

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Línea base del estado de salud y detección de *Leptospira* patógena por PCR en lobos marinos de Galápagos (*Zalophus wollebaeki*) de la Isla San Cristóbal.

Nataly C. Guevara

Tesis presentada ante el Colegio de ciencias biológicas y ambientales para la obtención del título de la especialización en Biotecnología y la sub-especialización de Biología

Universidad San Francisco de Quito

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

Línea base del estado de salud y detección de *Leptospira* en lobos marinos de Galápagos en la Isla San Cristóbal.

Nataly Guevara C.

Judith Denkinger, Ph.D

Codirectora de la Tesis y

Miembro del Comité de Tesis

Verónica Barragán, MB

Codirectora de la Tesis y

Miembro del Comité de Tesis

Lourdes Torres, Ph.D

Coordinadora de Biotecnología y

Miembro del Comité de Tesis

Gabriel Trueba, Ph.D

Director de la Maestría en Microbiología y

Miembro del Comité de Tesis

Quito, 10 de mayo

©Derechos de autor

Nataly Carolina Guevara Campoverde

2011

Abstract

The Galápagos sea lion (*Zalophus worlbebaeki*), a species endemic to the Galapagos Islands, is listed as endangered in the IUCN (International Union for the Conservation of Nature) red list. The strong El-Niño events in 1982/83 and 1997/98 reduced the population by approximately 50 % to currently an estimated 16,000 to 18,000 individuals. Data from 2008 to 2010 reveal that the human actions (29%), abortions (20%) and malnutrition in pups and juveniles (10%) were the main causes of illness, injuries or dead in the population of sea lions of San Cristóbal Island. The human impacts on sea lions increasing three fold since 2007 with human derivatives activities as fisheries and direct impacts. Additionally warm ocean conditions may lead to outbreaks of microbial diseases. Leptospirosis is a zoonotic disease of worldwide significance caused by spirochetes of the genus *Leptospira*, which are transmitted via urine. *Leptospira interrogans* serotype Pomona has been detected as the cause of abortions and numerous deaths in Californian sea lions (*Zalophus californianus*). In October 2009, 15 premature pups were aborted in two colonies at Puerto Baquerizo Moreno. From July to September 2010 those colonies were monitored for the presence of *Leptospira* sp. Samples were taken from fresh urine in sand or from tissue of liver, kidney and lung of sea lions found dead and from placenta of newborns. A total of 18 urine samples and 7 tissue samples were analyzed using PCR with specific primer pairs to determine the presence or absence of *Leptospira*. All of the urine samples were negative, but 4 out of the 7 tissue samples resulted positive for *Leptospira*. Though none of the samples was identified as *L. interrogans*.

Resumen:

El lobo marino (*Zalophus wolfebaeki*) es una especie endémica de las Islas Galápagos catalogada en peligro de extinción según la UICN. Fenómenos del Niño fuertes como los ocurridos en 1982/83 y 1997/98 redujeron la población de lobos en un 50%. La población actual está estimada en 16.000 a 18.000 individuos. Datos recopilados desde el 2008 al 2010 revelan que acciones humanas directas (29%), abortos (20%) y malnutrición (10%) en juveniles y cachorros son la principal causa de heridas, enfermedad y muerte de los lobos de la isla San Cristóbal. Los impactos humanos a los se han triplicado desde el 2007 siendo las actividades humanas derivadas de la pesca e impactos humanos directos las principales causas. Adicionalmente las condiciones climáticas cálidas propician los brotes de enfermedades microbianas. La Leptospirosis es una enfermedad zoonótica de significancia mundial causada por una espiroqueta del género *Leptospira*, que son excretadas al ambiente por la orina. *Leptospira interrogans* serotipo *Pomona* ha sido detectada como la causante de abortos y muertes masivas de lobos marinos californianos (*Z. californianus*) a lo largo de la costa de California. En Octubre del 2009 se presentaron 15 casos de abortos de cachorros en la playa de los Marineros y las playas cercanas a P. Baquerizo Moreno. Las mismas colonias han sido monitoreadas entre Julio y Septiembre del 2010 para detectar la presencia de *Leptospira* sp. Se tomaron muestras de arena con orina y de tejidos de lobos marinos encontrados muertos. Las muestras fueron analizadas por PCR como técnica molecular de diagnóstico mediante el uso de primers específicos para determinar la presencia o ausencia de *Leptospira* en las muestras colectadas. Todas las muestras de orina resultaron ser negativas, pero 4 de 7 muestras de tejido mostraron ser positivas a *Leptospira*. Ninguna de las muestras fue identificada como *L. interrogans*.

1. Introducción	1
2. Objetivos	4
3. Área de estudio	4
4. Metodología	5
4.1 Monitoreo de poblaciones:	5
4.2 Análisis para detectar <i>Leptospira</i> en muestras	7
4.2.1.1 Muestras de orina en arena	7
4.2.1.2 Muestras de orina en tarjetas FTA	8
4.2.1.3 Muestras de tejido	8
4.2.2 Extracción de ADN	9
4.2.2.1 Técnica de extracción de ADN con CTAB	9
4.2.2.2 Extracción de ADN a partir de tarjetas FTA	10
4.2.2.3 Técnica de extracción de ADN con kit de ROCHE	10
4.2.3 Amplificación de ADN utilizando la técnica del PCR	11
4.2.3.1 Cebadores de actina	11
4.2.3.2 Cebadores AB-CD	12
4.2.3.3 Cebadores G1-G2	13
4.2.3.4 Cebadores Lip32 F-R	14
4.2.4 Electroforesis	15
4.2.5 Secuenciación y análisis	15
5. Resultados	16
5.1 Monitoreo de poblaciones	16
5.2 Análisis de las muestras para determinar la presencia de <i>Leptospira</i>	17
5.2.1 Muestras de orina en arena	17
5.2.2 Muestras de tejido renal y placentario	18
5.2.3 Tarjetas FTA	20
6. Discusión	21
6.1 Censo poblacional y registro de problemas	21
6.2 Detección de <i>Leptospira</i> sp. muestras de <i>Zalophus wollebaki</i>	23
7. Conclusiones:	26
8. Proyecciones a futuro	27

9. Bibliografía:..... 27

Figura 1: Mapa de la ubicación de las 4 colonias reproductivas de <i>Zalophus wollebaeki</i> monitoreadas con mayor frecuencia.	36
Figura 2: Mapa que muestra la ubicación 2 de las colonias monitoreadas con mayor frecuencia y su distribución a lo largo de Puerto Baquerizo Moreno.....	36
Figura 3: Mapa de la isla san Cristóbal con la ubicación de las colonias reproductivas de <i>Zalophus wollebaeki</i> que fueron monitoreadas esporádicamente.	37
Figura 4: Tubo Eppendorf con muestra de orina en arena.....	37
Figura 5: Tarjetas FTA con muestras de orina en arena.	38
Figura 6: Algoritmo para selección de cebadores.....	38
Figura 7: ADN inserto del plásmido pLIPs60específica para los cebadores G1 y G2.	39
Figura 8: Promedio trimestral de lobos marinos contados en los diferentes colonias desde 2008 hasta Octubre del 2010.	39
Figura 9: Fluctuación de la cantidad de animales muertos y heridos por año.	40
Figura 10: Porcentaje de los principales impactos por año, que afectan a la población de lobos marinos en la isla San Cristóbal.....	40
Figura 11: Tipo de impactos y los porcentajes, derivados de la acción humana en la población de lobos marinos.	41
Figura 12: Incidencia de lobos heridos, muertos o enfermos con respecto al año y trimestre.....	41
Figura 13: Lugares con mayor cantidad de impactos a la población de lobos.....	42
Figura 14: Gel de electroforesis. Muestras de orina en arena. PCR con cebadores AB-CD	42

Figura 15: Secuencia del gen 16S de <i>Ruminococcus</i> pareada con cebadores CD.....	43
Figura 16: Detección de ADN de <i>Leptospira</i> en muestras de tejido.	43
Figura 17: Resultados de amplificación con segundo set de cebadores G1-G2	44
Figura 18: Resultados de la amplificación con el tercer set de cebadores: Lip32 F-R.	44
Figura 19: Amplificación de 5 muestras de tarjetas FTA con cebadores de actina.....	45
Figura 20: Gel de agarosa. Muestras de tarjetas FTA amplificadas con cebadores de actina.	45
Figura 21: Gel de agarosa. Muestra de tarjetas FTA amplificadas con cebadores CD.....	46

Lista de Tablas

Tabla 1: Descripción de las muestras de orina en arena..	47
Tabla 2: Descripción de las muestras de tejido renal y placentario.....	48
Tabla 3: Descripción de las muestras de orina recolectadas en las tarjetas FTA.....	48

Anexos

Anexo No. 1: Hoja de monitoreo y censos de poblaciones

Anexo No. 2: Hojas de registros

Anexo No.2.1: Hoja de monitoreos y censos

Anexo No. 2.2: Registro de lobos encontrados enfermos, muertos y heridos

Anexo No. 3: Espectrogramas de muestras positivas

1. Introducción

Las islas Galápagos se encuentran aproximadamente a 960 kilómetros de la costa ecuatoriana, están formadas por 19 islas grandes, más de 42 islotes y cientos de formaciones rocosas que son el resultado de erupciones volcánicas en las profundidades del Océano Pacífico (Gingerich, 2010). Son consideradas verdaderas islas oceánicas ya que nunca estuvieron conectadas a continente alguno y se poblaron en miles de años por especies de plantas y animales que llegaron por las corrientes oceánicas o viento (Levy, 2008). Este aislamiento creó un ecosistema único, de belleza y riqueza insuperable, hogar de al menos 6.000 especies, la mitad de los cuales no son encontrados en otro lugar del planeta (Levy, 2008; Gingerich, 2010).

Hoy en día el delicado equilibrio ecológico de estas islas se encuentra amenazado por diversas causas, como el incremento de la población humana y sus actividades (Gingerich, 2010), la continua introducción de nuevos animales y plantas a través del transporte marítimo o aéreo. Las especies introducidas, que se han tornado invasivas, actualmente son la mayor amenaza de Galápagos. Sea por caza o pesca, competencia, destrucción del hábitat, o esparciendo enfermedades infecciosas patógenas. (Levy, 2008)

Dentro de la gran variedad de mamíferos marinos de las Islas Galápagos, el lobo marino (*Zalophus wollebaeki*) es endémico y se encuentra distribuido en todo el Archipiélago. Se estima que su población actual es de 16 a 18

mil individuos (Salazar 2005; Alava y Salazar 2006). En 1996 estaba catalogado como "especie vulnerable" (Wolf, Tautz, & Trillmich, 2007). En la actualidad la UICN lo clasifica en la lista roja como un animal en peligro de extinción (UICN, 2011), ya que la población ha disminuido en un 50% desde los años 70 hasta el año 2000 (Trillmich y Dellinger, 2008). Este descenso poblacional se relaciona con eventos fuertes de El-Niño de los años 1982/1983 y 1997/1998 caracterizados por anomalías en la temperatura superficial del mar de más de 2,5°C, provocando estrés nutricional y muerte por inanición (Trillmich y Limberger, 1985; Salazar y Bustamante, 2003; Charles Darwin Foundation, 2004). Existen también amenazas relacionadas con la interacción directa o indirecta del ser humano, como la caza ilegal, la muerte o heridas ocasionadas por el contacto con redes y anzuelos, cortes por las hélices de embarcaciones, consecuencia de actividades pesqueras de la zona. Además de esto, el lobo marino de Galápagos es susceptible al contagio de enfermedades infecciosas como *Morbilivirus* y *Leptospira* que son transmitidas principalmente por animales introducidos como perros y ratas (Alava, 2006).

La Leptospirosis es una enfermedad zoonótica de significancia mundial, que es causada por una espiroqueta patógena del género *Leptospira* (Levett, 2001). Esta bacteria tiene un alto rango de infección que puede afectar a humanos y a una variedad de mamíferos domésticos y salvajes, incluyendo mamíferos marinos (Cameron, 2008). Las espiroquetas, en individuos infectados, son excretadas al ambiente por la orina. Humanos y animales, se infectan al entrar en contacto con la fuente de contaminación

como agua y suelo contaminados. La bacteria es capaz de atravesar las mucosas o la piel lastimada (Levett, 2001). Las espiroquetas se mueren rápido tras la desecación, alta salinidad, la exposición al calor y a detergentes o desinfectantes, pero permanecen viables durante varias semanas en agua dulce, salobre estancada o en el suelo húmedo (Mims, 1999).

Esta enfermedad se caracteriza por presentar cuadros febriles, hemorragias petequiales, fallo renal, hepático, y abortos (Godinez, 1999). *Leptospira interrogans* serotipo *Pomona* ha sido detectada como la causante de abortos y muerte de leones marinos (*Zalophus californianus*) (Godinez, 1999). El aborto es una manifestación frecuente de Leptospirosis en lobos marinos (Colagross et al. 2002). Estos brotes de la enfermedad han ocurrido repetida y cíclicamente en las costas californianas desde aproximadamente los años 70's, causando la muerte de numerosos individuos (Cameron, 2008).

El diagnóstico de la Leptospirosis se basa generalmente en la demostración de anticuerpos del suero con un test serológico, como el Test de Aglutinación Microscópica y ensayos de ELISA (Bal, 1994). La prueba se considera específica de Leptospirosis cuando se detecta seroconversión, es decir, aumento significativo del título de anticuerpos entre muestras de suero o cuando se obtienen títulos elevados en una sola muestra (< 1: 800). Sin embargo, puede haber reacciones serológicas cruzadas con sífilis, borreliosis recurrente, enfermedad de Lyme y legionelosis (WHO, 2003). El uso de la técnica que utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

ha sido establecido como la mejor prueba de diagnóstico de *Leptospira* para mamíferos marinos (Cameron, 2008), al ser una técnica sensible, específica y rápida para la detección de varios microorganismos, así como fiable a un amplio rango de muestras como, suero, orina, y tejidos (Bal, 1994).

Hoy en día la Leptospirosis es considerada como una de las enfermedades infecciosas emergentes más importantes en todo el mundo incluyendo Sud-América, en donde se la relaciona con eventos del Niño (Levett. 2001). Especialmente en zonas tropicales y en sitios donde los humanos conviven con animales silvestres o domésticos. Puede transmitirse por contacto directo o indirecto a través de la orina a las personas (Levett, 2001).

2. Objetivos

El objetivo del presente estudio fue conocer los principales impactos que están afectando al estado de salud y la dinámica poblacional del *Zalophus wollebaeki* y determinar la presencia o ausencia de *Leptospira* en muestras de orina y tejidos de lobos marinos en la isla San Cristóbal.

3. Área de estudio

En la isla San Cristóbal se encuentran establecidas ocho colonias reproductivas de *Z. wollebaeki*. Para el estudio nos enfocamos en cuatro colonias, donde se realizaron monitoreos regulares: Punta Carola (0°53'24.94"S, 89°36'43.04"O), Playa Mann (0°53'44. 86"S, 89°36'33.01"O)

(Figura No. 1), Playa de Oro- Malecón - Muelle del turista y Playa de los Marino-II Zona (Figura No. 2). y dos donde se realizaron censos y monitoreo esporádicos: Punta Pitt (0°42'37.03"S, 89°15'13.77"O) y La Lobería (0°55'40" S, 89°36'43" W) (Figura No. 3).

4. Metodología

4.1 Monitoreo de poblaciones:

Para el censo de poblaciones se usó la información recopilada del proyecto Lobos, de censos y monitoreos realizados desde el 2008. A estos datos se les adicionó los resultados obtenidos durante censos diarios realizados del 9 de julio hasta el 2 de septiembre del 2010. Los censos realizaron desde las 5:30 am hasta las 9:00 am de la mañana o en la noche a partir del las 18:00 pm, los datos fueron registrados en la ficha de monitoreo (Ver Anexo No. 1) tomando en cuenta la siguiente información: Fecha, lugar, hora del día y estado de la marea. Adicionalmente se contó el número de individuos tomando en cuenta el sexo y estado de madurez. Los individuos que no pudieron ser categorizados en machos o hembras adultas se los clasificó como adultos desconocido. También se hizo un registro de la presencia de lobos enfermos, heridos y muertos (Anexo No. 2). Los problemas observados y enfermedades fueron descritos bajo las siguientes cinco categorías:

- **Impactos humanos:**

Humanos-pesqueros: Corresponden a impactos derivados de actividades pesqueras, como lobos heridos por anzuelos, redes, líneas de pesca.

Humanas directas: Corresponden a lobos encontrados muertos o heridos por causa de machetazos, cortes por cuchillo, golpes, etc.;

Humanas indirectas: Representan los casos de lobos heridos por hélices de embarcaciones, enredados en sogas, o atorados con basura, etc.

- **Enfermedades:**

Como parasitosis, alteraciones de la piel, alteraciones en los ojos.

- **Impactos por animales introducidos:**

Como mordeduras

- **Inanición:** Corresponden a los casos de lobos cachorros y juveniles encontrados con notable pérdida de peso y fatiga extrema como consecuencia de la prolongada insuficiencia de alimentos (Stratton. et al., 2003).

- **Desconocido:**

Se clasifica dentro de esta categoría cuando no se conoce la causa exacta de enfermedad, herida o muerte del animal.

Los censos se realizaron en las 3 colonias reproductivas más importantes: Playa Mann, Playa de los marinos y II Zona, las colonias localizadas en el Malecón y Playa de Oro fueron agrupadas como una sola colonia para facilitar

los conteos, aunque también se realizaron monitoreos menos frecuentes en otros lugares como Punta Carola: (0°53'26" S, 89°34 '46" W), Punta Pitt y La lobería (0°55'40" S, 89°36'43" W) (*Figura No. 3*)

4.2 Análisis para detectar *Leptospira* en muestras

Para el análisis se tomaron muestras de 21 individuos diferentes:

- 18 muestras de orina en arena
- 13 muestras de orina preservadas en tarjetas FTA
- 7 muestras de tejido de riñón y placenta

4.2.1.1 Muestras de orina en arena

Se tomaron 26 muestras de orina en arena, 8 fueron descartadas por problemas durante el transporte. En total se procesaron 18 muestras. Para evitar la toma de muestras de los mismos individuos, el muestreo se lo realizó en diferentes secciones de la playa tomando en cuenta que los lobos marinos son fieles a ciertas secciones en la colonia (Wolf y Trillmich 2008) Se identificó al individuo durante la micción sobre la arena, se esperó que el individuo se aleje del lugar y se procedió a deslizar una cuchara de plástico estéril sobre la superficie mojada. La muestra de arena y un duplicado fueron colocados en 2 tubos Eppendorff, con etanol al 90% (*Figura No.4*).

4.2.1.2 Muestras de orina en tarjetas FTA

Se tomaron 13 muestras de orina en tarjetas FTA, estas fueron colectadas de la misma manera y simultáneamente que las muestras de orina en arena. La arena con orina fue colocada sobre las 4 aéreas presentes en la tarjeta FTA. Se esperó hasta observar el cambio de color de rosa a blanco comprobando así que la muestra fue tomada exitosamente. (*Figura No. 5 a y b*). Se dejó secar al ambiente, se rotuló con lápiz y fue guardada en una funda Ziploc. Se debe tener en cuenta que para este procedimiento es necesario el uso de guantes y que el papel no sea expuesto a los rayos del sol directamente, desde el inicio hasta que los FTA hayan sido guardados, para no alterar los resultados.

4.2.1.3 Muestras de tejido

Tras necropsias usando el protocolo de Geracy y Lounsbury (2005), se recolectaron muestras de tejido de 7 individuos distintos. Se tomaron tres muestras de riñón y una de placenta de individuos encontrados muertos y tres muestras de tejido de placentas expulsadas de cachorros recién nacidos vivos. Las muestras fueron recolectadas asépticamente, almacenadas y transportadas en tubos Falcom en etanol al 90%.

4.2.2 Extracción de ADN

4.2.2.1 Técnica de extracción de ADN con CTAB

Esta técnica de extracción se basa en el uso de un detergente catiónico fuerte (bromuro cetil trimetil amonio) que rompe las membranas celulares al reducir la tensión superficial y junto con la adición de otros compuestos se logra la precipitación del ADN separándolo del resto de elementos celulares. Se siguió el protocolo de extracción con el método de CTAB, con algunas modificaciones en las siguientes cuatro etapas:

1. **Lavado:** Se separó el sobrenadante de la arena, se añadió 1ml PBS 1X (137Mm NaCl; 2,7 MmKCl; 4,3 Mm Na₂HPO₄.7H₂O, 1,4 Mm KH₂PO₄, pH7) se agitó varias veces para lavar bien los granos de arena, se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos, se aspiró el PBS 1X y se agregó un nuevo volumen. Se centrifugó una vez más. Se repitió este proceso tres veces.
2. **Lisado:** Se colocó 700µl de CTAB (CTAB 2% p/v, ClNa 1,4M, EDTA 20Mm pH 8, HCl 100Mm pH 8) y se dejó incubar a 65 °C por 2 horas, se agitó las muestras cada 15 minutos para facilitar la ruptura de membranas.
3. **Separación del ADN:** Se dejaron enfriar las muestras a temperatura ambiente. Se agregó 700µl de cloroformo – alcohol isoamílico en una

proporción 24:1. Se mezcló invirtiendo vigorosamente hasta formar una emulsión.

4. **Precipitación del ADN:** Se agregó 50 µl de acetato de sodio 3M pH: 5 y 1000µl de etanol al 100% a temperatura de hielo. Se mezcló varias veces por inversión y se dejó a - 20°C toda la noche.

4.2.2.2 Extracción de ADN a partir de tarjetas FTA

Los papeles FTA son una tecnología patentada por Whatman FTA y son utilizados para coleccionar, transportar y archivar los ácidos nucleicos a temperatura ambiente. Consisten en una membrana de celulosa de algodón que contiene químicos liofilizados que lisan las células. De esta manera los ácidos nucleicos son atrapados físicamente en la matriz del papel siendo inmovilizados y estabilizados. Para su purificación se realizó un punch en cada porción de la tarjeta FTA, cada uno de los punch fueron colocados en un tubo Eppendorf y se los lavó con el reactivo de purificación FTA, se enjuagó con el tampón TE 1X. Los punch resultantes fueron utilizados directamente en la mezcla de la reacción para el PCR.

4.2.2.3 Técnica de extracción de ADN con kit de ROCHE

Se siguió el protocolo de extracción del kit de ROCHE. El inciso No. 2.4 describe la metodología a seguir para la purificación de ácidos nucleicos a partir de tejido de mamíferos. (Ver Anexo No. 3)

4.2.3 Amplificación de ADN utilizando la técnica del PCR

Para la detección de *Leptospira*, los ADN extraídos de las muestras de orina, tejido y de orina en tarjetas FTA fueron analizados por PCR. Como control se utilizó ADN extraído a partir de cepas de *Leptospira* spp. que se mantienen en el Laboratorio de Microbiología de la USFQ. Para seleccionar los cebadores en cada PCR se siguió el procedimiento descrito en la Figura No. 6. En total se probaron 4 sets de cebadores:

4.2.3.1 Cebadores de actina

Este par de cebadores está diseñado para amplificar una región de 289pb del exón III del gen de beta - actina . Son utilizados como control positivo para reacciones de PCR con templados de ADN genómico o ADNc. La secuencia de estos cebadores es la siguiente:

F: 5' CGG AAC CGC TCATTG CC 3',

R: 5' ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA 3'

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador marca Biometra T1 con el programa Vero –Actina. Las condiciones

térmicas del PCR para la amplificación de los cebadores de actina fueron: Temperatura de denaturación de 94°C por 2 minutos, el programa consiste en 35 ciclos de 92°C por 50 segundos, el annealing a 45°C por 50 segundos y la extensión de 72°C por 2 minutos. El volumen final de la reacción fue de 25µl. (5µl de Buffer 5X, 0.75µl de MgCl₂ 25mM, 2,5µl de dNTPs 1000uM, 0.1µl de Taq 5U, 4 µl de cebadores forward y 4µl de primer reverse de actina, en la mezcla de la reacción) para finalmente adicionar 2 µl de ADN.

4.2.3.2 Cebadores AB-CD

El set de cebadores AB - CD son específicos para el género *Leptospira*. Amplifican un fragmento de 298pb en la estructura primaria del gen 16S (Mérien., et al, 1992). Consisten en 4 oligonucleótidos con las siguientes secuencias:

A: 5´GGCGGCGCGTCTITAAACATG-3´;

B: 5'-TTCCCCCATTGAGCAAGATT-3',

C: 5'-CAAGTCAAGCGGAGTAGCAA-3´;

D: 5'-CTTAACCTGCTGCCTCCCGTA-3'

Los oligonucleótidos A y B corresponden a los nucleótidos del 38 al 57 y del 348 al 368 respectivamente y los oligonucleótidos C y D corresponden al 58, 77 y 328 y 347 respectivamente (Mérien., et al, 1992).

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador marca Biometra T1 con el programa Lepto – LTS. Las condiciones térmicas para los cebadores AB - CD fueron: Temperatura de desnaturalización a 94°C por 3 minutos, annealing a 63°C por 1.5 minutos, y la extensión a 72°C por 2 minutos, los siguientes 29 ciclos consisten en denaturación a 94°C por 1 minuto y la extensión a 72°C por 2 minutos. El volumen final de la reacción fue de 25µl. (5µl de Buffer 5X, 1.5µl de MgCl₂ 25mM, 2,5µl de dNTPS 1000uM, 1µl de Taq 5U, 1 µl de cebadores A-B y 1µl de cebadores CD en la mezcla de la reacción) para finalmente adicionar 2 µl de ADN. .

4.2.3.3 Cebadores G1-G2

El set de cebadores G1-G2 amplifica un fragmento con un tamaño de 285pb (Oliveira, 2003) de especies patógenas de *Leptospira*, con excepción de *L. kishneri*. (Gravekamp et al., 1993) Los cebadores G1-G2 con la siguiente secuencia:

G1:5'CTGAATCGCGTGATAAAAGT3'

G2: 5' GGAAAACAAAATGGTCGGAAG3')

Corresponden a los nucleótidos 5' (1-20) y 3' (264-285) respectivamente de la secuencia del ADN inserto del plásmido recombinante pLIPs60, (Bal et al., 1994) Figura No. 7

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador marca Biometra T1 con el programa Lept G1-G2, bajo las siguientes

condiciones térmicas: Después del primer ciclo de denaturación a 95°C por 5 minutos, el programa consiste en 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, de annealing a 55°C por 1 minutos y la extensión a 72°C por 2 minutos. El volumen final de la reacción fue de 25µl. Para la mezcla de la reacción se utilizó 2.5µl de Buffer 5X, 0.75µl de MgCl₂ 25mM, 2µl de dNTPS 1000uM, 0.2µl de Taq 5U, 2.5 µl de cebadores G1 y 2.5µl de cebadores G2, se adicionó 2 µl de ADN.

4.2.3.4 Cebadores Lip32 F-R

El tercer set de cebadores es específico para un blanco de 423pb, el mismo que corresponde a las posiciones 270 y 692 en la región codificadora del gen lipL32. Este gen es conservado entre todos los serotipos patógenos de *Leptospira* (Levett, 2004). Incluyendo la genomoespecie *Kirschneri* pero solo la serovariedad *Gryppotyphosa*. Consisten en dos oligonucleótidos con las secuencias:

LipL32-270 F (5'-CGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATT-3'),

LipL32-692 R (5'-CCAACAGATGCAACGAAAGATCCTTT-3')

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador marca Biometra T1 con el programa Vero Lip32, bajo las siguientes condiciones térmicas: Después del primer ciclo de denaturación a 95°C por 5 minutos, el programa consiste en 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, de annealing a 57°C por 45 segundos y la extensión a

72 °C por 5 minutos. El volumen final de la reacción fue de 25µl. Para la mezcla de la reacción se utilizó 5µl de Buffer 5X, 0.75µl de MgCl₂ 25mM, 2µl de dNTPS 1000uM, 1µl de Taq 5U, 0.75 µl de primer forward y 2,25µl del primer reverse se adicionó 2 µl de ADN.

4.2.4 Electroforesis

Todos los productos de la PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 2.2%, teñido con bromuro de etidio en buffer TBE 1X. Finalmente los geles fueron observados en un transiluminador Vilber Lourmat con luz UV y fotografiado para su análisis con una cámara Kodak DC290ZOOM, Caja oscura EDAS 290, en el programa Kodak 1D 3.5.

4.2.5 Secuenciación y análisis

50ul del amplicón de todas las muestras que resulten positivas fueron mandadas secuenciar. Las secuencias producto fueron analizadas en el programa Mega5 (The Molecular Evolutionary Genetics Analysis) que nos permitió el alineamiento manual o automático de nucleótidos (Tamura, 2011). La información fué ingresada al BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) herramienta que nos facilitó la comparación entre nuestras secuencias con las secuencias almacenadas en la base de datos online GenBank y calcular la significancia estadística de similitud (NCBI, 2011).

5. Resultados

Se evaluaron dos aspectos de la población de lobos marinos *Zalophus wolfebaeki* en la isla San Cristóbal. 1) La condición general de salud de los individuos 2) La presencia /ausencia de Leptospirosis en las muestras tomadas.

5.1 Monitoreo de poblaciones

Los datos de censos poblacionales muestran una clara tendencia a la baja en las principales colonias de la Isla San Cristóbal como se puede observar en la figura No. 7, que muestra el promedio trimestral de lobos marinos contados en las colonias de La Lobería, Malecón, Carola, Playa de los marinos desde 2008 hasta Octubre del 2010. En los últimos años, los casos de lobos registrados muertos, enfermos o heridos han aumentado drásticamente. En el 2006 hasta el 2008, el número de casos registrados de lobos enfermos y heridos por año era como máximo 8 individuos. Como se observa en la figura No. 8 en el 2009 se registraron hasta 44 casos de lobos muertos y en el 2010 los casos de lobos heridos aumentaron hasta los 36. Los datos recopilados desde el 2005 hasta el 2010, revelan que acciones humanas (29%), abortos (20%) y desnutrición en cachorros y juveniles (10%) son una de las principales causas de heridas, enfermedad y

muerte en la población de lobos marinos. Seguidas de parasitosis (9%) e impactos causados por animales introducidos (3%). (Figura No. 9)

Dentro de la categoría de impactos humanos, las acciones derivados de la actividad pesquera (**humanos-pesqueros**) son los que registran mayor incidencia con un 55%, seguido de las acciones **humanas indirectas** con un 24% y por último las acciones **humanas directas** que corresponden al 21%. (Figura No. 10)

La Figura No. 11 revela que el año donde mayor impacto a la población de lobos marinos fue en el 2009 en el IV trimestre y coincide con la época donde se presentaron los 15 casos de abortos en playas de Puerto Baquerizo Moreno. Y como muestra la figura No. 12 la mayor prevalencia de lobos marinos enfermos, heridos y muertos se presenta en las playas más pobladas como Playa de los marinos, La Lobería, Zona Naval, Playa Mann.

5.2 Análisis de las muestras para determinar la presencia de Leptospira

Se extrajeron 18 muestras de ADN de orina recolectada en la arena (Tabla No. 1), 7 muestras de tejido placentario y renal (Tabla No. 2) y se procesaron 13 tarjetas FTA con orina. (Tabla No. 3)

5.2.1 Muestras de orina en arena

De las 18 muestras (Tabla No.1) una muestra de orina en arena (OR2) resultó positiva para los cebadores AB - CD. (Figura No. 13) Para

confirmar este resultado, 50µl del amplicón de la muestra de orina en arena positiva (OR2) fue enviado a secuenciar. Los resultados fueron analizados con el programa Mega5. La secuencia obtenida fue alineada con las secuencias disponibles en bases de datos del Genbank. Los resultados muestran que la secuencia obtenida no pertenece a *Leptospira* como se pensó al amplificar correctamente con los cebadores AB y CD. Lo que se encontró es que las secuencias obtenidas corresponden a una bacteria de la familia *Firmicutes* del género *Ruminococcus*. La secuencia del gen 16S rRNA de *Ruminococcus* fue confrontada con la secuencia de los primer CD. Como nos muestra la Figura No. 14 se obtuvo un porcentaje de similitud del 65% para el primer C y el 71,4% para el primer D.

5.2.2 Muestras de tejido renal y placentario

El ADN de 4 muestras de tejido; Tres de riñón (R1, R2, R3) y uno de placenta (P1) procesadas con la técnica de extracción de ADN con CTAB fueron amplificadas con los cebadores AB y CD. Como se observa en la Figura No. 15 las muestras R1, R2, R3 y P1 no amplificaron con los cebadores AB y CD. Los controles positivos amplificaron correctamente con los dos sets de cebadores.

Posteriormente se utilizó otro método de extracción de ADN. Las 4 muestras de tejido (R1, R2, R3, P1) mencionadas anteriormente y adicionalmente tres muestras más de placenta (P2, P3, P4) fueron

procesadas con el kit de extracción de ROCHE. Estas 7 muestras fueron sometidas a PCR con los cebadores AB y CD. Como se puede observar en la Figura No. 16, cinco muestras de tejido, tres de riñón y dos de placenta (R1, R2, R3, P3, P4) son positivas a *Leptospira* con los cebadores AB y CD. Las bandas coinciden con el tamaño (298pb) e intensidad de la del control positivo. Las muestras P1 y P2 son negativas.

Para confirmar este resultado, 50µl del amplicón de las 5 muestras positivas amplificadas con los cebadores AB y CD fueron enviadas a secuenciar. Los resultados al ser comparados con las secuencias del Genbank coinciden con las secuencia de *Leptospira* sp. No se pudo identificar la especie de *Leptospira* ya que hubo ruido en las secuencias, como se puede observar en los espectrogramas del Anexo No. 3

Las 5 muestras positivas a *Leptospira* con los cebadores AB y CD fueron amplificadas con un segundo set de cebadores: G1-G2, para tratar de identificar si pertenecen a una genomoespecie patógena o saprófita. Como se observa en la Figura No. 18. Las 5 muestras correspondientes a R1, R2, R3, P3, P4 fueron negativas a la amplificación con cebadores G1-G2. El control positivo amplificó correctamente, presentando una banda clara, sin bandas inespecíficas. Finalmente las muestras positivas fueron amplificadas con un tercer set de cebadores: Lip32 F-R. Como se observa en la Figura No. 19 las muestras R1, R2, R3, P3, P4 no amplificaron con estos cebadores, los

controles positivos muestran unas bandas claras, el control positivo 2 (C+2) perteneciente al serotipo patógeno *Ichterohaemorrhagiae* presenta una banda de mayor intensidad, el control positivo del serotipo *Copenhageni* presenta una banda delgada y no tan clara. También se utilizó como segundo control negativo (C-) una cepa de leptospira saprófita (*L. biflexa*).

5.2.3 Tarjetas FTA

Se amplificaron 5 muestras de las tarjetas FTA™: 3, 4, 5, 13 (Tabla No. 3) con cebadores de actina para comprobar la existencia de ADN en las tarjetas y verificar si este es un método aceptable para la recolección de muestras de orina en arena de lobos marinos.

Como se puede observar en la Figura No. 20, las 5 muestras de las tarjetas FTA no amplificaron con los cebadores de actina. El control positivo (ADN de riñón) amplificó correctamente, se observa una banda intensa y el peso molecular correspondiente al fragmento producido por estos cebadores.

En un segundo intento se procesó el resto de las muestras en las tarjetas FTA con los cebadores de actina y a un duplicado con los cebadores AB y CD. Como se puede apreciar en la Figura No. 21 ninguna de las muestras (1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) amplificaron con los cebadores de actina. El control positivo 2 (ADN de placenta) amplificó una banda intensa bastante clara, por el contrario la gota de sangre

colocada en una tarjeta FTA (como segundo control positivo) y procesada con el resto de tarjetas muestra una mancha, no clara y casi imperceptible. Se puede observar también que los punch de las muestras 1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14 sometidas a PCR con cebadores CD no muestran amplificación alguna. El control positivo es una banda intensa y corresponde al tamaño del fragmento esperado: 298pb.

6. Discusión

6.1 Censo poblacional y registro de problemas

Los resultados muestran fluctuaciones poblacionales evidentes, sobretodo en el aumento gradual de individuos en las colonias de Playa Mann y Punta Carola que posiblemente se deben a movimientos migratorios de hembras y machos sub-adultos y adultos entre las diferentes playas con un aumento en Playa de los Marineros en la época caliente y a Carola en la época fría.

En general la población de lobos marinos en las principales colonias tiene una leve tendencia negativa, lo cual por un lado puede deberse a efectos naturales como fenómenos del niño recientes del 2009 y 2010. Sin embargo la tendencia negativa es más evidente en el primer semestre de 2009 cuando las condiciones marinas aún estaban favorables, 2°C 3°C por debajo de lo normal (CIIFEN) y en general Galápagos se encontraba en condiciones más bien frías y productivas (Banks et al 2009). A contrario, se nota un aumento en la cantidad de lobos marinos hacia finales de 2009 y inicios de 2010 cuando el Niño se encontraba en su fase más fuerte

(NOAA). Por otro lado el evidente aumento desde el 2008 de lobos heridos y muertos por impactos humanos ya sea por su acción directa o indirecta podría ser un factor clave en este descenso poblacional de los lobos marinos.

Los lugares donde se encontró la mayor prevalencia de lobos marinos heridos, muertos o enfermos coinciden con los lugares de mayor población e interacción con humanos, claro ejemplo es la Playa de los marinos, localizada en medio de la urbanización, alberga una de las colonias reproductivas más importantes y es uno de los lugares de mayor porcentaje de casos de abortos y lobos heridos, enfermos o muertos.

Es sorprendente que el mayor porcentaje (29%) de causas de heridas, enfermedad o muerte de los lobos pertenezcan a la acción directa o indirecta del ser humano, este porcentaje es compartido con el de causas desconocidas y que dentro de esas causas la que más incidente provoca, es la derivada de la actividad pesquera. Estudios paralelos muestran que existe una creciente confrontación entre lobos marinos y pescadores. En estudios de percepción de los pescadores de los lobos marinos en la Isla San Cristóbal los pescadores reclaman que los lobos no solo disminuyen su provisión de pesca sino que interfieren con sus técnicas de pesca. (Denkinger et al. En rev.,) Evidenciando la urgente necesidad de mejorar el manejo de lobos marinos en Puerto Baquerizo Moreno con control en las colonias y programas de educación ambiental dirigido a la población local y pescadores.

6.2 Detección de *Leptospira* sp. muestras de *Zalophus wollebaki*

De los 21 individuos 5 resultaron ser positivos a *Leptospira*. Por primera vez se demuestra la presencia de ADN de *Leptospira* en la población de lobos marinos de Galápagos utilizando PCR como herramienta molecular para la detección de esta enfermedad. Estudios previos detectaron anticuerpos contra diversas serovariedades de *Leptospira* spp., mediante la prueba inmunológica de Aglutinación Microscópica (Simental, 2006). De las 18 muestras de orina procesadas solo 1 amplificó con los cebadores CD. Según Mérien et al., 1992 y Levett, 2001, estos cebadores son específicos para el género *Leptospira* y hasta el momento sólo habían sido probados en muestras clínicas; nuestro trabajo probó la especificidad de estos cebadores en muestras ambientales y los resultados demuestran que los cebadores AB-CD amplifican también la secuencia del gen 16S de la bacteria *Ruminococcus*, generando un fragmento de similar tamaño (313pb) al esperado de la amplificación de CD para *Leptospira* (298pb). Esta diferencia en 15 pares de bases es imperceptible al realizar la electroforesis en gel de agarosa, sin embargo, el secuenciamiento de los amplicones demostró lo antes mencionado.

En el caso de los métodos de extracción de ADN utilizados en las muestras de tejido, la más eficiente fue la del kit comercial ROCHE, debido a la pureza del ADN obtenido. Por otro lado los resultados iniciales al utilizar el método de extracción de CTAB fueron falsos negativos, posiblemente por la

presencia de compuestos inhibitorios de PCR debido al alto contenido orgánico de las muestras. La extracción de ADN a partir de muestras de orina en arena en trabajos similares (Cameron et al., 2008; Koski, Lowenstine, F. M. D. Gulland, Colagross, & Morgan, 1996) muestran el uso de kits comerciales específicos para suelo, estos kits retiran compuestos inhibitorios y “humics” de la muestra evitando la obtención de falsos negativo; esta puede ser la explicación de la negatividad encontrada en estas muestras. Las tarjetas FTA son un método alternativo, rápido y eficaz de estabilización, protección y transporte del ADN de diversas muestras (Perozo, 2006) Sin embargo en nuestro estudio esta metodología no tuvo éxito al recolectar las muestras de orina en arena., Una posible explicación puede ser que los granos de arena colectados con orina de lobo absorbieron muy bajas cantidades de muestra, lo cual pudo haber afectado en la absorción del ADN en el papel.

Según bibliografía consultada las serovariedades de *Leptospira* pueden infectar indistintamente a cualquier especie animal, aunque existen algunas serovariedades que son más comunes por especie, como por ejemplo *Hardjo* en bovinos, *Canícola* en perros, *Panamá* en cerdos. Pese a esto existen registros de la presencia de distintas serovariedades en lobos marinos de otros lugares por ejemplo en las costas de California se aisló la serovariedad Pomona a partir de muestras de riñón de *Zalophus californianus* (Gulland, 1996) coincidiendo con la presencia de *Leptospira pomona* en la población canina (Colagross et al. 2002). En pruebas serológicas realizadas en lobos marinos de Galápagos en el 2006 se

detectaron dos serovariedades de *Leptospira*: Hebdomadis y Patoc (Simental, 2006), por tanto existe la posibilidad que esta enfermedad en los lobos marinos sea endémica, reflejando el efecto de los procesos evolutivos debido a las condiciones ambientales a largo plazo, la dinámica poblacional o el aislamiento geográfico.

La fuente de infección de *Leptospira* para los lobos marinos de las Islas Galápagos podrían ser los roedores, caninos, humanos y otros mamíferos, aunque para identificar la fuente directa de infección es necesario conocer la especie de *Leptospira* encontrada.

La literatura consultada demuestra que las bacterias del género *Leptospira* son muy sensibles a la salinidad (Levett, 2001)(Mims, 2002). Debido a que los riñones de los lobos marinos producen orina altamente concentrada (Cidre, 1994) las bacterias eliminadas al ambiente en la orina de estos mamíferos podrían no ser viables, probablemente convirtiendo al lobo marino en un hospedero final de la enfermedad. Existe otra posibilidad y es que el tipo de *Leptospira* que está infectando a esta especie esté adaptada a vivir en este medio altamente salino.

No fue posible identificar la especie de *Leptospira* encontrada en las muestras positivas pero es improbable que el ADN de *Leptospira* encontrado en las muestras de riñones sea de una especie saprófita. Las muestras de riñón fueron recogidas asépticamente tras la necropsia y no existen registros que *Leptospiras* saprófitas colonicen los tejidos del huésped.

7. Conclusiones:

Los monitoreos a las distintas colonias reproductivas del *Zalophus wollebaeki* nos han permitido distinguir los principales impactos, ya sean naturales o los causados por el hombre, en colonias específicas como Playa de los Marinos, Playa Mann y la Lobería. Esta isla requiere una atención especial dado que en el asentamiento humano de Puerto Baquerizo se encuentra establecidas las principales colonias reproductivas de lobos marinos, lo que ha generado un alto índice de interacciones.

Por primera vez se demuestra la presencia de *Leptospira* en esta especie, esta información es de suma importancia para su conservación.

Existe la posibilidad de que el 20% de muertes registradas correspondientes a cachorros abortados en el 2009 puedan estar relacionados con la presencia de *Leptospira* en la colonia, pero debido a que no se logró procesar las muestras de los cachorros muertos sino de muestras tomados en individuos en las mismas colonias, pero 8 meses después no se puede afirmar con total certeza. Además al mismo tiempo de la aparición de los casos de abortos se empezó con la construcción de un muelle en el centro de la colonia de Playa de los Marinos con maquinaria y dinamita. Posiblemente parte de estas muertes prematuras pueden relacionarse con el estrés de las hembras preñadas en esta colonia. El hallazgo de las 5 muestras positivas por PCR a *Leptospira*, abren la posibilidad de que los casos de abortos estén relacionados con la presencia de la enfermedad en la colonia. Sin embargo

falta determinar la genomoespecie de *Leptospira* que circula en los lobos marinos de Galápagos.

8. Proyecciones a futuro

La importancia de este trabajo no solo radica en ser el primer estudio microbiológico en esta población o en los sorprendentes hallazgos encontrados, sino también en que abre el camino para nuevos estudios: como la evidente necesidad de investigar otras enfermedades infecciosas que podrían estar afectando al lobo marino, que al ser una especie endémica de Galápagos, reflejaría la condición de la salud del ecosistema a nivel local. También es de suma importancia implementar proyectos que a partir de los resultados obtenidos en este trabajo, busque conocer la prevalencia e incidencia de lobos infectados con *Leptospira* en la Isla San Cristóbal. Es importante iniciar con planes de manejo para controlar y prevenir la presencia de esta y otras enfermedades que afectan la salud de una especie tan sensible como es *Zalophus wollebaeki*

9. Bibliografía:

Adin, C.A. and L.D. Cowgill. 2000. Treatment and outcome of dogs with Leptospirosis: 36 cases (1990–1998). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 216: 371–375.

Alava, J.J.; Ikononou, M. G., Ross, P. S.; Costa, D. P., Salazar, S., Auriolles-Gamboa, D., Gobas, F.A.P.C. 2009. Polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in Galapagos sea lions (*Zalophus wollebaeki*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 28 (11): 2271-2282.

Bal.A.E, Graverkamp.C, et.al. 1994. Detection of Leptospire in urine by PCR for early diagnosis of Leptospirosis. *Journal of clinical microbiology*. Department of biomedical Research. Netherland 1894-1898.

Cameron E.Caroline, Rihard L. Zuerner et.al. 2008. Detection of pathogenic *Leptospira* bacteria in pinniped populations via PCR and identification of a source of transmission for zoonotic leptospirosis in the marine environment. *Journal of clinical microbiology*. Department of biochemistry and microbiology.Canadá. 1728-1733.

Cameron, C. E., Zuerner, R. L., Raverty, S., Colegrove, K. M., Norman, S. A., Lambourn, D. M., et al. (2008). Detection of Pathogenic *Leptospira* Bacteria in Pinniped Populations via PCR and Identification of a Source of Transmission for Zoonotic Leptospirosis in the Marine Environment. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(5), 1728-1733. American Society for Microbiology(ASM).Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2395076&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Cardona E, Marta Noelia, MOROS V, Rosalba María, LOPEZ L, Eneida Aurora et al. Diagnóstico de leptospirosis mediante la PCR en pacientes con síndrome febril icterohemorrágico. Rev. Soc. Ven. Microbiol. [online]. jun. 2008, vol.28, no.1 [citado 11 Agosto 2011], p.24-30. : <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562008000100006&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1315-2556.

Carrado-Bravo, Teodoro. Leptospirosis. Historia natural, diagnóstico y tratamiento. **Revista mexicana de patología clínica. Vol.54 No.5**

Cidre, L. D. (1994). OBSERVACIONES MORFOFUNCIONALES EN EL RIÑÓN, (1944), 213-223.

CIIFEN, 2009. Centro de investigación del fenómeno del niño.
http://www.ciifen-int.org/images/stories/Boletn_CIIFEN_Enero_2009.pdf
Revisado el 31 de Julio del 2011.

Colagross - Shouten, A.M., J.A.K. Mazet, F.M.D. Gulland, M.A. Miller and S. Hietala. 2002. Diagnosis and seroprevalence of Leptospirosis in California sealions from coastal California. *Journal of Wildlife diseases*, 38(1). Pp. 7-17.

Denkinger, J. y C. Gomez. En prep. Reacciones de lobos marinos a la presencia humana en la Isla San Cristobal.

Denkinger, Percepción de los pescadores ante la presencia de lobos marinos en la Isla San Cristóbal.

Whatman FTA® DNA Protection, 2011.

<http://www.whatman.com/UserFiles/File/Data%20Sheets/Bioscience/FTA%20DNA%20Protection.pdf>. Revisado el 12 de abril del 2011.

Gentry, Roger & Gerald Kooyman. 1986 Maternal Strategies on land and sea.

Gingrich E.N, Scorza A.V et.al. 2010. Intestinal parasites of dogs on the Galapagos Islands.

Godinez, Carlos R. Blanca Zelaya de Romillo, David Auriolles-Gamboa, Antonio Verdugo-Rodríguez, Ernesto A. Rodríguez-Reyes, and Alejandro De la Peña-Moctezuma. 1999. Antibodies against *Leptospira interrogans* in California Sea Lion Pups from Gulf of California. *Journal of Wildlife Diseases*, 35(1), 1999, pp. 108–111

Gravekamp, C., Van de Kemp, H., Franzen, M., Carrington, D., Schoone, G. J., Van Eys, G. J., et al. (1993). Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of cebadores. *Journal of general microbiology*, 139(8), 1691-700. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8409911>.

Koski, M., Lowenstine, L. J., Gulland, F. M. D., Colagross, A., & Morgan, L. (1996). LEPTOSPIROSIS IN CALIFORNIA STRANDED (*ZALOPHUS CALIFORNIANUS*) ALONG LIONS CENTRAL 1981 -1994. *October*, 1.

Hauk Pricila, et, al 2008. In LipL32, the Major Leptospiral Lipoprotein, the C Terminus Is the Primary Immunogenic Domain and Mediates Interaction with Collagen IV and Plasma Fibronectin. American Society for Microbiology Infection and Immunity, p. 2642-2650, Vol. 76, No. 6

Hookey JV. Detection of Leptospiraceae by amplification of 16s DNA ribosomal, FEMS Microbiol 1992; 90:267-74

IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.4. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on **18 May 2011**.

Levett, P. 2001. Leptospirosis. Clinical Microbiology Reviews. Apr. 2001, p. 296-326.

Merlen G, and Salazar S. 2007. Estado y efectos antropogénicos en los mamíferos marinos de Galápagos. Memorias, Taller de Trabajo sobre el Impacto de las Actividades Antropogénicas en Mamíferos Marinos en el Pacífico Sudeste. CPPS/PNUMA, Bogotá, Colombia, Noviembre 28–29, 2006, pp 70–76.

Mérien, F., Amouriaux, P., Perolat, P., Baranton, G., & Saint Girons, I. (1992). Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *Journal of clinical microbiology*, 30(9), 2219-24. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=265482&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Oliveira, M. a a. (2003). Low-stringency single specific primer PCR for identification of *Leptospira*. *Journal of Medical Microbiology*, 52(2), 127-135. doi: 10.1099/jmm.0.04923-0.

Mims, 1999. *Micobiología patógena*. Harcourt barce. Segunda edición. España

NCBI, 2011. The National Center for Biotechnology Information. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Revisado el 10 de enero del 2011.

NOAA, 2009. National Oceanic and Atmospheric Administration. http://www.cpc.ncep.noaa.gov/products/analysis_monitoring/enso_disc_jan2009/. Revisado el 31 de julio del 2011.

Norman, S.A, R.F. DiGiacomo, F. M. D. Gulland, J.S. Meschke, and M.S. Lowry. 2004. risk factors for an outbreak of leptospirosis in California sea lions (*Zalophus californianus*) in California. *Journal of Wildlife Diseases*, 44(4), 2008, pp. 837–844

Perozo, Francisco; Villegas, Pedro; Alvarado, Iván; Estévez, Carlos; Rivera, Sergio; Mavárez, Yaneth. 2006. UTILIZACIÓN DE LAS TARJETAS FTA® PARA EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE EN MUESTRAS DE FLUIDO ALANTOIDEO. *Revista Científica Redalyc*, Vol. XVI, Núm. 2, , pp. 118-123

Riedman Marianne, 1990. *The Pinnipeds, seals, Sea lions, and walruses.* University of California Press, Berkley, Los Angeles, USA.

Salazar, 2002. Lobo marino y lobo peletero. En: Reserva Marina de Galápagos. Línea Base de la Biodiversidad (Danulat E & GJ Edgar, eds.). pp 267-290. Fundación CharlesDarwin/Servicio Parque Nacional Galápagos, Santa Cruz, Galápagos, Ecuador.

Salazar, S., 2005. Variación temporal y espacial del espectro trófico del lobo marino de Galápagos (*Zalophus wolfebaeki*). Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias con Especialidad en Manejo de Recursos Marinos. Instituto Politécnico Nacional (IPN), Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR), La Paz, BCS, México. 113p.

Salazar, S. y R. Bustamante, 2003. The El Niño 1997–98 effects on the Galapagos sea lion. *Noticias de Galápagos*, 62:40–45, Galápagos, Ecuador.

Sambrook, Joseph, 2001 *Molecular cloning : a laboratory manual /* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Simental, 2006. Detección de anticuerpos contra *Leptospira* en lobos marinos (*Arctocephalus galapagoensis* y *Zalophuscalifornianus wolfebaeki*) de las Islas Galápagos, Ecuador. Tesis para obtención del título de médica veterinaria zootecnista. Mexico, DF.

Reference Laboratories, 2009. Diagnosing and Managing Canine Leptospirosis. Index Laboratories. United States

Rugsasuk, Sonsak. 2003 Detetion and diferentiation of pathogenic and non-pathogenic Lpetospira species by PCR. Mahidol university. Thesis for Master degree of sciences of mahidol University.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) **MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods.** Molecular Biology and Evolution doi: 10.1093/molbev/msr121.

Trillmich, F. 1979. Noticias de Galápagos, Charles Darwin Research Station, Quito-Ecuador, 29: 8-14.

Trillmich F and D Limberger 1985. Drastic effects of El Niño on Galápagos Pinnipeds. *Oecologia* 67: 19–22.

Visser, I.K.G., Teppema J.S. & Osterhaus A.D.M.E. 1991. Virus infections of seals and otherpinnipeds. *Rev. Med. Microbiol*, 2: 1-9.

WHO. World Health Organization. HUMAN LEPTOSPIROSIS: GUIDANCE FOR DIAGNOSIS, SURVEILLANCE AND CONTROL. **2003**

Wolf JBW, Trillmich F. 2008. Kin in space: social viscosity in a spatially and genetically substructured network. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society.*;275(1647):2063-9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2603206&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Wolf, J. B., Tautz, D., & Trillmich, F. (2007). Galápagos and Californian sea lions are separate species: Genetic analysis of the genus *Zalophus* and its implications for conservation management. *Frontiers in zoology*, *4*(1), 20. doi: 10.1186/1742-9994-4-20.

Yeates, C., Gillings, M. R., Davison, A. D., Altavilla, N. and Veal, D. A. 1997. PCR amplification of crude microbial DNA extracted from soil. *Letters in Applied Microbiology* *25*, 303-307.

Zurner,et, al. 1997. PCR assay for identification of *Leptospira interrogans* sensu lato serovars published erratum appears in *Journal Clinical Microbiology*

10. Apéndices

10.1 Figuras:



Figura 1: Mapa de la ubicación de las 4 colonias reproductivas de *Zalophus wollebaeki* monitoreadas con mayor frecuencia.

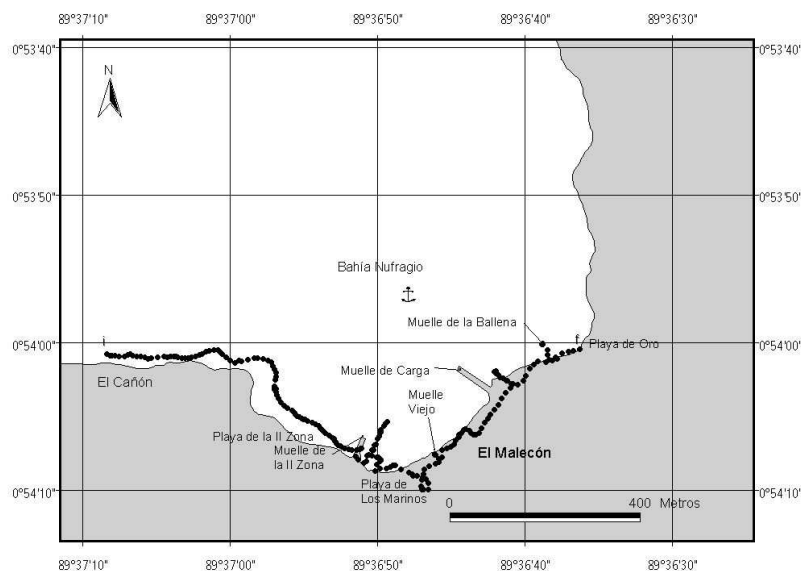


Figura 2: Mapa que muestra la ubicación 2 de las colonias monitoreadas con mayor frecuencia y su distribución a lo largo de Puerto Baquerizo Moreno.

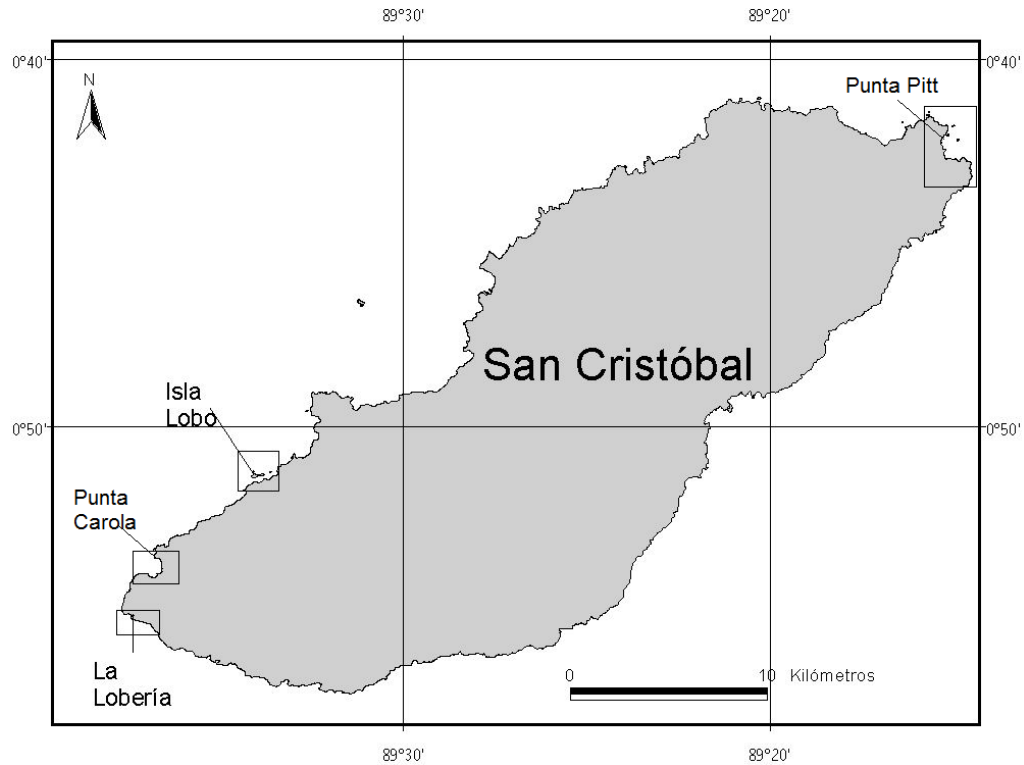


Figura 3: Mapa de la isla san Cristóbal con la ubicación de las colonias reproductivas de *Zalophus wollebaeki* que fueron monitoreadas esporádicamente.



Figura 4: Tubo Eppendorf con muestra de orina en arena. Se observa claramente dos fases. 1) alcohol y orina. 2) granos de arena precipitados

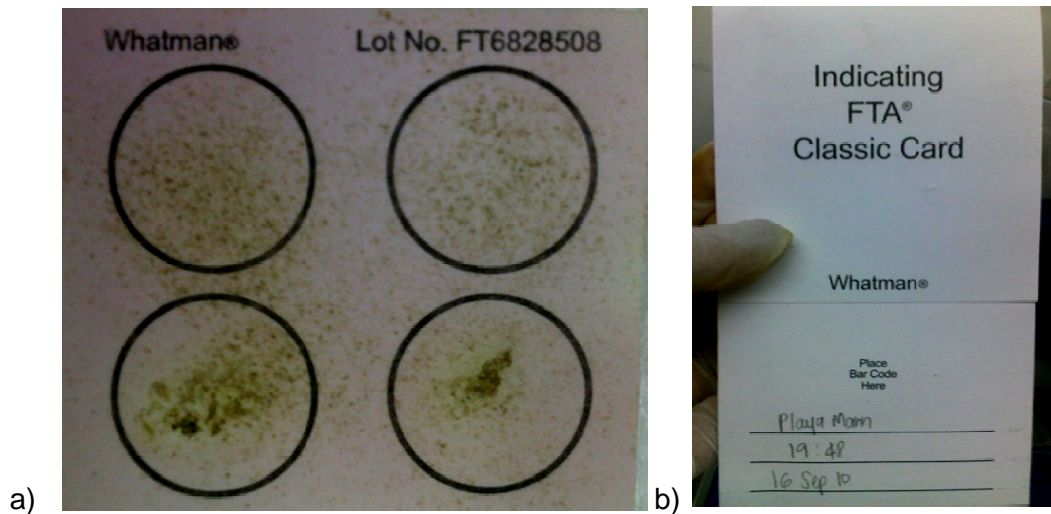


Figura 5: Tarjetas FTA con muestras de orina en arena. a) Cuatro zonas de muestras con arena, se observa el cambio de color. b) Tarjeta rotulada con el lugar de toma de muestra, hora y fecha.

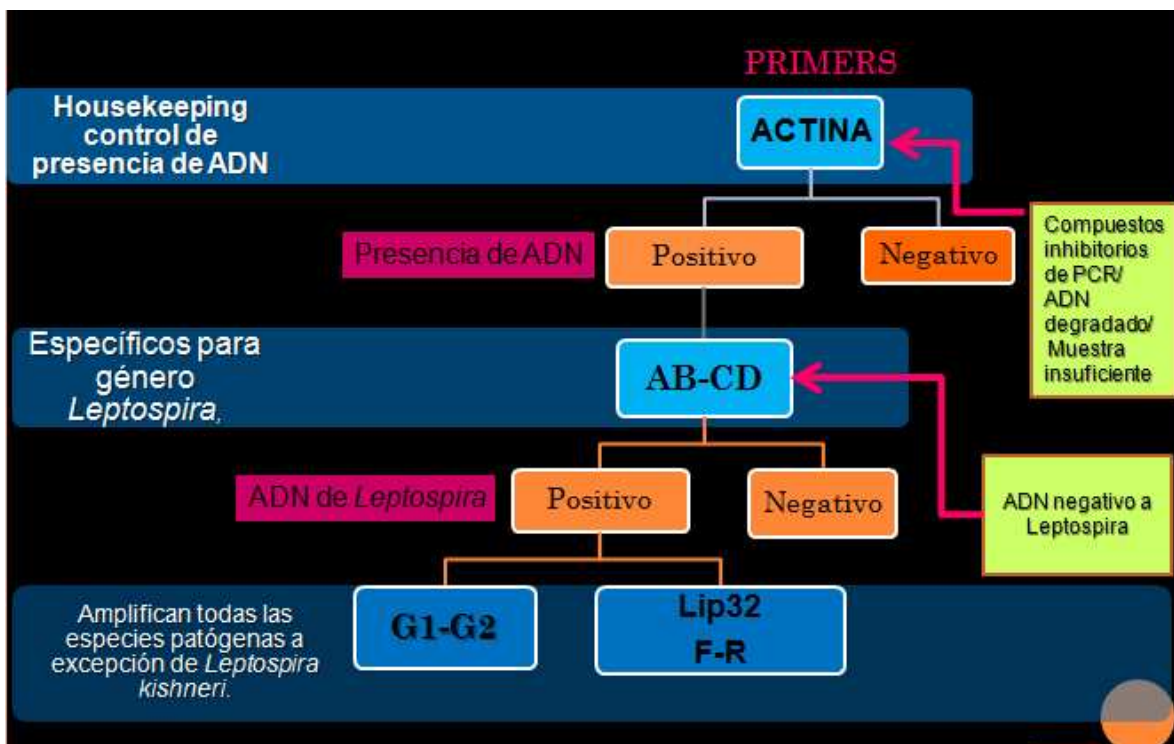


Figura 6: Algoritmo que nos muestra los criterios para la selección de cebadores en cada PCR.

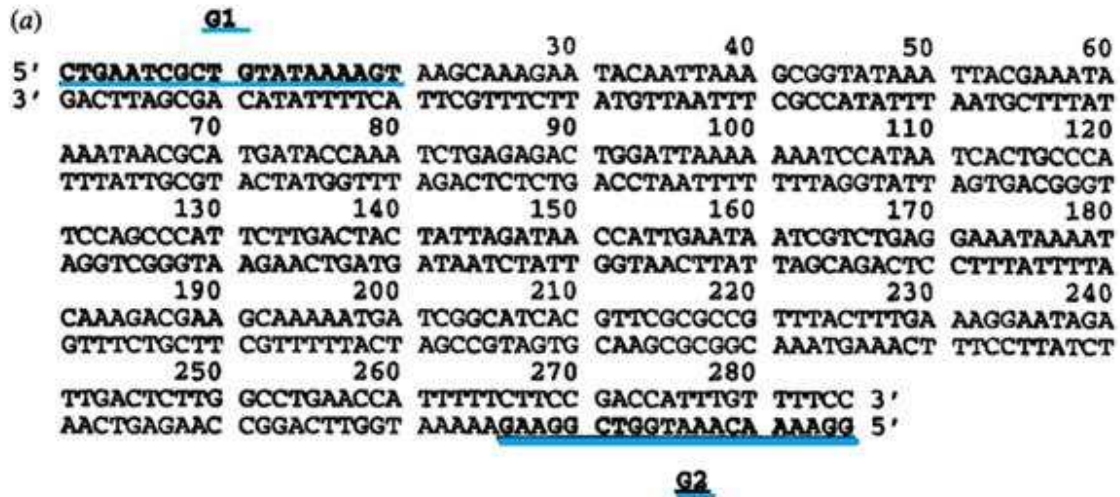


Figura 7: Secuencia del ADN inserto del plásmido pLIPs60 específica para los cebadores G1 y G2.

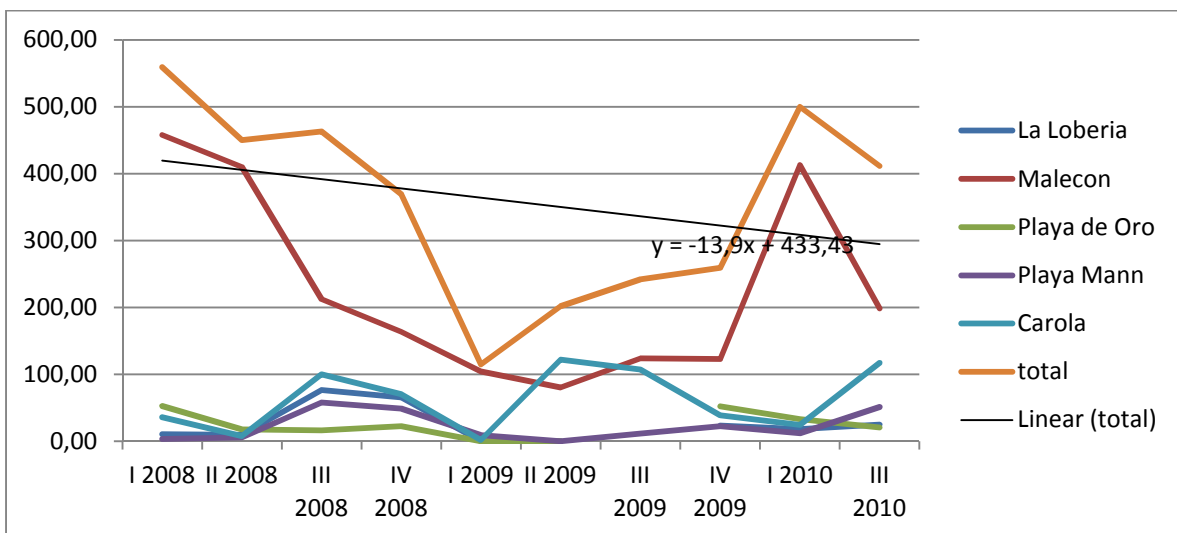


Figura 8: Promedio trimestral de lobos marinos contados en los diferentes colonias desde 2008 hasta Octubre del 2010.

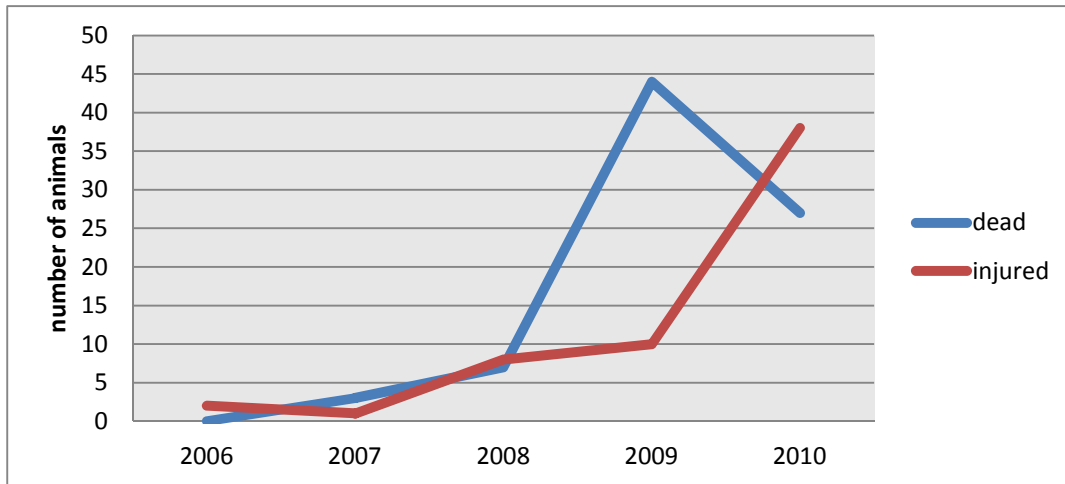


Figura 9: Fluctuación de la cantidad de animales muertos y heridos por año.

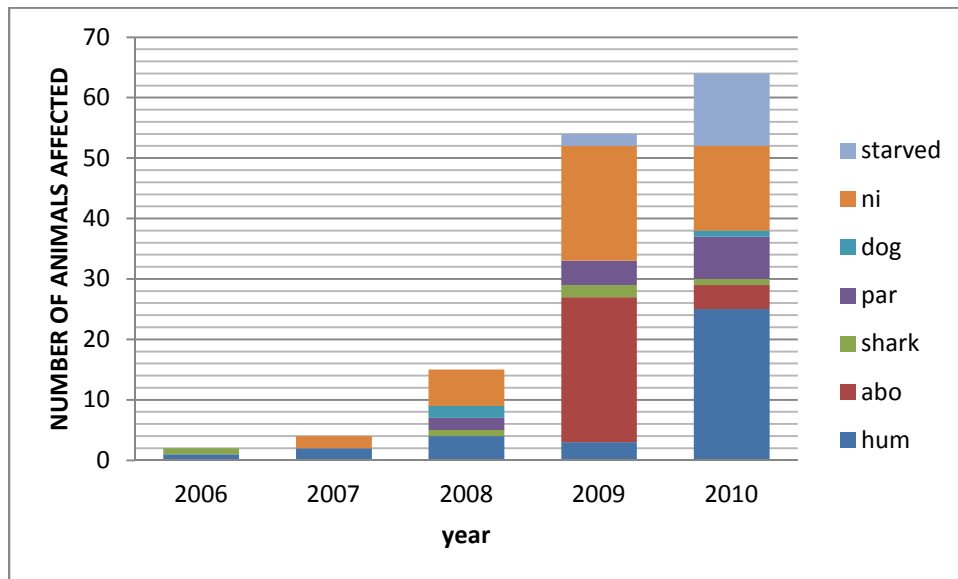


Figura 10: Porcentaje de los principales impactos por año, que afectan a la población de lobos marinos en la isla San Cristóbal.

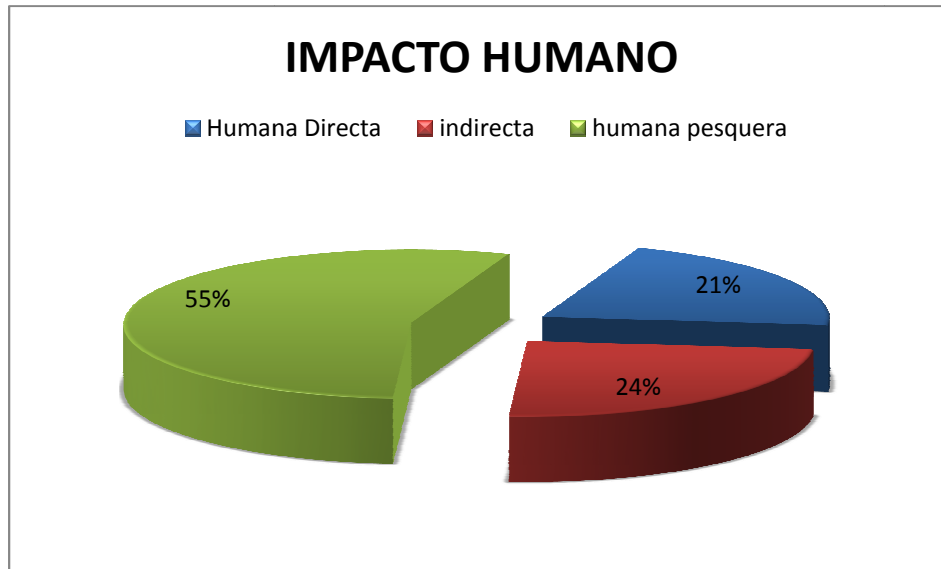


Figura 11: Tipo de impactos y los porcentajes, derivados de la acción humana en la población de lobos marinos.

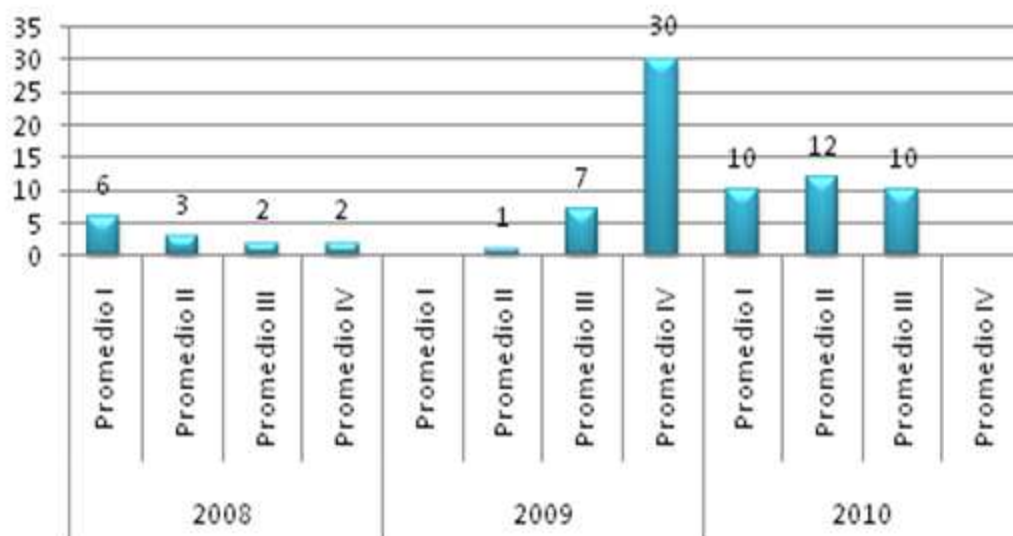


Figura 12: Incidencia de lobos heridos, muertos o enfermos con respecto al año y trimestre.

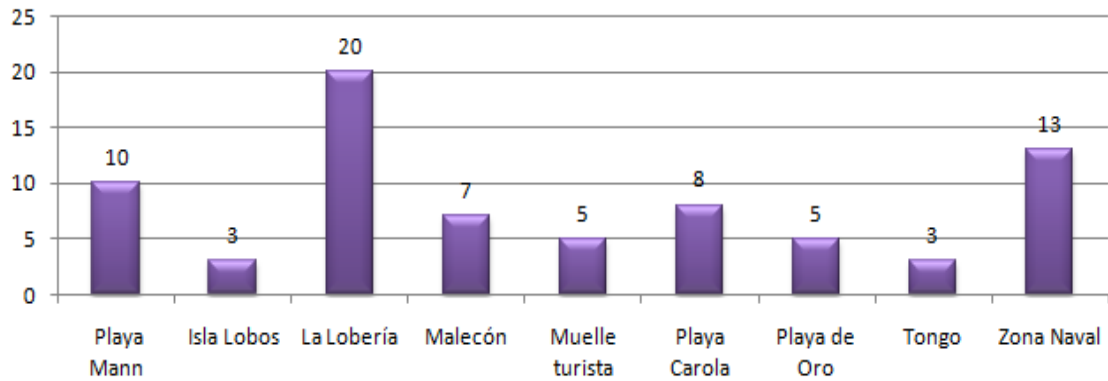


Figura 13: Lugares donde hubo mayor cantidad de impactos a la población de lobos.

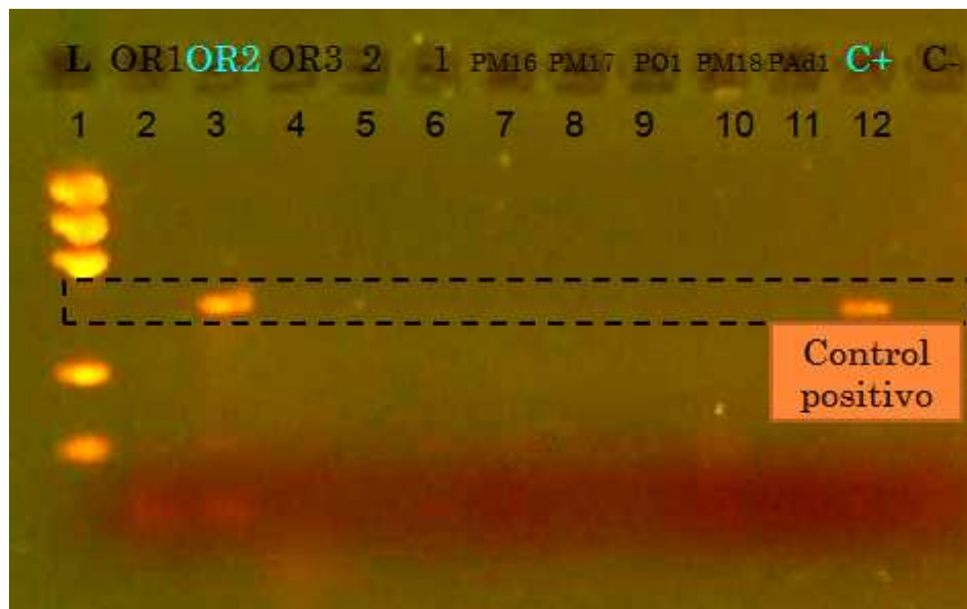


Figura 14: Gel de electroforesis. Muestras de orina en arena. PCR con cebadores AB-CD

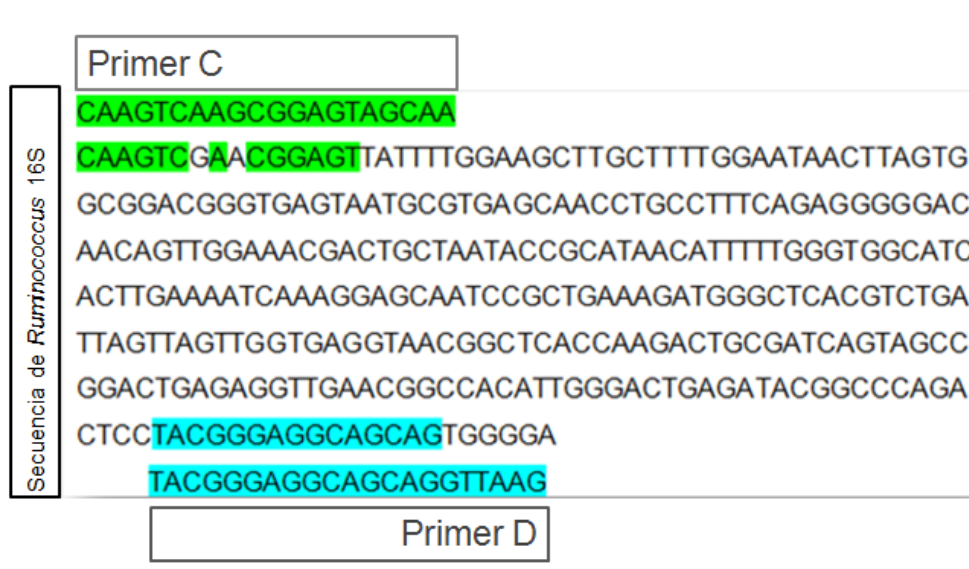


Figura 15: Secuencia del gen 16S de *Ruminococcus* pareada con cebadores CD. Primer C: secuencia de color verde pareada con secuencia 5' de *Ruminococcus*. Primer D: secuencia de color celeste pareada con secuencia 3' de *Ruminococcus*.

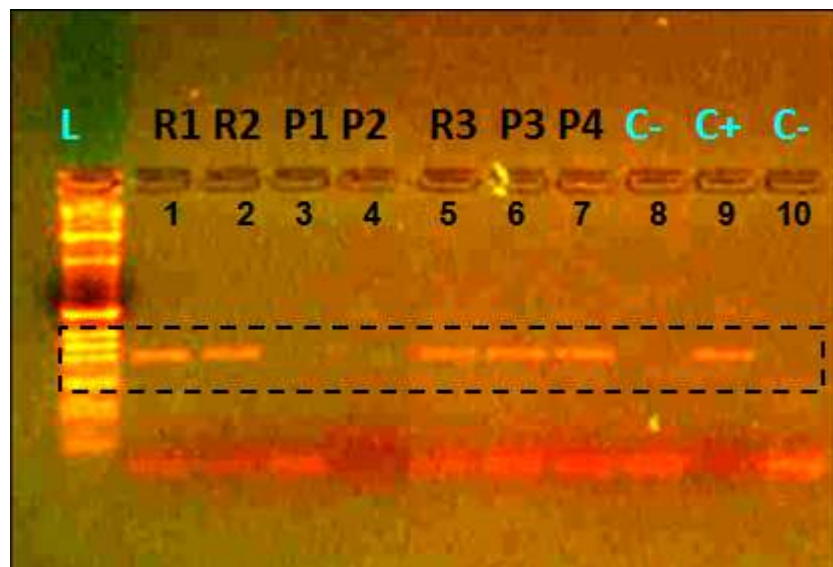


Figura 16: Detección de ADN de *Leptospira* en muestras de tejido. **L:** marcador de peso molecular 1kb. **R:** Muestras de riñón, **P:** muestras de placenta. **C-:** Control negativo (Master mix), **C+:** ADN de cultivo de *Leptospira interrogans* serotipo *Copenhageni*.

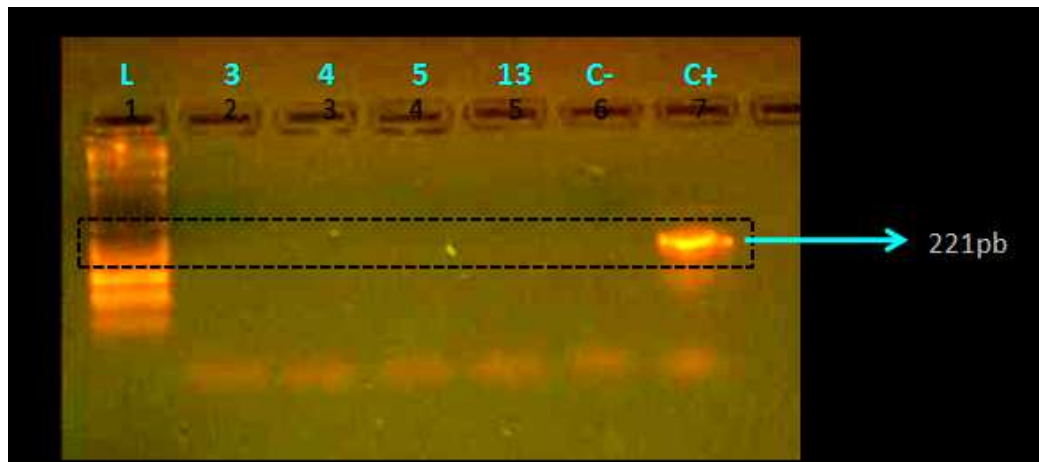


Figura 17: Resultados de amplificación con segundo set de cebadores G1-G2 de las 5 muestras de tejidos positivos con CD. L: marcador de peso molecular de 1kb

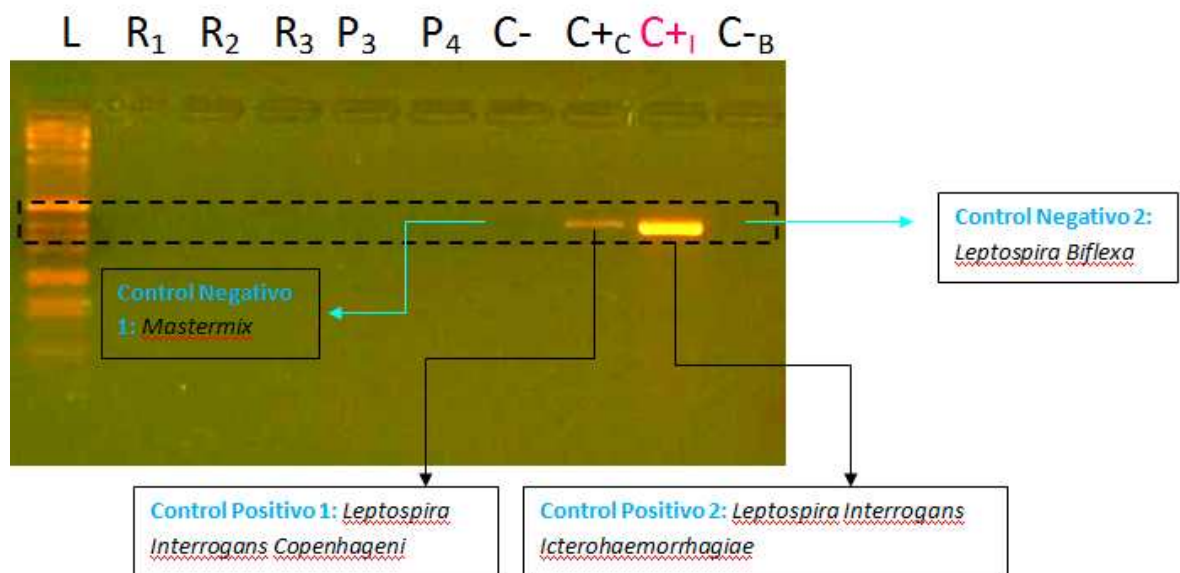


Figura 18: Resultados de la amplificación con el tercer set de cebadores: Lip32 F-R.

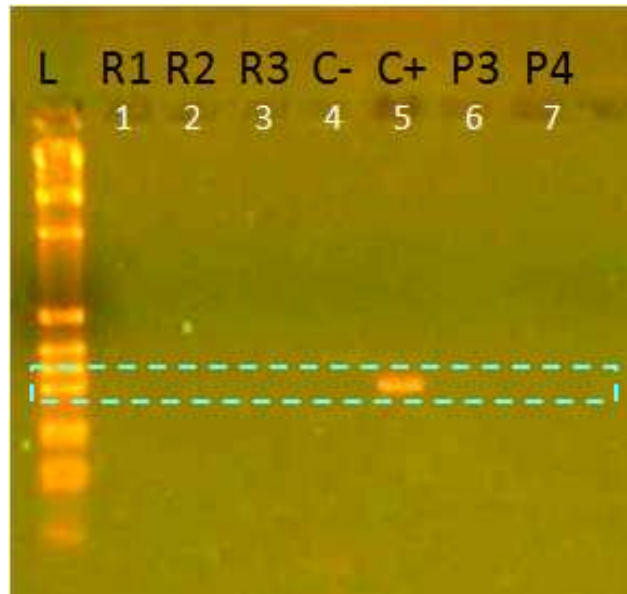


Figura 19: Amplificación de 5 muestras de tarjetas FTA con cebadores de actina. L: marcador de peso molecular 1kb. C-: Master mix, C+: ADN de riñón. 3, 4, 5, 6,13: muestras de tarjetas FTA.

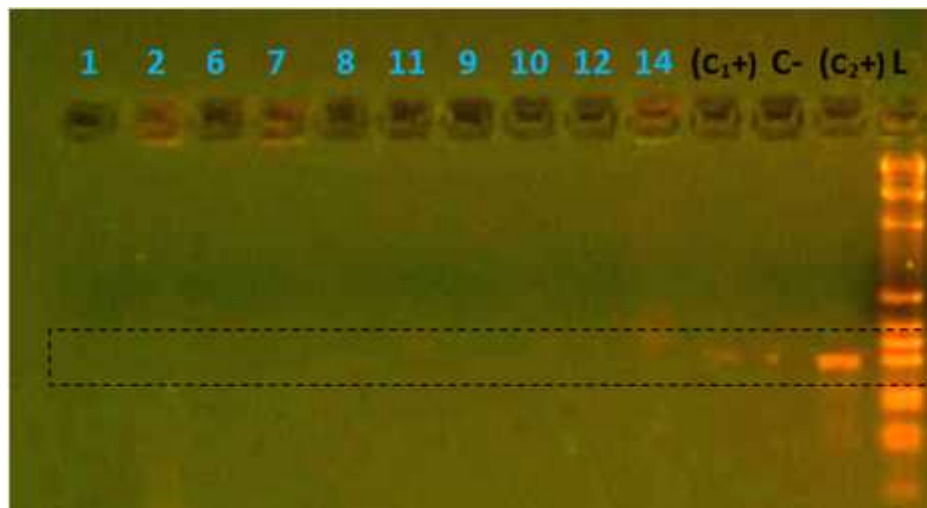


Figura 20: Gel de agarosa. Muestras de tarjetas FTA amplificadas con cebadores de actina. C+1: Muestras de sangre colocada un día antes en una tarjeta FTA. C+2: Muestra de ADN de placenta.

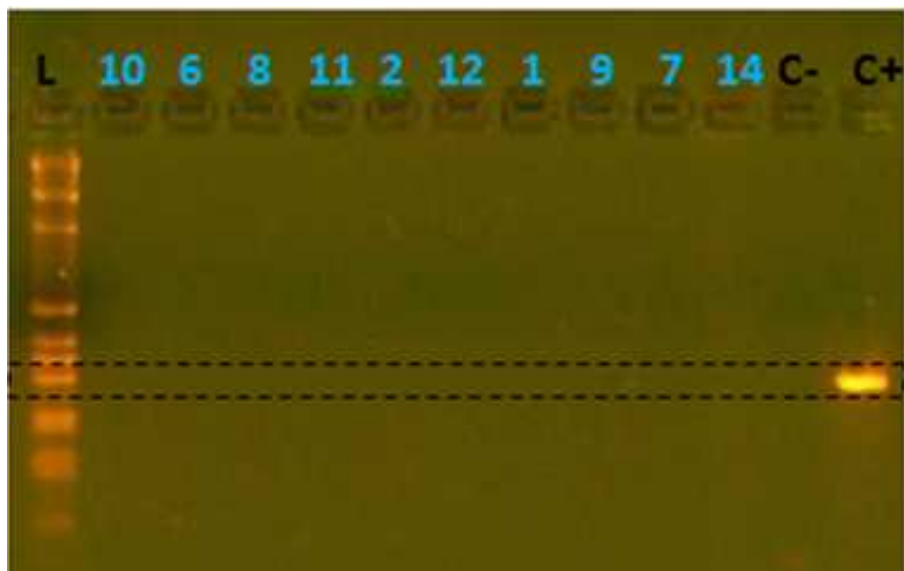


Figura 21: Gel de agarosa. Muestra de tarjetas FTA amplificadas con cebadores CD. C+: ADN de *Leptospira interrogans* serovar Icterohemorrhagiae

10.2 Tablas:

No.	Código	Fecha de recolección	Lugar	Individuo	¹ Método de extracción	² Resultado
1	OR1	17/08/10	Playa de los marinos	Hembra adulta	CTAB	Negativo
2	OR2	20/08/10	Playa Mann	Hembra	CTAB	Positivo/ Negativo
3	OR3	24/08/10	Playa de los marinos	Hembra sub adulta	CTAB	Negativo
4	①	10/09/10	Playa Mann	NS	CTAB	Negativo
5	②	9/09/10	Playa de los marinos	NS	CTAB	Negativo
6	PM 16	16/09/10	Playa Mann	NS	CTAB	Negativo
7	PM17	16/09/2010	Playa Mann	NS	CTAB	Negativo
8	PO1	12/09/10	Playa de Oro	NS	CTAB	Negativo
9	PM 18	9/09/10	Playa de los marinos	NS	CTAB	Negativo
10	PM19	16/09/10	Playa Mann	NS	CTAB	Negativo
11	PM20	16/09/10	Playa Mann	NS	CTAB	Negativo
12	PM21	16/09/10	Playa Mann	NS	CTAB	Negativo
13	PM22	16/09/10	Playa Mann	NS	CTAB	Negativo
14	PM23	9/09/10	Playa de los marinos	NS	CTAB	Negativo
15	PM24	15/10/10	Playa Mann	NS	CTAB	Negativo
16	PM25	18/10/10	Playa Mann	Hembra adulta	CTAB	Negativo
17	PM26	27/10/10	Playa Mann	NS	CTAB	Negativo
18	PM27	27/10/10	Playa Mann	Hembra adulta	CTAB	Negativo

Tabla 1: Descripción de las muestras de orina en arena. ¹ Método de extracción empleado para analizar cada muestra. ² Resultado obtenido por PCR con cebadores CD.

No.	Código	Leyenda	Fecha	Lugar	Individuo	¹ Método de extracción	² Resultado
1	R1	Riñón necropsia	20/08/10	Playa de los marinos	Juvenil Hembra	CTAB / kit ROCHE	Positivo
2	R2	Riñón necropsia	21/08/10	Playa de los marinos	Cachorro	CTAB / kit ROCHE	Positivo
3	R3	Riñón necropsia	02/09/10	Malecón - Playa de Oro	Juvenil Macho	CTAB / kit ROCHE	Positivo
4	P1	Placenta aborto	21/08/10	Playa de los marinos	Cachorro	CTAB / kit ROCHE	Negativo
5	P2	Placenta	04/11/10	Playa de los marinos	Cachorro nacido vivo	CTAB / kit ROCHE	Positivo
6	P3	Placenta	04/11/10	Playa de los marinos	Cachorro nacido vivo	CTAB / kit ROCHE	Positivo
7	P4	Placenta	NS	Playa de los marinos	Cachorro nacido vivo	CTAB / kit ROCHE	Negativo

Tabla 2: Descripción de las muestras de tejido renal y placentario. ¹ Método de extracción empleado para analizar cada muestra. ² Resultado obtenido por PCR con cebadores CD.

No.	Código	Muestra	Método de extracción	Resultado
1	Playa Mann	Orina en arena	Kit de Whatman	Negativo
2	OR2	Orina en arena	Kit de Whatman	Negativo
3	PM16	Orina en arena	Kit de Whatman	Negativo
4	PM17	Orina en arena	Kit de Whatman	Negativo
5	OR4	Orina en arena	Kit de Whatman	Negativo
6	①	Orina en arena	Kit de Whatman	Negativo
7	PM20	Orina en arena	Kit de Whatman	Negativo
8	PM19	Orina en arena	Kit de Whatman	Negativo
9	OR1	Orina en arena	Kit de Whatman	Negativo
10	Playa de los marinos	Orina en arena	Kit de Whatman	Negativo
11	PM18	Orina en arena	Kit de Whatman	Negativo
12	PO1	Orina en arena	Kit de Whatman	Negativo
13	La Poza barrio frío	Orina en arena	Kit de Whatman	Negativo

Tabla 3: Descripción de las muestras de orina recolectadas en las tarjetas FTA. ¹ Método de extracción empleado para analizar cada muestra. ² Resultado por PCR con cebadores de actina.