.

Métodos Cualitativos: Se usan datos de presencia – ausencia para comparar la composición de especies.

- *Índice de Jaccard*: Relaciona el número de especies compartidas con el número total de especies exclusivas.
- *Índice de Sorensen*: Relaciona el número de especies compartidas con la media aritmética de las especies de ambos sitios

Métodos Cuantitativos: Expresan el parecido entre dos muestras considerando tanto la composición de especies como la abundancia de cada una de ellas.

- *Índice de Sorensen Cuantitativo*: Relaciona la abundancia de las especies compartidas con la abundancia total de las en las dos muestras.
- *Índice de Morisita-Horn*: Relaciona las abundancias específicas con las abundancias relativas y totales. Éste índice es altamente sensible a la abundancia de la especie dominante.

Métodos de Recambio/Reemplazo

Cuantifica cómo se complementa la composición de especies entre dos sitios, considerando a las especies exclusivas en relación con el número promedio de especies.

- *Índices de Whittaker, Cody y Magurran:* A partir de datos de presencia – ausencia en un conjunto de muestras o sitios, contrastan el promedio del número de especies por muestra o sitio contra el número total de especies. Es posible calcular el número de especies que se pierden o se ganan a medida que se comparan las muestras o sitios.
- *Índices de Complementariedad:* Miden el grado de complemento de dos muestras considerando el número de especies exclusivas de cada muestra o sitio y el número total de especies si unimos las dos muestras.

DIVERSIDAD GAMMA

La diversidad gama se define como la riqueza total de especies que existe en un área mayor, por ejemplo toda el área de estudio. Se entiende como la sumatoria de la diversidad alfa en todas las localidades del área de estudio. La diversidad gamma también se puede entender como el promedio de la riqueza alfa o una relación entre la riqueza total y el promedio de la diversidad beta.

DIVERSIDAD FILOGENÉTICA

El uso de filogenias se ha incrementado notablemente en la ecología de comunidades, debido a la necesidad de entender las relaciones de ancestría y dependencia entre las especies que conforman las comunidades y explorar teorías sobre la influencia de factores evolutivos y ecológicos que dan estructura a las comunidades.

Al igual que la diversidad taxonómica, la diversidad filogenética puede ser cuantificada como diversidad alfa, beta y gamma. La diversidad filogenética es una medida basada en las relaciones evolutivas entre las especies que conforman la muestra o comunidad (4)

Medidas de diversidad filogenética alfa

- Índice de Faith (PD): Calcula la suma de las longitudes de las ramas en una filogenia. Éste índice tiene una fuertemente correlacionado con la riqueza (número de especies) de cada sitio o muestra (Figura 2).
- Distinción evolutiva de las especies: La distinción evolutiva es calculada para cada especie presente en la comunidad, los valores se obtienen dividiendo la diversidad filogenética de un clado entre cada una de las especies presentes en todo el clado. Valores altos de distinción evolutiva indican que las especies tienen una historia evolutiva única.

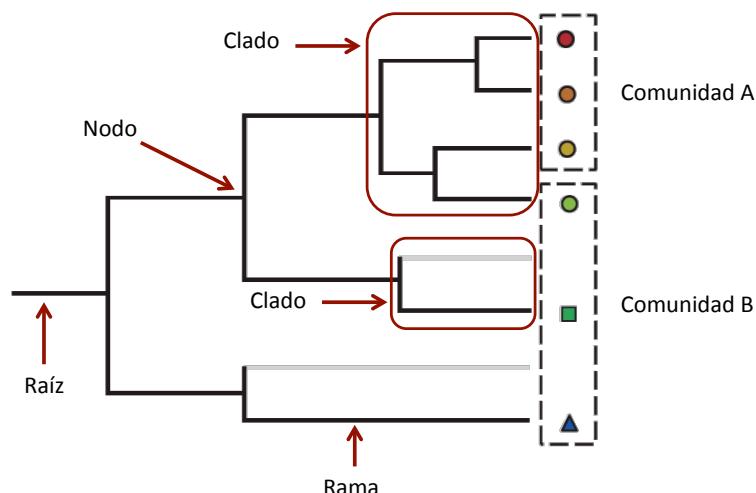


Figura 2. Componentes de un árbol filogenético. Aunque tengan el mismo número de especies, la comunidad A contiene menor diversidad filogenética que la comunidad B

Medidas de diversidad beta filogenética

La diversidad beta filogenética cuantifica las relaciones filogenéticas entre

miembros de distintas comunidades y provee información acerca de cuándo fueron separadas en tiempos evolutivos (5). Se ha propuesto que la disimilitud filogenética entre comunidades puede estar dada por el reemplazamiento de linajes entre sitios o comunidades (recambio filogenético) o por el incremento en la diferencia de la diversidad filogenética entre dos regiones (6)

DIVERSIDAD FUNCIONAL

La diversidad funcional se entiende como el componente de la biodiversidad que comprende el rango de características y actividades que las especies realizan dentro de sus ecosistemas, es decir su nicho ecológico (7). Para medir adecuadamente la diversidad funcional, se requiere idealmente de lo siguiente:

1. Información adecuada de los atributos o características de las especies para poder incluir información relevante y excluir información innecesaria.
2. Conocer los atributos de acuerdo a su relativa importancia.
3. Medida estadística del atributo o característica; variables cuantitativas vs cualitativas.
4. Medida de diversidad funcional que sea capaz de explicar y predecir la variación en los procesos de los ecosistemas.

La diversidad funcional puede ser cuantificada usando una variedad de índices que capturan diferentes aspectos de la distribución de los valores de un atributo o característica funcional dentro de una comunidad (8–10).

Medidas de diversidad funcional

- *Divergencia Funcional de un Atributo (FDvg):* Cuantifica la heterogeneidad en el valor del atributo dentro de la comunidad, representando esta la probabilidad de que dos especies tomadas al azar tengan distintos valores para un atributo dado (10,11).

- *Media ponderada-comunitaria de un Atributo (CWM)*: Calcula la media de los valores de un atributo en la comunidad, ponderado por la abundancia relativa de las especies que presentan cada valor para el atributo (12)

REFERENCIAS

1. UNEP. Convention on biological diversity. United Nations Environmental Program, Environmental Law and Institutions Program Activity Centre. Nairobi; 1992.
2. Solbrig OT. From genes to ecosystems: a research agenda for biodiversity. Cambridge University Press; 1991.
3. Halffter G, Ezcurra E. ¿Qué es la biodiversidad? Acta Zoológica Vol Espec CYTED-D. 1992;3–24.
4. Vane-Wright R., Humphries CJ, Williams PH. What to protect?—Systematics and the agony of choice. Biol Conserv. 1991;55:235.
5. Graham CH, Fine PV a. Phylogenetic beta diversity: linking ecological and evolutionary processes across space in time. Ecol Lett. 2008 Dec;11(12):1265–77.
6. Leprieur F, Albouy C, De Bortoli J, Cowman PF, Bellwood DR, Mouillot D. Quantifying phylogenetic beta diversity: distinguishing between “true” turnover of lineages and phylogenetic diversity gradients. PLoS One. 2012 Jan;7(8):e42760.
7. Petchey OL, Gaston KJ. Functional diversity: back to basics and looking forward. Ecol Lett [Internet]. 2006 Jun [cited 2014 Jan 20];9(6):741–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16706917>
8. Ricotta C. A note on functional diversity measures. Basic Appl Ecol. 2005;6:479–86.
9. Petchey OL, Gaston KJ. Functional diversity: back to basics and looking forward. Ecol Lett [Internet]. 2006 Jun [cited 2014 Jul 9];9(6):741–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16706917>
10. Lavorel S, Grigulis K, McIntyre S, Williams NSG, Garden D, Dorrough J, et al. Assessing functional diversity in the field - Methodology matters! Functional Ecology. 2008. p. 134–47.

11. Díaz S, Lavorel S, de Bello F, Quétier F, Grigulis K, Robson TM. Incorporating plant functional diversity effects in ecosystem service assessments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:20684–9.
12. Garnier E, Cortez J, Billès G, Navas ML, Roumet C, Debussche M, et al. Plant functional markers capture ecosystem properties during secondary succession. *Ecology*. 2004;85:2630–7.

LECTURAS RECOMENDADAS

- Baselga, A., 2010. Partitioning the turnover and nestedness components of beta diversity. *Global Ecology and Biogeography* 19(1), 134–143.
- Calderón-Patrón, J.M., Moreno, C.E., Zuria, I., 2012. La diversidad beta: medio siglo de avances. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 83(3), 879–891.
- Davies, T.J., Buckley, L.B., 2011. Phylogenetic diversity as a window into the evolutionary and biogeographic histories of present-day richness gradients for mammals. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 366(1576), 2414–25.
- Faith, D.P., 1992. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological Conservation* 61(1), 1–10.
- Helmus, M.R., Bland, T.J., Williams, C.K., Ives, A.R., 2007. Phylogenetic Measures of Biodiversity. *The American Naturalist* 169, E68–E83.
- Isaac, N.J.B., Turvey, S.T., Collen, B., Waterman, C., Baillie, J.E.M., 2007. Mammals on the EDGE: conservation priorities based on threat and phylogeny. *PloS one* 2(3), e296.
- Mason, N., Mouillot, D., Lee, W., Wilson, J., 2005. Functional richness, functional evenness and functional divergence: the primary components of functional diversity. *Oikos* 1(February), 112–118.
- Moreno, C.E., Rodríguez, P., 2010. A consistent terminology for quantifying species diversity? *Oecologia* 163(2), 279–82.
- Petchey, O.L., Gaston, K.J., 2006. Functional diversity: back to basics and looking forward. *Ecology letters* 9(6), 741–58.
- Safi, K., Cianciaruso, M. V, Loyola, R.D., Brito, D., Armour-Marshall, K., Diniz-Filho, J.A.F., 2011. Understanding global patterns of mammalian functional

and phylogenetic diversity. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 366(1577), 2536–44.

SOFTWARE RECOMENDADO

A. PROGRAMAS IMPLEMENTADOS EN R (R CORE TEAM, 2103)

Baselga, A., Orme, C., 2013. betapart: an R package for the study of beta diversity. *Methods Ecol.Evol.* 3, 808–812.

Debastiani, V., Pillar, V., 2012. SYNCNA—R tool for analysis of metacommunities based on functional traits and phylogeny of the community components. *Bioinformatics* 1–2.

Dixon, P., 2003. VEGAN, a package of R functions for community ecology. *Journal of Vegetation Science* 14(6), 927–930.

Kembel, S.W., Cowan, P.D., Helmus, M.R., Cornwell, W.K., Morlon, H., Ackerly, D.D., Blomberg, S.P., Webb, C.O., 2010. Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology. *Bioinformatics* 26, 1463–1464.

Kindt, R., Coe, R., 2005. Tree diversity analysis; A manual and software for common statistical methods for ecological and biodiversity studies, World.

R Core Team, 2013. R: A Language and Environment for Statistical Computing.

B. OTROS PROGRAMAS LIBRES

Casanoves, F., Pla, L., Di Rienzo, J. a., Díaz, S., 2011. FDiversity: a software package for the integrated analysis of functional diversity. *Methods in Ecology and Evolution* 2(3), 233–237.
<https://sites.google.com/site/functionaldiversity/downloads>

Colwell, R., 2009. EstimateS : Biodiversity Estimation. *Diversity* 1–23.
<http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates/>

Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4, 9–18. <http://folk.uio.no/ohammer/past/>

GUÍA PARA EL ESTABLECIMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA INVESTIGACIONES EPIDEMIOLÓGICAS DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y NO INFECCIOSAS DE LA REGIÓN NORTE Y SIERRA MADRE

Esta sección es la adaptación del capítulo “El establecimiento de bancos de suero para investigaciones epidemiológicas de enfermedades infecciosas en mamíferos marinos”, escrito por A. Alonso Aguirre, Melinda K. Rostal, Thomas J. Keef, del libro “New directions in conservation medicine: Applied cases of ecological health”, editado por A. Alonso Aguirre, Richard S. Ostfeld, Peter Daszak. Ch.39. 'The Establishment of Serum Banks for Eco-Epidemiological Investigations of Infectious Diseases in Marine Mammals' by A. Alonso Aguirre, Melinda K. Rostal, Thomas J. Keefe from "New Directions in Conservation Medicine: Applied Cases of Ecological Health" edited by Aguirre, Alonso Ostfeld, R. & by Daszak, P. (2012) Free permission Authors own material.

Traducción y adaptación de Jesús Sotomayor-Bonilla, Melinda K. Rostal y Gerardo Suzán

INTRODUCCIÓN

En México no existe ningún **banco de muestras biológicas** de fauna silvestre para fines de investigación y educación. En otros países, algunas organizaciones zoológicas y de rehabilitación de fauna han resguardado muestras biológicas, como suero y tejidos [1]. Sin embargo, hay pocos bancos cuyas muestras estén disponibles para el público, como el Banco Nacional de Tejidos de Mamíferos Marinos (BNTMM) de Estados Unidos. El objetivo de desarrollar un banco regional de muestras biológicas es mantener una colección de referencia a largo plazo sobre la salud del ecosistema. Su uso puede involucrar diversos estudios para evaluar la salud de un animal o el estatus de una enfermedad en alguna población. Los datos pueden servir para determinar si las enfermedades

son endémicas en una población determinada, si un patógeno emerge en un área geográfica o en una población nueva, y para establecer una línea base para estudios posteriores. Asimismo, con el material resguardado podrán aplicarse diferentes herramientas diagnósticas como: bioquímica sanguínea, hematología, serología, endocrinología, virología, epidemiología molecular, componentes nutricionales, cultivos bacteriológicos, microscopía de hemoparásitos, toxicología, etc. Un banco regional de muestras proveerá una fuente útil para el monitoreo de la biodiversidad en tiempo real y para realizar futuros análisis retrospectivos.

Las **muestras biológicas** obtenidas durante el monitoreo podrán ser utilizadas para estudios epidemiológicos de **agentes infecciosos** que atenten contra la conservación de las especies. Los eventos de mortalidad que causan dichos agentes pueden jugar un papel importante en los procesos ecológicos en distintos niveles de organización biológica, con implicaciones importantes para la genética y la evolución de las especies [2, 3]. A nivel poblacional, las **enfermedades** pueden causar una mortalidad severa, incrementar la susceptibilidad a la depredación y disminuir el potencial reproductivo. Sin embargo, no existe un indicador efectivo para determinar si una enfermedad impacta alguna población [4, 5]. Además, una enfermedad puede ser un evento catastrófico para una especie amenazada conduciéndola a la extinción [6]. Por ejemplo, los eventos de mortalidad de hurones de patas negras y de perritos de la pradera por distemper canino y peste bubónica, respectivamente (ver Cuadro 1).

Cuadro 1. Ejemplos de eventos de extinción de poblaciones silvestres por enfermedades infecciosas.

1) Caso 1. Distemper Canino en hurones de patas negras

En 1981, existía una población de 120 hurones de patas negras (*Mustela nigripes*) en su hábitat natural en México y EU. Sin embargo, ocurrió una alta mortalidad causada por del virus del distemper canino (CDV), que llevó a la extinción local de la especie. En respuesta, el Servicio de Pesca y Vida Silvestre de Estados Unidos (USFWS) emprendió un exitoso programa de reproducción en cautiverio de hurones de patas negras. En 2001, investigadores de la UNAM y del USFWS liberaron a 62 ejemplares dentro de la Reserva de la Biosfera Janos-Casas Grande, por lo que esta población necesita ser monitoreada para medir las acciones para su conservación, así como para reconocer otras amenazas para su repoblación.

2) Caso 2. Peste Bubónica y perritos de las praderas

Una de las principales fuentes de alimento de los hurones son los perritos de las praderas (*Cynomys ludovicianus*), otra especie en peligro de extinción. Esta especie es altamente susceptible a la bacteria *Yersinia pestis*, causante de la enfermedad conocida como peste bubónica. Esta enfermedad afecta de distintas maneras a varias especies, incluyendo al hombre. Sin embargo, es fatal para los perritos de las praderas.

A partir de un banco de muestras biológicas pueden implementarse distintas herramientas diagnósticas, dentro de las cuales la serología ha sido muy importante para diagnosticar y detectar los **brotes epidémicos**. Por ejemplo, las muestras de suero almacenadas en el Centro de Mamíferos Marinos de Estados Unidos (CMM) permitió la evaluación retrospectiva (de 11 años) de los títulos de anticuerpos contra *Leptospira* sp. en lobos marinos de California, demostrando que la enfermedad no sólo es endémica, sino que también provoca brotes epidémicos periódicos [7]. Sin el acceso al banco de suero, la epidemiología y ecología de la leptospirosis en los lobos marinos de California no se reconocería. La serología también puede ser utilizada en estudios con especies amenazadas, para demostrar si algunos patógenos han estado en contacto y si desempeñan un papel en su declive. En ocasiones, no se ha logrado determinar el impacto de las enfermedades en las poblaciones debido a inconsistencias en los datos disponibles [8], lo cual resalta la importancia de generar un banco de muestras biológicas regional con protocolos estrictos para evaluar, solicitar datos y acceder

a las muestras.

ORGANIZACIÓN DEL BANCO DE MUESTRAS

El siguiente protocolo describe el procesamiento, almacenamiento y caracterización analítica de las muestras biológicas colectadas durante los proyectos de monitoreo de fauna silvestre, cacería deportiva, atención a mortalidades, etc. El objetivo es asegurar que las muestras biológicas se manejen adecuadamente para su almacenamiento a largo plazo, y si es necesario, que dichas muestras lleguen en óptimas condiciones a un laboratorio de referencia para estudios posteriores. Es necesario atenerse estrictamente a este protocolo para asegurar que las muestras sean preservadas apropiadamente y de manera estandarizada, que estén disponibles para estudios posteriores, y que los análisis obtenidos tengan validez suficiente para ser utilizados en el manejo de cierta especie o enfermedad.

Los pasos a considerar durante la creación del banco de muestras regional incluyen:

1. Identificación de los participantes, incluyendo personas de instancias gubernamentales y no-gubernamentales.
2. Instalaciones de almacenamiento.
3. Creación de un comité de revisión.
4. Establecimiento de una política de acceso de muestras nuevas o muestras previamente colectadas.
5. Desarrollo de procedimientos operativos estandarizados (POEs), incluyendo formatos para datos, mantenimiento de base de datos, etc.
6. Implementación de un programa de garantía de calidad de las muestras.
7. Creación de una política para el acceso a las muestras almacenadas para estudios epidemiológicos.

Estas recomendaciones son flexibles y no representan un consenso de las organizaciones participantes. Además, el catálogo de muestras debe ser mantenido rutinariamente y estar disponible vía internet para todos los usuarios.

Funciones del consejo de revisión

El consejo de revisión lo conforman un equipo de científicos y representantes de las organizaciones involucradas. Es recomendable que sea multidisciplinario (incluyendo a veterinarios, biólogos, epidemiólogos, ecólogos, biólogos moleculares, etc.) y que sus integrantes se actualicen anualmente. Este consejo generará y hará cumplir las políticas del banco de muestras. También determinará los requerimientos para el ingreso de nuevos colaboradores, el almacenamiento de las muestras y el uso de las muestras o los datos para estudios eco-epidemiológicos.

Ingreso de muestras anteriormente colectadas

Se recomienda la colaboración con colecciones biológicas existentes para incorporar nuevas muestras en el banco. La adquisición de este tipo de muestras y el acceso a las mismas requiere de una colaboración inter-institucional para proveer los datos básicos, así como respetar las políticas de las instituciones participantes. Finalmente, se debe demostrar que las muestras han sido almacenadas de acuerdo a las políticas del banco de muestras.

Los datos básicos requeridos para el acceso de muestras previamente existentes comprenden:

1. Datos del evento de colección: nombre, dirección y número telefónico de instituciones de colecta y custodia; breve código de descripción/actividad de la colección (ej: monitoreo, cacería deportiva, liberaciones de animales vivos, etc.).
2. Datos de muestra individual: especie, sexo, edad, tipo de muestra, número

de identificación, fecha de colecta, localización geográfica, identificación del lote, información adicional sobre aspectos clínicos, epidemiológicos, resultados de análisis diagnósticos y disponibilidad de las muestras.

Se diseñará una base de datos digital para la identificación de las muestras. Esto incluye el desarrollo de números de registro o acceso para crear un código único estandarizado y/o un código de barras, en donde se pueda incluir algunos datos del evento y de la muestra. Por ejemplo, se puede implementar un código con la siguiente información: __ (código geográfico) __ (especie) __/__/__ (fecha: yyyyddmm) __ (código institucional). De esta manera, el código "JA-Cl-20151803KK" podría identificar una muestra como: Janos, *Cynomys ludovicianus*, capturado el 18 de marzo 2015, muestreo realizado por Kalaan Kab AC. El uso de los códigos estandarizados, los valores del código, las unidades de los resultados, y la capacidad para mapear los datos permitirán que los datos sean rastreados eficientemente.

Los colecciones biológicas que donen muestras no requieren tener los mismos datos en el catálogo, pero la información debe estar disponible para todos los usuarios. Es necesario obtener la mayor cantidad de datos por muestra, y las muestras que no cuenten con los datos básicos serán rechazadas. Solamente el personal autorizado, seleccionado por el consejo de revisión, podrá aceptar o rechazar las muestras. Los lineamientos para rechazar el ingreso de muestras incluyen, pero no se limitan a:

1. Número de identificación de la muestra impropio y inadecuado.
2. Uso de tubo de colección de la muestra impropio.
3. Cantidad de muestra insuficiente.
4. Muestras en malas condiciones de conservación.
5. Si la sangre con anticoagulante está coagulada.
6. Si la muestra es transportada inadecuadamente (rompimiento de cadena fría).
7. Si los tubos no están debidamente cerrados.

8. Errores en el procesamiento y manejo de las muestras.

MÉTODOS PARA LA COLECCIÓN Y REGISTRO DE MUESTRAS NUEVAS

Colección de muestras y separación de suero o plasma

Anteriormente, se han descrito procedimientos para la obtención y procesamiento de muestras biológicas [9-12]. Sin embargo, es importante considerar ciertos pasos para la colección y el procesamiento que pueden afectar la calidad de algunas muestras. Por ejemplo, con las muestras de suero o plasma, los tubos de EDTA y heparina de litio deben ser inmediatamente depositados en hielo seco o en refrigeración (a 4°C) después de la colecta de sangre. Asimismo, se recomienda preparar dos frotis sanguíneos a partir de los tubos con EDTA, centrifugar todos los tubos a 10,000 rpm por 10 minutos, extraer el plasma con una pipeta, depositarlo en un **crio-vial** y almacenarlo inmediatamente en un congelador. Las células sanguíneas rojas y blancas deben ser guardadas en crioviales separados y congeladas inmediatamente. Los tubos de tapa roja deben permanecer a temperatura ambiente (18-20°C) de 30 minutos a una hora (no exceder más de una hora). Retrasar la centrifugación por más de una hora puede alterar la muestra, por ejemplo, puede disminuir el sodio, potasio, creatinina, glucosa, urea y valores de globulinas, así como aumentar el calcio, fósforo, proteína total y valores de albumina. Una vez que se retrae el coágulo, la muestra se centrifuga nuevamente a 10,000 rpm durante 10 minutos. Se recomienda usar una pipeta estéril para separar el suero en un crio-vial de 1 ml (previamente identificado), que deberá ser congelado de inmediato. Los crio-viales con capacidad de 1 ml son los más utilizados en los bancos de suero. Éstos no deben estar sobrellenados para permitir la expansión de la muestra durante la congelación y deben estar bien cerrados.

Dividir las muestras en pequeñas proporciones (**alícuotas**) sirve para protegerlas contra una posible pérdida completa u otros efectos negativos asociados al congelamiento y descongelamiento repetido del material biológico [13]. Por ejemplo, la estabilidad de las extracciones de ácidos nucleicos (ADN o ARN) después de congelarlas y descongelarlas depende del volumen

almacenado. Se dice que 100 µl no son estables después de tres ciclos de congelación-descongelación, en comparación con el volumen total de 1 ml de extracción de DNA de *Toxoplasma gondii*, el cual fue estable tras 14 ciclos de congelación-descongelación [14]. Se recomienda que un duplicado de la muestra esté disponible para usarse en diversos proyectos de investigación y otro se mantenga almacenado a largo plazo.

Las muestras de suero también se pueden conservar en seco y temperatura ambiente, utilizando tiras de papel filtro “Nobuto”. Estas tiras de papel deben ser llenadas de sangre adecuadamente para garantizar suficiente cantidad de proteínas (anticuerpos) en la muestra, como se muestra en la Figura 1. Su almacenamiento puede ser dentro de sobres de papel, en una gaveta libre de humedad.

Etiquetado y colección de los datos

La etiqueta de los viales debe contar con la siguiente información:

1. Número de muestra (ej.: 1/3, 2/3 y 3/3 si se hicieron tras alícuotas).
2. Tipo de muestra (sangre, suero, tejido, etc.).
3. Fecha de colecta.
4. Número de identificación del individuo y/o código de barras.
5. Especie.

Los datos mínimos para el registro de muestras incluyen:

1. Institución colaboradora y contacto de la custodia.
2. Código de colección y la fecha de colecta.
3. Código de especies.
4. Identificación de campo.
5. Datos biológicos: edad, sexo, estatus reproductivo, localización geográfica, factores temporales.
6. Datos de salud: diagnosis, datos clínicos, tratamientos y disposición del animal.
7. Tipo de muestra (ej: tubo con EDTA, crio-vial, etc.).

8. Método de colecta.
9. Tipo de vial de colecta.
10. Cantidad de la muestra.
11. Ubicación de las muestras almacenadas, números de identificación (ej: JA-Cl-20151803KK), y cualquier instrucción especial de colecta y procesamiento.

Tal como se discutió para el registro de las muestras previamente colectadas, las nuevas adquisiciones deberán ser identificadas según los códigos estandarizados por el consejo de revisión y recibirán su respectivo código de identificación único. Los números de registro, identificación del individuo y la fecha de colecta deben ser verificados para el ingreso de los datos dentro de la base electrónica.

PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS ESTANDARIZADOS

Almacenamiento y cadena fría

La organización emisora deberá enviar las muestras ordenadamente. Las muestras que ingresen al banco necesitan estar organizadas en cuanto arriben, en **crio-cajas** previamente identificadas. Pueden utilizarse crio-cajas parcialmente llenas. Durante la reorganización de las muestras, las crio-cajas deben ser mantenidas en hielo (de preferencia hielo seco) para no romper la cadena fría. Sin embargo, los crio-viales individuales no deben estar en contacto directo con el hielo seco porque pueden romperse. Terminando esta reorganización, las crio-cajas deben meterse inmediatamente en el congelador o ultracongelador.

Las muestras deben ser organizadas por su número de identificación y se debe generar un código de localización dentro del banco de muestras, el cual debe incluir:

1. Número del congelador.
2. Código para la sección dentro del congelador.
3. Número de caja.
4. Ubicación dentro de la caja.

Los códigos de localización detallados minimizarán la búsqueda de material alargando la vida media del congelador. Los registros deben mantenerse en formato impreso y electrónico, y deben incluir lo siguiente:

1. Código de localización del vial descrito anteriormente.
2. Número de viales por cada individuo.
3. Identificador individual de la muestra.
4. Cantidad de muestra.

La información debe ser suficiente como para localizar, por ejemplo, que del espacio 40 al 50 de la crio-caja 6 en el compartimento 2, del lado izquierdo del congelador 1, ubicado en el rancho “El Uno”, en Janos, Chih., tiene 11 viales de 1ml, pertenecientes al roedor JA-CI-20151803KK.

Es sencillo implementar el sistema de código de barras para rastrear muestras biológicas [15]. Por ejemplo, EcoHealth Alliance recientemente implementó un sistema de código de barras desde hace 3-5 años para la investigación de enfermedades infecciosas emergentes en fauna silvestre en México, Brasil y Bolivia (Rostal *comunicación personal*, 2015).

Descongelamiento para preparación de muestras

Si las muestras son requeridas para algún proyecto de investigación, debe separarse la cantidad solicitada mediante un rápido descongelamiento. Este procedimiento se logra a una temperatura de 35-37 °C, en “**baño maría**” constante y agitándolo gentilmente. La muestra debe ser removida asépticamente con una pipeta para dividir (**alicuotar**) la muestra. Las alícuotas se deberán almacenar como se indicó anteriormente.

El almacenamiento a corto plazo consiste en la congelación de muestras de -20 a -3°C, de preferencia con agentes protectores. Mientras tanto, el almacenamiento a largo plazo consta de ultracongelación a temperaturas menores a -20 °C, o de **liofilización**. Existe diferencia entre el almacenamiento a diferentes temperaturas, por lo que es importante considerar sus efectos. Por

ejemplo, al congelar el suero a -3°C , se disminuyen algunas actividades enzimáticas como la creatinin-quinasa [16]. Asimismo, los títulos de anticuerpos para algunos patógenos disminuyen relativamente rápido a -20°C [17]. A pesar de los inconvenientes de los diferentes métodos de almacenamiento, es razonable establecer los cimientos de un banco de muestras biológicas con una infraestructura limitada, como un congelador de -20°C.

Consideraciones para la seguridad humana

Se deben considerar cuidados de seguridad durante la manipulación, preservación y procesamiento de cualquier muestra biológica. Por ejemplo, las temperaturas de ultracongelación podrían exponer al personal a un frío extremo. Por lo tanto, el personal debe llevar guantes de aislamiento térmico y batas de manga larga para proteger su piel de alguna exposición. Otro ejemplo son los crioviales mal cerrados, los cuales se pueden romper o explotar cuando se recuperan del nitrógeno líquido. De esta manera, una careta de plástico debe ser obligatoria durante este procedimiento. Es muy importante que el personal que manipule las muestras esté debidamente entrenado para evitar cualquier tipo de riesgo. Asimismo, es necesario contar con el equipo de protección personal (EPP) adecuado para prevenir la transmisión de enfermedades infecciosas, trabajando al menos como un laboratorio **con Nivel de Bioseguridad 2**.

Programa de medición de la calidad

El programa de medición de calidad (PMC) es un sistema de acciones planeadas para asegurar la calidad e integridad de los datos. Un PMC minimiza el potencial de la variación o error debido al almacenamiento y manejo de las muestras, los cuales puedan afectar la interpretación de los resultados. Los componentes del PMC incluyen: control de calidad de las muestras, un programa de estabilidad en el almacenamiento a largo plazo, el desarrollo de métodos analíticos y de controles estandarizados, y la estandarización de los registros guardados.

Control de calidad

El control de calidad (CC) utiliza técnicas estadísticas de monitoreo, examinación y análisis para determinar (activa y continuamente) si el equipo, los reactivos y los operadores están funcionando correctamente bajo los estándares establecidos por el comité de revisión. Un adecuado diseño y ejecución del programa de CC incrementa la precisión de los resultados [15, 18]. El CC incluye el mantenimiento de equipo e instalaciones, certificaciones de calibración según los intervalos requeridos, inspección del desempeño diario/rutinario del equipo y personal, entrenamiento y certificación del personal, monitoreo de materiales de uso rutinario, bitácora de mantenimiento de registros de temperatura (en cuartos fríos, congelador, etc.), recepción de materiales, desecho de residuos y auditorías internas rutinarias.

Para la integridad de las muestras es crítico que no ocurran interrupciones en la cadena fría, ya que como mencionamos anteriormente, los ciclos de descongelación-congelación disminuyen la calidad de las muestras. Por lo tanto, la temperatura de las instalaciones de almacenamiento debe monitorearse continuamente. Las áreas de almacenamiento que requieren monitoreo de la temperatura son: el interior cuarto ($17\text{-}28^{\circ}\text{C}$), refrigeradores ($2\text{-}8^{\circ}\text{C}$) y congeladores (-4°C).

Programa de estabilidad a largo plazo

Este programa está diseñado para evaluar la integridad de las muestras almacenadas mediante la evaluación de las mismas y/o sus **analitos**. Un número de muestras representativo estará sujeto a evaluación periódica, de acuerdo a los intervalos establecidos (anual, mensual). Por ejemplo, es posible comparar la integridad de las muestras resguardadas con muestras de referencia de la misma organización donante. Este programa debe incluir al menos una examinación visual de las muestras.

Estandarización de controles y pruebas de laboratorio

Este proceso es importante para asegurar que los resultados del diagnóstico sean compatibles y comparables [19]. Los componentes de esta estandarización incluyen la comparabilidad entre diagnósticos realizados por distintos laboratorios; el desarrollo, análisis y distribución de controles positivos, estándares de referencia y nuevas técnicas para la detección de enfermedades en animales silvestres; y el mantenimiento de los registros que sustenten la conformidad entre las instituciones involucradas.

Es importante desarrollar métodos analíticos estandarizados y que los utilicen todos los laboratorios participantes para lograr resultados comparables. Es necesario revisar los métodos y protocolos de validación con el apoyo de expertos en los diferentes temas (especies silvestres, técnicas diagnósticas, etc.). Además, es conveniente que el consejo de revisión gestione la colaboración con laboratorios de referencia para realizar diagnósticos de rutina en animales silvestres.

Documentación de la estandarización

Es muy importante documentar los protocolos estandarizados para garantizar su buena ejecución durante todas las etapas de evaluación. Los planes de validación y los resultados también deben ser documentados para respaldar la precisión de las pruebas realizadas. Asimismo, es necesario compilar y distribuir reportes periódicos (anuales o bianuales) a los miembros del consejo de revisión, describiendo los métodos de CC implementados en el banco de muestras.

POLÍTICA DE ACCESO

El consejo de revisión debe garantizar que el banco de muestras esté regido por una política sobre el uso de las muestras que alberga. Esto incluye el diseño de un formato de solicitud de ingreso de las muestras y de otro formato para acceder a las mismas. El consejo de revisión creará un comité técnico constituido al menos por tres miembros representantes de los grupos de trabajo, investigación y/o instituciones involucradas. Dicho comité puede enviar las

solicitudes de uso de las muestras a expertos externos para una revisión científica, antes de permitir su uso para cualquier fin.

El formato de solicitud debe incluir la siguiente información: nombre del investigador principal y la institución afiliada, muestras específicas (incluyendo especie y grupo de edad) y cantidad solicitada, propósito de la investigación, justificación para el uso de las muestras, nombre del laboratorio en donde se realizarán los análisis, procedimientos de control de calidad de los análisis y fecha estimada de la culminación de los análisis. Además, los investigadores deben enviar un convenio firmado para reportar los resultados al banco de muestras para su posterior inclusión en la base de datos interna. Todas las publicaciones y presentaciones en donde se aprovechen los datos o resultados generados a partir de muestras del banco, deben agradecer explícitamente al banco de muestras y a la institución que contribuyó originalmente para su adquisición. Se generarán duplicados de las muestras recibidas, si su cantidad original lo permite (A y B). El 50% de cada muestra (A) será almacenada a largo plazo, y el 50% (B) estará disponible para la comunidad científica y para su uso en proyectos de investigación. La solicitud formal de las muestras B serán enviadas al comité de revisión. El uso parcial de la muestra A estará restringido y podrá ser sólo hasta que la muestra B se haya terminado. El diseño experimental para el uso de las muestras A será revisado por expertos externos y/o por manejadores de poblaciones silvestres involucrados en los proyectos.

El acceso a los datos del banco no implica el acceso a las muestras biológicas u otros datos de identificación individual. Existirán dos niveles de acceso a la información: los datos públicos (base de datos básica) y los datos restringidos de muestras específicas, que incluyen datos biológicos y análisis de laboratorio. El acceso a los datos restringidos será autorizado por el consejo de revisión. La información sobre el uso de las muestras biológicas debe incluir los medios de colecta (datos a nivel de muestra) y almacenamiento (datos a nivel de la colección).

Existen distintas herramientas estadísticas para calcular el tamaño mínimo de muestra necesarios para validar los estudios ecológicos que surgen a partir de

este banco de muestras. El comité de revisión será el encargado de evaluar esta validez estadística. Para obtener más información sobre dichas herramientas, así como otros análisis empleados en estudios epidemiológicos se recomienda consultar a DiGiacomo y Koepsell (1986; [20]), Thrusfield (2005; [21]), Wobeser (2007; [22]), y Aguirre et al. (2012; [23]).

CONCLUSIONES

El desarrollo de un banco regional de muestras biológicas es necesario y pertinente debido a la emergencia de nuevas enfermedades emergentes provocadas por agentes infecciosos y tóxicos. Los POEs y los requerimientos de CC para el banco de muestras permite desarrollar estudios epidemiológicos de alta calidad. Además, el estricto análisis del comité de revisión conformado por científicos calificados garantizará que las muestras almacenadas sean mantenidas adecuadamente en proyectos de investigación. Finalmente, la participación de profesionales de distintas disciplinas afines permitirá que se utilice un tamaño de muestra suficiente en los estudios, con la calidad adecuada para utilizar estos invaluosables recursos.

Cuadro 2. Glosario

- **Banco de muestra biológicas:** Es un establecimiento público o privado que se encarga de recolectar, almacenar, procesar, suministrar y/o analizar muestras biológicas para su uso en la investigación científica o con fines diagnósticos. y organizada como una unidad técnica con criterios de calidad, orden y destino.
- **Muestra biológica:** Es un organismo vivo o parte de un individuo (órgano, tejido, células, orina, sangre, pelo, ácidos nucléicos, etc.) que se considera representativo de los caracteres de la población a la que pertenece.
- **Agente infeccioso, agente causal o patógeno:** Cualquier agente o factor que pueda producir enfermedad. Son microrganismos (prion, virus, bacteria, hongo, protozoario o helminto) que pueden producir daño o desencadenar una enfermedad en un hospedero.
- **Huésped, hospedero u hospedador:** Ser vivo que en circunstancias naturales permite la subsistencia o el alojamiento de un agente patógeno.
- **Enfermedad:** una condición de discapacidad que interfiere o modifica el desempeño de las funciones o estructuras normales de un ser vivo, incluyendo las respuestas a factores ambientales como la nutrición, tóxicos, clima, agentes infecciosos, defectos congénitos, o combinaciones de estos factores (Wobeser 1994).
Es el desequilibrio funcional del organismo de un individuo por agresión de un agente externo o por alteración del propio organismo, que no ha podido ser compensado por los mecanismos de homeostasis. (Trigo, Patología)
- **Crio-vial o crio-tubo:** Frasco pequeño generalmente de polipropileno diseñado para el almacenamiento de material biológico, sustancias o reactivos, etc.
- **Alícuotas:** Parte que se toma de un volumen (alícuota líquida) o de una masa (alícuota sólida) total inicial.
- **Crio-caja:** Cajas de cartón o polipropileno diseñadas para guardar muestras en viales, la cual soporta muy bajas temperaturas para su almacenamiento en congeladores o súper congeladores.
- **Liofilización:** Proceso en el que se congela el producto y se introduce en una cámara de vacío para realizar la separación del agua por sublimación.
- **Nivel de Bioseguridad 2:** Existen cuatro niveles de bioseguridad para el manejo de agentes infecciosos que representan un riesgo para la salud pública y animal. En el nivel 2 se manejan agentes biológicos de peligro moderado que representen un riesgo hacia el personal y el ambiente. En este nivel de bioseguridad todo el personal está capacitado para el manejo de agentes infecciosos.
- **Brotes epidémicos:** es una clasificación usada en la epidemiología para referirse a la aparición repentina de una enfermedad debida a una infección en un lugar específico.
- **Baño María:** método empleado para conferir un aumento en temperatura uniforme a una sustancia líquida o sólida para calentarla lentamente, sumergiendo el recipiente en otro de mayor tamaño con agua (u otro líquido)

REFERENCIAS

1. Hutchins, M., *Serving science and conservation: the biological materials request protocol of the New York Zoological Society*. Zoo Biology, 1990. **9**: p. 447-460.
2. Cunningham, A., *Disease risks of wildlife translocations*. Conservation Biology, 1996. **10**: p. 349-353.
3. Daszak, P., A. Cunningham, and A. Hyatt, *Emerging infectious diseases of wildlife - threats to biodiversity and human health*. Science, 2000. **287**: p. 443-449.
4. McCallum, H. and A. Dobson, *Detecting disease and parasite threats to endangered species and ecosystems*. Trends in Ecology and Evolution, 1995. **10**: p. 190-194.
5. Lafferty, K. and L. Gerber, *Good medicine for conservation biology: the intersection of epidemiology and conservation theory*. Conservation Biology, 2002. **16**: p. 593-604.
6. Cunningham, A. and P. Daszak, *Extinction of a species of land snail due to infection with a microsporidian parasite*. Conservation Biology, 1998. **12**: p. 1139-1141.
7. Lloyd-Smith, J., et al., *Cyclical changes in seroprevalence of leptospirosis in California sea lions: Endemic and epidemic disease in one host species?* BioMed Central Infectious Diseases, 2007. **7**(1-30).
8. Burek, K., et al., *Infectious disease and the decline of Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*) in Alaska, USA: Insights from serologic data*. Journal of Wildlife Diseases, 2005. **41**: p. 512-524.
9. Sikes, R., W. Gannon, and ACUCASM, *Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild*. Journal of Mammalogy, 2011. **92**(1): p. 235-253.
10. Dierauf, L. and F. Gulland, *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine: health, disease and rehabilitation*. 2001, Boca Raton: CRC Press.
11. Kucklick, J., et al., *Specimen Banking for Marine Animal Health Assessment. Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry - Environmental Specimen Bank*. 2010, Tokyo: Terrapub.
12. Aguirre, A., M. Rostal, and T. Keef, *The establishment of serum banks for epidemiological investigations of infectious diseases in marine mammals*, in *New directions in conservation medicine. Applied cases of ecological health*, A. Aguirre, R. Ostfeld, and P. Daszak, Editors. 2013, Oxford University Press: New York.
13. Lennette, E. and N. Schmidt, *Diagnostic procedures for viral and rickettsial infections*. 1969, New York: American Public Health Association.
14. Bellete, B., et al., *Influence of the quantity of nonspecific DNA and repeated freezing and thawing of samples on the quantification of DNA by the Light Cycler®*. Journal of Microbiology Methods, 2003. **55**: p. 213-219.
15. Holland, N., et al., *Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies*. Mutation Research, 2003. **543**: p. 217-234.
16. Lev, E., et al., *Creatine-kinase activity decrease with short-term freezing*. Enzyme Protein, 1994-1995. **48**: p. 238-242.

17. Bothig, B., et al., *Qualification of long stored samples of serum banks for seroepidemiological studies*. Journal of Hygiene, Epidemiology and Immunology, 1992. **36**: p. 269.
18. Westgard, J. and G. Klee, *Quality Management*, in *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, C. Burtis and E. Ashwood, Editors. 1999, W B Saunders: Philadelphia.
19. Wells, R., et al., *Bottlenose dolphins as marine ecosystem sentinels: Developing a health monitoring system* EcoHealth, 2004. **1**: p. 246-254.
20. DiGiacomo, R. and T. Koepsell, *Sampling for detection of infection or disease in animal populations*. Journal of the American Veterinary Medical Association, 1986.
21. Thrusfield, M.E.E.E., *Veterinary Epidemiology*. 3a. ed. 2007, España: Acribia.
22. Wobeser, G., *Disease in wild animals: investigation and management*. 2007, Alemania: Springer.
23. Aguirre, A., et al., *Epidemiologic investigations of infectious pathogens in marine mammals: The importance of serum banks and statistical analysis*, in *New directions in conservation medicine: Applied cases of ecological health*, A. Aguirre, R. Ostfeld, and P. Daszak, Editors. 2012, Oxford University Press: Nueva York.