

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Detección de *Leptospira* patogénica en lobos marinos de las Galápagos
(*Zalophus wollebaeki*)**

Darío Sebastián Melo López
Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniero en Biotecnología

Quito, 19 de mayo de 2023

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN

DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Detección de *Leptospira* patogénica en lobos marinos de las Galápagos
(*Zalophus wollebaeki*)**

Darío Sebastián Melo López

Nombre del profesor, Título académico

Verónica Barragán, Ph.D

Quito, 19 de mayo de 2023

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Darío Sebastián Melo López

Código: 205797

Cédula de identidad: 1721257903

Lugar y fecha: Quito, 19 de mayo de 2023

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

El lobo marino de las Galápagos (*Zalophus wollebaeki*) es una especie en peligro de extinción, debido al drástico declive que ha sufrido su población en las últimas décadas. Dentro de las posibles causas de este decrecimiento poblacional son el fenómeno de El Niño y las enfermedades infecciosas; sin embargo, se conoce poco acerca de los patógenos que afectan la salud y la dinámica de la población de esta especie. Por tal motivo, el objetivo de este estudio es detectar e identificar la especie de *Leptospira* patogénica circulante en muestras de lobos marinos de la colonia El Malecón, que contiene la mayor población de *Z. wollebaeki* del archipiélago. Para esto, se tomaron muestras de arena con orina fresca y necropsias de riñones de animales muertos en 8 playas donde descansa esta colonia. Para la detección, se utilizó el ensayo lipI32 con PCR en tiempo real donde el 78.57% (n=14) de las muestras de arena con orina resultaron positivas junto con el 36% (n=25) de las muestras de riñones. Por medio de análisis bioinformático del gen *secy*, se identificó por primera vez a *Leptospira interrogans* en 4 muestras de riñones positivos evaluados. Estos resultados proporcionan el primer paso para entender la ecoepidemiología de la leptospirosis en los leones marinos de las Galápagos. Futuros estudios serán designados para comprender el impacto de la infección en las colonias de leones marinos en las islas. Además, es importante continuar esta investigación y entender si este patógeno circula en otras especies endémicas de la isla o en animales domésticos.

Palabras clave: *Leptospira*, Galápagos, *Leptospira interrogans*, leptospirosis, *Zalophus wollebaeki*.

ABSTRACT

The Galapagos sea lion (*Zalophus wollebaeki*) is an endangered species, due to the drastic decline that has suffered its population in recent decades. Among the possible causes of this population decrease are the phenomenon of El Niño and infectious diseases; however, little is known about the pathogens that affect the health and dynamics of the population of this species. For this reason, the objective of this study is to detect and identify the species of circulating pathogenic *Leptospira* in samples of sea lions from the colony “El Malecón”, which contains the largest population of *Z. wollebaeki* of the archipelago. For this, sand samples were taken with fresh urine and necropsies of dead animals' kidneys on 8 beaches where this colony rests. For the detection, the lipL32 test with real-time PCR was used where 78.57% (n=14) of sand samples with urine were positive together with 36% (n=25) of kidney samples. Using bioinformatics analysis of the secY gene, *Leptospira interrogans* was first identified in 4 positive kidney samples evaluated. These results provide the first step in understanding the ecoepidemiology of leptospirosis in Galapagos sea lions. Future studies will be designed to understand the impact of infection on sea lion colonies on the islands. In addition, it is important to continue this research and understand if this pathogen circulates in other endemic species of the island or in domestic animals.

Keywords: *Leptospira*, Galápagos, *Leptospira interrogans*, leptospirosis, *Zalophus wollebaeki*.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	10
MÉTODOS	14
RESULTADOS.....	17
DISCUSIÓN	19
CONCLUSIONES.....	22
TABLAS.....	23
FIGURAS.....	24
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Promedio de Cq de muestras positivas de orina en arenas para qPCR ensayo lip132.	23
Tabla 2. Promedio de Cq de muestras positivas de riñones para qPCR ensayo lip132. ...	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Positividad de detección de <i>Leptospira</i> patogénica en playas muestreadas de la isla San Cristóbal, Galápagos, Ecuador.....	24
Figura 2. Árbol filogenético que muestra la relación del gen <i>secy</i> (411 pb) derivado de muestras positivas de riñones de lobos marinos de las Galápagos (<i>Zalophus wollebaeki</i>).....	25

INTRODUCCIÓN

Leptospira es una bacteria que causa una zoonosis reconocida a nivel mundial y afecta tanto a humanos como animales (Levett, 2011). Este género bacteriano pertenece al filo Spirochaetae, que se caracteriza por presentar morfología helicoidal y una alta movilidad gracias a su endoflagelo (Picardeau, 2013). Se conoce más de 20 especies de *Leptospira* categorizadas en más de 300 serovares y más de 24 serogrupos (Pheng, Ahmed, & Siddiqui, 2020). La clasificación taxonómica de *Leptospira* divide a la espiroqueta en 3 linajes filogenéticos de acuerdo con el nivel de virulencia de las especies: patogénicas 1 (P1), patogénicas 2 (P2) y saprófitas (S1) (Vincent, y otros, 2019). Las especies patogénicas de *Leptospira* son los agentes responsables de causar una forma moderada a severa de infección, mientras que, las especies saprófitas, se encuentran presentes comúnmente en el ambiente y no causan infección (Cilia, Bertellonia, Albini, & Fratini, 2021).

Debido a su forma helicoidal, las bacterias pueden entrar fácilmente al cuerpo del hospedero. Las *Leptospiras* ingresan a través de heridas o membranas mucosas, luego las bacterias entran al torrente sanguíneo, en donde se reproducen (Bharti, y otros, 2003). Una vez llegado a un número crítico de bacterias, estas invaden los tejidos y producen signos clínicos tales como ictericia, abortos, infección subclínica, enfermedad febril y daño a diferentes órganos como lo son riñones, pulmones, placenta, entre otros (Adler & De la Peña, 2009). Así, la infección activa de *Leptospira* en el hospedero produce una enfermedad que se conoce como leptospirosis.

La leptospirosis es una enfermedad de distribución mundial que ocurre en zonas templadas, tropicales y subtropicales. Su propagación se ve potenciada por la gran variedad de especies de animales salvajes y domésticos que pueden actuar como reservorios naturales de la *Leptospira* (Bharti, y otros, 2003). Adicionalmente, varias de estas especies pueden actuar

como portadores asintomáticos de la espiroqueta, permitiendo que la infección se mantenga en la población a través de la supervivencia de la bacteria en el ambiente y su transmisión constante por medio de la orina, siendo esto último el principal factor epidemiológico de la leptospirosis (Adler & De la Peña, 2009). Se conoce que cada serovar se mantiene infectando a un hospedero específico. Sin embargo, en una determinada región una especie animal puede ser infectada por el serovar característico de esa especie o de otras especies que habitan la misma región. Esto último es conocido como infección accidental, y se presenta cuando un animal no adaptado a un serovar de *Leptospira* entra en contacto con orina infectada con dicha serovar (Cilia, Bertellonia, Albini, & Fratini, 2021). En los últimos años, la incidencia de leptospirosis en hospederos accidentales ha ido en aumento, siendo la modificación de ecosistemas por cambio climático y el contacto entre animales salvajes y domésticos las principales razones de este tipo de infección (Ellis, 2015). Como resultado, varios estudios han demostrado la presencia de *Leptospira* en especies animales no reconocidas como reservorios naturales de la bacteria.

Cada año, se publican trabajos donde se reportan especies de *Leptospira* en varias especies animales que no estaban descritas como especie hospedera de la espiroqueta, entre estas especies de animales que viven en vida silvestre (Cilia, Bertellonia, Albini, & Fratini, 2021). Las principales especies animales silvestres donde se ha detectado una infección accidental por la espiroqueta pertenecen al orden Carnivora. Dentro de estos, los pinnípedos pertenecientes a la especie *Zalophus californianus* (lobos marinos de California) son la más estudiada y donde se ha reportado más información de leptospirosis en animales no humanos (Cilia, Bertellonia, Albini, & Fratini, 2021). La especie identificada en lobos marinos de California es *Leptospira interrogans* serovar Pomona, la cual ha sido detectada en muestras de sangre, riñón y orina (Norman, DiGiacomo, Gulland, Meschke, & Lowry, 2004). En el 2009, Zuerner et al. identificaron *Leptospira* patogénica en 65.3% de muestras analizadas de lobos

marinos de California, de lo cuales los juveniles presentan una mayor proporción de infección (71%), mientras que los adultos y cachorros mostraban una proporción de infección menor, 14% y 15% respectivamente. Adicionalmente, un estudio realizado por (Prager, y otros, 2013) demostró la presencia de la bacteria de manera crónica y asintomática en estos animales, lo que podría ser un mecanismo persistente de circulación de *Leptospira* en esta población. Agregando a lo anterior, la presencia de este serovar en muestras de placenta podría ser la razón del alto número de abortos en la población de esta especie de pinnípedos (Godínez, y otros, 1999). Así, el hallazgo de *Leptospira* patogénica en lobos marinos de California nos lleva a pensar que otros pinnípedos relacionados pueden ser susceptibles a esta enfermedad.

Los lobos marinos de las Galápagos (*Zalophus wolfebaeki*) son una especie categorizada como “especie en peligro de extinción” por la UICN debido a su decrecimiento poblacional en las últimas décadas (Páez-Rosas, y otros, 2021). Una posible causa de esto, son los efectos oceanográficos y atmosféricos tales como ENSO, el cual provoca escases de alimentos en el ecosistema marino del archipiélago, causando una elevada mortalidad de los individuos (Páez-Rosas, y otros, 2021). Adicionalmente, otra posible causa de esta mortalidad son las enfermedades infecciosas, donde el contacto cercano de los lobos marinos con humanos, mascotas y ratas puede ser una posible ruta de transmisión de patógenos (Dekinger, y otros, 2016). Aunque no ha sido ampliamente estudiado, hay evidencia de que los lobos marinos de las Galápagos se encuentran expuestos a *Leptospira* patogénica. Así, anticuerpos anti-*Leptospira* fueron encontrados en un 57.6% (n=125) de individuos muestreados en diferentes loberas en las islas Fernandina, Española, Isabela, Floreana, San Cristóbal, Mosquera, Santa Cruz, Santa Fe y Santiago, siendo identificadas serovariedades tales como Patoc, Australis y Hebdomadis (Simental, 2006). Adicionalmente, en años recientes (Dekinger, y otros, 2016) reportaron el hallazgo de material genético perteneciente a especies patogénicas de *Leptospira* en 5 de 7 muestras de riñones y placenta. Estos antecedentes resaltan la necesidad

de seguir estudiando de manera más profunda sobre la circulación de *Leptospira* patogénica en los lobos marinos de las Galápagos, lo que nos permitirá entender la ecoepidemiología de la enfermedad en las islas y generar planes de prevención y control.

Debido a que los lobos marinos de las Islas Galápagos son una de las especies más importantes para la conservación del ecosistema marino del lugar, esta enfermedad podría tener una elevada influencia en la salud general de las islas y de las especies que habitan en ellas. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es detectar, mediante PCR en tiempo real, material genético de especies de *Leptospira* patógena en muestras de orina y riñón de lobos marinos. Una vez determinada la presencia del patógeno se procederá a identificar la especie de *Leptospira* circulante en la población de lobos marinos. Los resultados de este estudio proveerán información valiosa para el entendimiento de la ecoepidemiología de la leptospirosis en las Islas Galápagos.

MÉTODOS

Localidad de muestreo y método de colección y preservación de muestras

Las muestras fueron colectadas por Eduardo Díaz MDV. PhD en septiembre y octubre del 2021 y provienen de 8 playas (Lobería, Astillero, Playa de los Marineros, Punta Carola, Base Naval, Playa Mann, Puerto Baquerizo y Playa de Oro) de la isla San Cristóbal (Bajo el permiso de investigación PC-31-21). Dicha isla es en donde suele reposar gran parte de la colonia “El Malecón” de lobos marinos, la colonia más grande de esta especie en el archipiélago. Se colectaron 25 muestras de riñón a partir de necropsias de animales que fueron encontrados en las playas. Los riñones fueron preservados en Shield 1X y etanol al 96% a 4 °C. Por otro lado, las muestras de orina en arena de lobos marinos fueron colectados y preservados con Shield 1X. Debido a que se trata de un muestreo exploratorio y para maximizar la posibilidad de encontrar muestras positivas, se realizaron pools de arena con orinas de 6 a 8 individuos, generando un total de 24 pools de arena para ser analizados.

Procesamiento y análisis de muestras para la detección de *Leptospira* patogénica

Para la extracción de las muestras de riñón se utilizó el kit de extracción DNeasy Blood & Tissue de QIAGEN (Maryland, Estados Unidos). Las muestras de arena fueron filtradas a través de una membrana MCE con poros de diámetro 0.22 µm. Posteriormente, se procedió con la extracción a partir de 1/8 de membrana utilizando inicialmente Lysing Matrix B (MP Biomedicals, Francia) beads y luego el kit de extracción DNeasy Blood & Tissue de QIAGEN (Maryland, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del reactivo.

A continuación, para descartar la posibilidad de falsos negativos por la presencia de compuestos inhibitorios, se analizó el gen *I6s* por PCR convencional (dos Santos, Argolo, Argolo-Filho, & Lopes, 2019) en muestras de orina en arena ya que esperamos tener múltiples especies de bacterias, mientras que para los tejidos realizamos una amplificación de la *β-actina*

(Zhaojie, y otros, 2010). La presencia de ADN de *Leptospira* patogénica se detectó utilizando el ensayo descrito por (Stoddard, Gee, Wilkins, McCaustland, & Hoffmaster, 2009) que detecta el gen *lipl32* de *Leptospira* patogénica. Para esto se utilizó el Máster Mix TaqMan™ Universal PCR Máster Mix (United Kindom, Appliedbiosystems) en un volumen final de 10 µL, primers, sonda del ensayo y 1 ul de ADN extraído. Las condiciones de PCR fueron las utilizadas previamente por (Stoddard, Gee, Wilkins, McCaustland, & Hoffmaster, 2009): 10 minutos a 95 °C, seguido de 44 ciclos de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 58°C. Las muestras fueron corridas por triplicado con 2 controles negativos y 2 controles positivos. Los controles negativos fueron corridos en todos los experimentos para descartar contaminación de ADN.

Identificación de la especie de *Leptospira* patogénica

Para poder identificar la especie de *Leptospira* presente, se analizó la secuencia del gen *secy* en las muestras que arrojaron un resultado positivo para el ensayo *lipl32*. Este es un gen que codifica para la translocasa proteica de la bacteria, la cual es muy conservada y forma parte del operón S10-*spc-α* (Cosate, y otros, 2010). Para esto, se obtuvo un amplicón de un fragmento del gen *secy*, el cual fue secuenciado utilizando tecnología Oxford Nanopore (United Kindom, Oxford Nanopore Technologies). Para la amplificación del gen, se realizó la técnica de nested PCR donde el primer amplicón obtenido fue el gen *secy* descrito por (Ahmed, y otros, 2006) con un tamaño de 549 pb. En el ensayo se empleó el máster mix con la enzima Q5 de New England Biolabs y primers previamente descritos en una reacción de 12.5 µL. Las condiciones de termociclado aplicadas fueron 98°C por 30 segundos, seguido de 15 ciclos de 98°C por 10 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos. Por último, 72°C por 2 minutos y una temperatura de hold de 12°C. Seguidamente, se realizó una segunda PCR utilizando como template los amplicones obtenidos en el anterior paso. Para esto, se empleó el máster mix con la enzima Q5 de New England Biolabs y primers de Picardeu (comunicación personal, noviembre 27, 2019) (Di Azevedo, Cabral, Cardoso, Carvlho, & Lilenbaum, 2020) que

amplifica un fragmento de 410 pb. Las condiciones de termociclado aplicadas fueron 98°C por 30 segundos, seguido de 35 ciclos de 98°C por 10 segundos, 55°C por 35 segundos, 72°C por 20 segundos. Por último, 72°C por 2 minutos y una temperatura de hold de 12°C.

Los amplicones fueron secuenciados siguiendo los siguientes pasos. Primero, los amplicones fueron purificados siguiendo el protocolo del kit AMPure (Beckman Coulter, USA). Seguidamente, se procedió a cuantificar el material genético mediante Qubit™ 1X dsDNA (Thermo Scientific, Invitrogen, USA). Para el secuenciamiento, se preparó la librería utilizando el protocolo Oxford Nanopore Native Barcoding Expansion 96 junto con el kit Ligation Sequencing LSK-109. Posteriormente, se cargó 200 fmol en una celda de flujo y se secuenció en GridION. La corrida de secuenciamiento se programó en el software MinKNOW v22.12.5 y Guppy 6.4.6, y el demultiplexing en tiempo real y trimming de los adaptadores se activó con el modo de super accuracy para el base-calling.

Finalmente, todas las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias utilizando BLAST GenBank (National Center for Biotechnology Information 2016) y el software MEGA11 versión 11.0.13. Estas secuencias fueron alineadas utilizando secuencias disponibles en GenBank y se construyó un árbol filogenético utilizando el método estadístico Maximum Likelihood y las distancias evolutivas fueron calculadas con el modelo Tamura-3-parameter utilizando MEGA.

RESULTADOS

Detección de *Leptospira* patogénica en muestras de orina en arena y riñones

En cuanto a detección de *Leptospira* patogénica por medio del ensayo lip132, para las muestras de orina en arena se obtuvieron 3 muestras negativas de las 14 muestras evaluadas, esto corresponde al 21.43% del total. El 78.57% (11/14) de las muestras restantes resultaron positivas (Tabla 1). Las muestras que arrojaron resultados positivos provienen de Lobería, Astillero, Punta Carola, Playa de los Marineros, Puerto Baquerizo Moreno y Base Naval de la isla San Cristóbal (Figura 1). Por otro lado, para las muestras de riñones se obtuvieron 16 muestras negativas de 25 muestras analizadas por el mismo ensayo, lo que resulta en un 64% del total. El 36% (9/25) de las muestras restantes fueron positivas (Tabla 2) y provienen de Base Naval, Playa de Oro, Playa Mann y Lobería de la isla San Cristóbal (Figura 1).

Identificación de la especie de *Leptospira* patogénica

Para ambos tipos de muestras positivas (tanto muestras de orina en arena como riñones) se obtuvieron amplicones finales de 410 pb del gen *secy* con la suficiente heterogeneidad de secuencia para realizar la interpretación filogenética de la especie presente (Ahmed, Engelberts, Boer, & Hartskeerl, 2009). Las secuencias obtenidas provenientes de las muestras de orina en arena fueron comparadas con secuencias de diferentes especies de *Leptospira* patogénica reportadas en GenBank y se obtuvieron porcentajes de similitud menores al 90%. Adicionalmente, no hubo ninguna especie de *Leptospira* patogénica que mostrara un elevado porcentaje de similitud con nuestras secuencias. Afortunadamente, de las muestras de riñones obtuvimos 4 secuencias que, al ser comparadas con secuencias de *Leptospira* patogénica del GenBank, presentaron porcentajes de similitud mayor al 98% con *Leptospira interrogans*. Con estas 4 secuencias provenientes de muestras de riñones, construimos un árbol filogenético utilizando secuencias del gen *secy* de diferentes especies de *Leptospira* patogénica. El análisis

filogenético revela la formación de un clado de *Leptospira interrogans* junto con nuestras 4 secuencias provenientes de los riñones (Figura 2).

DISCUSIÓN

Los lobos marinos son una de las especies animales más importantes para la conservación del ecosistema marino de las Islas Galápagos. Esta especie se mueve constantemente entre los ecosistemas terrestres, para su reproducción y crianza, y ecosistemas marinos para alimentación y movimiento local (Páez-Rosas & Guevara, 2017). Debido al movimiento entre estos ecosistemas, los lobos marinos sirven como factor biótico de transporte de alimento y nutrientes a través de su defecación, actuando como una fuente importante de nitrógeno y fósforo para la flora terrestre, lo que incrementa la productividad en las islas Galápagos (Fariña, Salazar, Wallem, Witman, & Ellis, 2003). Por este motivo, estos mamíferos marinos sirven como indicadores del estado de salud y conservación de los ecosistemas de las islas.

Los lobos marinos de las Galápagos (*Zalophus wollebaeki*) son una especie endémica del archipiélago y la especie de mamífero marino más abundante de la región (Páez-Rosas & Guevara, 2017). Sin embargo, en los últimos 30 años se ha visto un decrecimiento en su población debido a perturbaciones ambientales tales como el fenómeno de El Niño (Páez-Rosas, y otros, 2021), deterioro de su hábitat (Alava & Salazar, 2006) y el contacto cercano que mantienen con especies introducidas como ratas, perros y gatos que pueden ser una posible fuente de transmisión de nuevos patógenos (Dekinger, y otros, 2016). Estos factores han llevado a esta especie a ser categorizada como “especie en peligro de extinción” por la Red List of the International Union for Conservation of Nature (IUCN) (Páez-Rosas, y otros, 2021).

En cuanto a la transmisión de nuevos patógenos hacia los lobos marinos de las Galápagos, se ha visto como las especies introducidas tienen el potencial de causar nuevas enfermedades provocadas por patógenos como el virus del distemper canino (CDV), *Leptospira*, *Brucella*, parvovirus, entre otros (Dekinger, y otros, 2016). En el caso específico

de la leptospirosis, pocos estudios han demostrado la exposición y la infección con *Leptospira* en estos mamíferos marinos. Sin embargo, la información proporcionada ha sido la base sobre la cual hemos construido nuestro proyecto.

En el presente estudio se observaron 11 muestras positivas (n=14) de orina en arena y 9 muestras positivas (n=25) de riñones. Esto demuestra la presencia de *Leptospira* patogénica circulando en la población de los lobos marinos en la isla San Cristóbal. De las muestras positivas de orina en arena no se logró obtener ningún amplicón del gen *secY* de buena calidad para identificar la especie de *Leptospira* patogénica, estos se pueden deber a la presencia de material genético de otras bacterias ambientales en las muestras, lo que generó ruido en el secuenciamiento y dificultó el análisis bioinformático de las secuencias. Por otro lado, de los 9 riñones positivos logramos obtener 4 secuencias de muy buena calidad con un tamaño de 410 pb, lo que nos permitió identificar, por primera vez, a *Leptospira interrogans* como la especie que se encuentra infectando a los lobos marinos de las Galápagos. Esta especie de *Leptospira* la podemos confirmar gracias al elevado porcentaje de similitud (> 98%) obtenido con las secuencias del GenBank y la agrupación en el clado de *Leptospira interrogans* en nuestro árbol filogenético (Figura 2).

La identificación de *Leptospira interrogans* en los lobos marinos podría sugerir que el contacto que mantienen estos mamíferos con las especies introducidas es una fuente de transmisión de esta bacteria. Lo que podría estar relacionado con el drástico decrecimiento poblacional que han sufrido los lobos marinos en los últimos 30 años (Dekinger, y otros, 2016). Sin embargo, es importante considerar que en varias de las playas donde descansan los lobos marinos no está permitido el acceso, por lo que es posible que *Leptospira interrogans* se mantenga circulando de manera endémica en varias especies de las islas.

Finalmente, somos el primer estudio que identifica a *Leptospira interrogans* infectando a estos lobos marinos en varias playas de la isla San Cristóbal, lo que abre las puertas a nuevos

estudios para lograr la comprensión total de la ecoepidemiología de la leptospirosis en las Islas Galápagos para poder generar planes de manejo y conservación de esta especie en peligro de extinción.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron porcentajes importantes de positividad en cuanto a detección de *Leptospira* patogénica en muestras de orina en arena (78.57%) y riñones (36%) de lobos marinos que descansan en diferentes playas de la isla San Cristóbal en las Galápagos. A partir de estas muestras, somos el primer estudio en identificar a *Leptospira interrogans* en esta colonia de lobos marinos. Las evidencias de exposición e infección con *Leptospira* patogénica sumado a los resultados del presente estudio, sugieren que la leptospirosis es una de las posibles causas del decrecimiento poblacional que ha sufrido esta especie de mamíferos marinos. Sin embargo, se requieren más estudios tanto en especies endémicas como introducidas para comprender la ecoepidemiología de la enfermedad en el archipiélago.

TABLAS

Tabla 1. Promedio de Cq de muestras positivas de orina en arenas para qPCR ensayo lip132.

Isla	Playas	Muestra	Cq
San Cristóbal	Lobería	L1	15.55
		L3	22.24
	Astillero	A3	22.99
	Punta Carola	C2	20.65
	Playa de los Marinos	M1	21.51
		M2	29.89
		M3	23.95
	Puerto Baquerizo	B1	17.78
		B2	18.89
	Base Naval	N2	22.43
N3		36.44	

Tabla 2. Promedio de Cq de muestras positivas de riñones para qPCR ensayo lip132.

Isla	Playas	Muestra	Cq
San Cristóbal	Punta Carola	PC1	18.65
		PC2	14.83
	Naval	NA05	37.21
		NA2	16.45
		NA24	27.73
	Playa de Oro	PO2	21.5
		PO30	23.69
	Playa Mann	PM11	28.63
	Lobería	SL102	21.05

FIGURAS

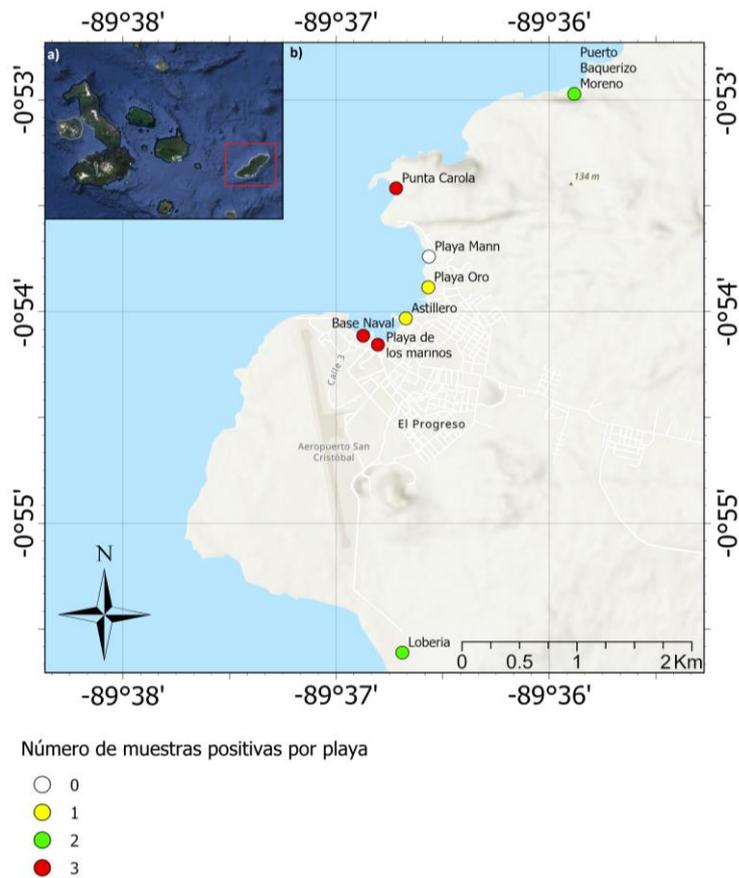


Figura 1. Positividad de detección de *Leptospira* patogénica en playas muestreadas de la isla San Cristóbal, Galápagos, Ecuador.

Este mapa muestra el área de estudio de la colonia “El Malecón” de leones marinos de las Galápagos (*Zalophus wollebaeki*) con la (a) ubicación de la isla San Cristóbal en el archipiélago y (b) las playas donde se encontraron diferentes números de muestras positivas.

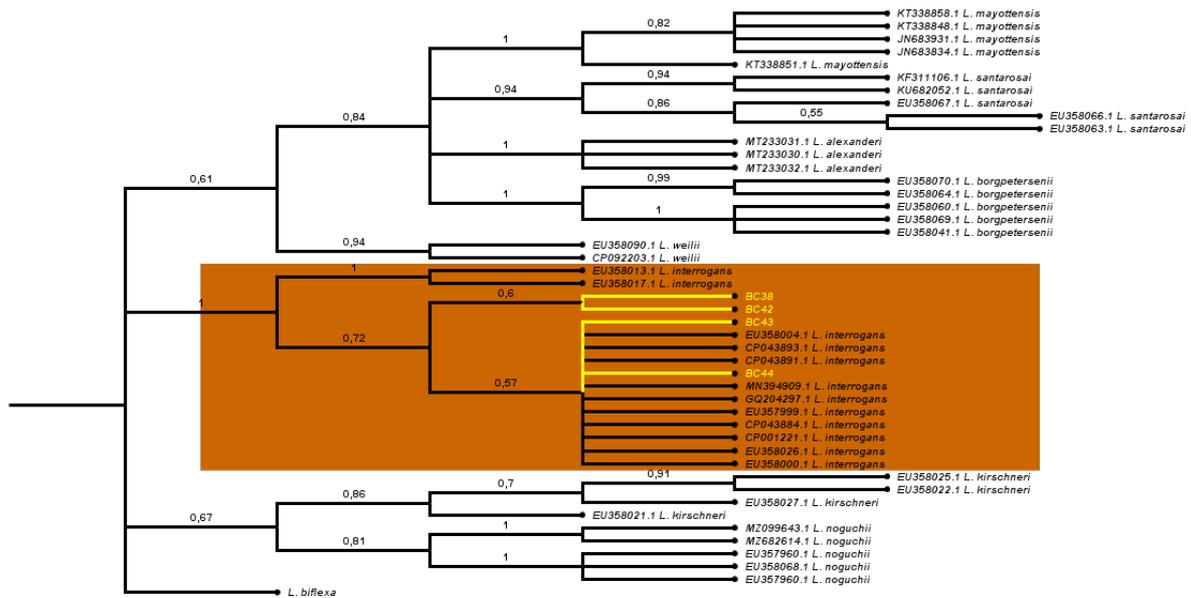


Figura 2. Árbol filogenético que muestra la relación del gen *secY* (411 pb) derivado de muestras positivas de riñones de lobos marinos de las Galápagos (*Zalophus wollebaeki*).

El árbol filogenético fue construido utilizando el método de Máximo Likelihood basado en el modelo Tamura-3-parameter. Las secuencias de este estudio están etiquetadas con identificadores únicos (BC38, BC42, BC43, BC44). Adicionalmente, se muestran las secuencias de referencia de *Leptospira* patogénica con sus códigos de acceso del GenBank.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler, B., & De la Peña, A. (2009). *Leptospira and leptospirosis*. México: Veterinary Microbiology.
- Ahmed, N., Devi, S., Valverde, M., Vijayachari, P., Machangu, R., Ellis, W., & Hartskeerl, R. (2006). *Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic Leptospira species*. Italy: Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.
- Ahmed, N., Engelberts, M., Boer, K., & Hartskeerl, R. (2009). *Development and Validation of a Real-Time PCR for Detection of Pathogenic Leptospira Species in Clinical Materials*. Amsterdam: PLOS ONE.
- Alava, J., & Salazar, S. (2006). *Status and Conservation of Otariids in Ecuador and the Galápagos Islands*. Alaska: Alaska Sea Grant College Program.
- Bharti, A., Nally, J., Ricaldi, J., Matthias, M., Diaz, M. L., Levett, P., . . . Vinetz, J. (2003). *Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance*. Estados Unidos: The Lancet Infectious Diseases.
- Cilia, G., Bertellonia, F., Albini, S., & Fratini, F. (2021). *Insight into the Epidemiology of Leptospirosis: A Review of Leptospira Isolations from "Unconventional" Hosts*. Pisa: Animals.
- Cosate, M., Barouni, A., Moreira, E., Veloso, I., Gomes, M., & Salas, C. (2010). *Molecular Characterization by LSSP-PCR and DNA Sequencing of a Pathogenic Isolate of Leptospira interrogans from Brazil*. Brasil: Zoonoses and Public Health.

Dekinger, J., Guevara, N., Ayala, S., Murillo, J., Hirschfeld, M., Montero-Serra, I., . . .

Trubea, G. (2016). *Pup mortality and evidence for pathogen exposure in Galapagos sea lions (Zalophus wollebaeki) on San Cristóbal island, Galápagos, Ecuador*. Quito: Journal of Wild Life Diseases.

Di Azevedo, M., Cabral, B., Cardoso, L., Carvlho, F., & Lilenbaum, W. (2020).

Characterization of leptospiral DNA in the follicular fluid of non-pregnant cows. Ría de Janerio: British Veterinary Association.

dos Santos, H., Argolo, C., Argolo-Filho, R., & Lopes, L. (2019). *A 16s rDNA PCR-based theoretical to actual delta approach on culturable mock communities revealed severe losses of diversity information*. Brazil: BMC Microbiology.

Ellis, W. (2015). *Animal Leptospirosis*. Belfast: Topics in Microbiology and Immunology.

Fariña, J., Salazar, S., Wallem, K., Witman, J., & Ellis, J. (2003). *Nutrient exchanges between marine and terrestrial ecosystems: the case of the Galapagos sea lion Zalophus wollebaecki*. Ecuador: Journal of Animal Ecology.

Godínez, C., Zelaya, B., Aurióles, D., Verdugo, A., Rodríguez, E., & De la Peña, A. (1999). *Antibodies against Leptospira interrogans in California sea lion pups from Gulf of California*. México: Journal of Wildlife Diseases.

Levett, P. (2011). *Leptospirosis*. Barbados: Clinical Microbiology.

Norman, S., DiGiacomo, R., Gulland, F., Meschke, J., & Lowry, M. (2004). *Risk factors for an outbreak of leptospirosis in California sea lions (Zalophus californianus) in California*. Washington: Journal of Wild Life Diseases.

Páez-Rosas, D., & Guevara, N. (2017). *Management Strategies and Conservation Status of Galapagos Sea Lion Populations at San Cristobal Island, Galapagos, Ecuador*. Ecuador: Managment Strategies and Conservaion Status.

Páez-Rosas, D., Torres, J., Espinoza, E., Marchetti, A., Seim, H., & Riofrío, M. (2021).

Declines and recovery in endangered Galapagos pinnipeds during the El Niño Event.

Galápagos: Scientific Reports.

Pheng, Z., Ahmed, N., & Siddiqui, R. (2020). *Leptospirosis: Increasing importance in developing countries.* Selangor: Acta Tropica.

Picardeau, M. (2013). *Diagnosis and epidemiology of leptospirosis.* París: Médecine et maladies infectieuses.

Prager, K., Greig, D., Alt, D., Galloway, R., Hornsby, R., Palmer, L., . . . Lloyd-Smith, J.

(2013). *Asymptomatic and chronic carriage of Leptospira interrogans serovar*

Pomona in California sea lions (Zalophus californianus). Estados Unidos: Veterinary Microbiology.

Simental, T. (2006). *Detección de anticuerpos contra Leptospira en lobos marinos*

(Arctocephalus galapagoensis y Zalophus wolfebaeki) de las Islas Galápagos,

Ecuador. México: Universidad Nacional Autónoma de México.

Stoddard, R., Gee, J., Wilkins, P., McCaustland, K., & Hoffmaster, A. (2009). *Detection of*

pathogenic Leptospira spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipI32 gene. Atlanta: Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.

Vincent, A., Schiettekate, O., Goarant, C., Kumari, V., Bernet, E., Thibeaux, R., . . .

Picardeau, M. (2019). *Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus Leptospira through the prism of genomics.* Brazil: PLoS Neglected Tropical Diseases.

Zhaojie, L., Lijun, Y., Jing, W., Wenchun, S., Ravindra, A., Yumin, L., . . . Weihong, C.

(2010). *B-actin is a useful internal control for tissue-specific gene expression studies usin quantitative real-time PCR in the half-smooth tongue sole Cynoglossus*

semilaevis challenged with LPS or *Vibrio anguillarum*. China: Fisi & Shellfish Immunology.

Zuerner, R., Cameron, C., Raverty, S., Robinson, J., Colegrove, K., Norman, S., . . . Gulland, F. (2009). *Geographical dissemination of Leptospira interrogans serovar Pomona during seasonal migration of California sea lions*. Estados Unidos: Veterinary Microbiology .