

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



EXPOSICIÓN A *Leptospira sp.* PATÓGENA DEL ELEFANTE
MARINO, *Mirounga angustirostris*

T E S I S

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

MERCEDES ITZEL SERRANO DE LA VEGA

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. Diciembre DE 2012

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

EXPOSICIÓN A *Leptospira sp.* PATÓGENA DEL ELEFANTE
MARINO, *Mirounga angustirostris*

T E S I S

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

MERCEDES ITZEL SERRANO DE LA VEGA

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. Diciembre DE 2012

Resumen

La *Leptospira spp.* se encuentra diseminada ampliamente por el mundo. A este género de bacterias espiroquetas pertenecen organismos patógenos capaces de hospedarse en mamíferos, siendo los roedores su principal vector. Las espiroquetas se alojan en los riñones y se eliminan algunas bacterias, de forma intermitente, en la orina. El contagio se da mediante el contacto de una herida o piel humedecida con agua o tierra que haya sido contaminada con la orina de organismos enfermos.

Brotos de leptospirosis en mamíferos marinos han ocasionado varamientos masivos por falla renal. La leptospirosis es una importante fuente de mortalidad en lobo marino de California (*Zalophus californianus*) que es el pinnípedo más común en las costas de California y Baja California. De 1995 a 2004 se vararon en California siete focas elefantes del norte (FEN), *M. angustirostris*, que resultaron positivos para *L. interrogans* y *L. kirschneri*.

Dos observaciones sugieren la presencia de la bacteria y/o leptospirosis en FEN en el complejo de Islas San Benito e Isla Cedros. La coincidencia de espacio de descanso durante la temporada de cría y muda de FEN y del lobo marino de California; así como la reciente invasión de ratones, *P. eremicus cedrocencis* desde la Isla Cedros a el complejo de Islas San Benito.

Para verificar la presencia de la bacteria y de la enfermedad en FEN, se tomaron muestras de crías muertas, destetadas y de individuos juveniles de enero de 2010 a marzo de 2011. Se analizaron 46 muestras de suero sanguíneo con pruebas de microaglutinación (MAT). También se analizaron 5 riñones, 111 muestras de sangre y 344 muestras de orina con PCR y se hizo un estudio histológico de tres de los riñones. Para asegurar la estabilidad del ADN de las muestras de orina durante su transporte, se probaron varios métodos de conservación, siendo el más efectivo el RNA later.

Se obtuvo evidencia de exposición a *Leptospira spp* patógenas, en el MAT 16 animales presentaron títulos mayores de 1:100 (tomado como positivo) para una o más serovariedades. Las PCR de muestras de orina dieron 5 bandas específicas, las de muestras de riñón 1 y las de sangre ninguna. La histología muestra daño en los túbulos renales, pero las tinciones específicas para espiroquetas no mostraron evidencia de microorganismos. En las PCR de riñones, de 21 ratones 9 dieron bandas de tamaño específico, así como en muestras de riñón de una hembra de lobo marino de California y de tres crías de FEN.

En conclusión, se encontraron evidencias de la presencia de *Leptospira spp.* en ratones y lobo marino de California así como *Leptospira spp.* patógena en FEN, pero sin evidencia de leptospirosis en esta especie. Para determinar la importancia de la leptospirosis en las poblaciones de pinnípedos de estas islas sería necesario continuar con la investigación, en particular: 1) extender el muestreo de FEN a individuos adultos; 2) aumentar el número de muestras del lobo marino de California; 3) coleccionar muestras del lobo fino de Guadalupe (*Arctocephalus townsendi*), otro pinnípedo presente en el archipiélago.

Aprobada por:

Simona Sanvito

DRA. SIMONA SANVITO
DIRECTORA DE TESIS

Y. Schramm

DRA. YOLANDA SCHRAMM URRUTIA
SINODAL

F. Camarena

DR. FAUSTINO CAMARENA ROSALES
SINODAL

Agradecimientos

Al posgrado Ecología Molecular y Biotecnología, UABC y la beca de maestría No. 42343 con registro 329475, otorgada por CONACYT de 2009 a 2011.

Al comité de posgrado integrado por las sinodales Dra. Karina Acevedo Whitehouse, y Dra. Yolanda Schramm Urrutia y la directora Dra. Simona Sanvito por su apoyo académico y dirección del proyecto de tesis. De la misma manera al Dr. Filippo Galimberti por su asesoría y al laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias.

Asimismo, agradezco a la M.C. Olivia Tapia, la Biol. Deyanira Rodarte Venegas y la M.C. Isabel Montes por el apoyo con la interpretación y el trabajo técnico de las laminillas histológicas analizadas y al Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma por su asesoría y donación de cebadores, así como a sus estudiantes Dr. Carlos Carmona Gasca y M.C. Luz Olivia Castillo Sánchez.

Extiendo mi gratitud a las organizaciones que apoyaron con el financiamiento y la logística del proyecto; a Elephant Seals Research Group, ESRG, a la Sociedad Cooperativa de Pescadores Nacionales de Abulón, SCPP, por facilitarnos una casa en la Isla San Benito Oeste y el transporte entre las islas, así como al

Grupo de Ecología y Conservación de Islas, GECl, por el préstamo de trampas y donación de organismos.

A los M.C.Viola Cardinale y Francesco Cicala por su ayuda en la colección de muestras en el campo y su procesamiento en el laboratorio así como por la compañía que hizo más amenas las jornadas laborales. A todos los amigos que ofrecieron soporte y ánimo durante esta etapa académica Deyanira, Anita, Lucy, Daniela, Nain, Edelyn, Sharon, Luvia, Lina, Ari, Jovano, Mario Hidalgo y Alonso.

*La ciencia es el alma de la prosperidad de las
naciones y la fuente de todo progreso*

Louis Pasteur

Índice

1. INTRODUCCIÓN	7
2. ANTECEDENTES	12
2.1 Enfermedades infecciosas emergentes y animales silvestres	12
2.2 Patógenos en mamíferos marinos	14
2.3 Leptospirosis en pinnípedos	16
2.4 Leptospirosis en foca elefante del norte	20
2.5 Leptospirosis en el archipiélago Cedros-San Benito	21
2.6 Biología de la especie	23
3. OBJETIVO PRINCIPAL	28
3.1 Objetivos Particulares	28
4. HIPÓTESIS	29
5. MATERIALES Y MÉTODOS	30
5.1 Área de estudio	30
5.2 Muestreo	32
5.2.1 Muestras de orina	33
5.2.2 Muestras de sangre	34
5.2.3 Muestras de riñón	35
5.2.4 Muestreo ambiental	37
5.2.5 Conservación de las muestras	37
5.2.6 Evaluación de métodos de conservación	42
5.3 Métodos Moleculares	43
5.3.1 Extracción de ADN de las muestras	43
5.3.2 Limpieza de ADN	44
5.3.3 Extracción de ADN de <i>Leptospira</i> sp.	45
5.3.4 PCR	46
5.3.5 Uso de cebadores de MLST	49
5.3.6 Pruebas para mejorar en tiempo y calidad la amplificación	51
5.3.7 Pruebas de límite de detección de los cebadores más usados	53
5.4 Prueba de microaglutinación	58
5.5 Métodos Histológicos	61
6. RESULTADOS	64
6.1 Prueba de microaglutinación	64
6.2 Métodos moleculares	65
6.2.1 Tratamientos para conservar el ADN en la orina	65
6.2.2 Limpieza de ADN	70
6.2.3 Extracción de ADN de cultivos de <i>Leptospira</i> sp. (controles positivos)	70
6.2.4 Amplificación de ADN de FEN y bacterias	71
6.2.5 PCR con muestras de orina	72
6.2.6 Optimización de las reacciones de PCR (mejoras en tiempo y calidad)	73
6.2.7 PCR límite de detección	78
6.2.8 Comparación de PCR entre métodos de conservación	83

6.2.9	PCR a partir de ADN extraído de riñón	84
6.2.10	PCR a partir de ADN extraído de sangre	85
6.2.11	PCR por triplicado	86
6.3	Resultados histopatológicos	86
6.3.1	Muestra H0022	86
6.3.2	Muestra H0027	88
6.3.3	Muestra H0028	90
7.	DISCUSIÓN	93
7.1	Evidencias de exposición a <i>Leptospira</i> sp. en la foca elefante del norte	93
7.2	Estudio de enfermedades en poblaciones silvestres de pinnípedos	96
7.3	Herramientas moleculares para la detección de leptospirosis de pinnípedos	99
8.	CONCLUSIONES	104
9.	BIBLIOGRAFÍA	106
10.	ANEXOS	113
10.1	Trabajo de campo	113
10.1.1	Marcaje de los animales	113
10.1.2	Muestreo de orina y sangre en <i>Mirunga angustirostris</i>	113
10.1.3	Recolecta de riñón de ratón (<i>Peromyscus eremicus cedrosensis</i>).	119
10.1.4	Preparación de soluciones conservadoras	120
10.2	Laboratorio de Microbiología	124
10.2.1	Preparación de medios de cultivo	124
10.2.2	Microaglutinación	129
10.2.3	Extracción DNA: Tiocianato de guanidina	131
10.2.4	Extracción DNA de cultivo de bacterias: Kit Qiagen®	133
10.3	Laboratorio de Histología	134
10.3.1	Técnica de deshidratación para riñón	134
10.3.2	Técnica de corte y desparafinación	135
10.3.3	Técnicas de tinción Histológica	136

Lista de tablas

Tabla I. Recopilación de los estudios previos realizados a pinnípedos analizados para leptospirosis.....	14
Tabla II. Lista de tratamientos de conservación.....	35
Tabla III. Lista de tratamientos usados para conservar la sangre durante su traslado y claves de etiquetamiento.....	37
Tabla IV. Grupo de serovariedades de <i>Leptospira spp.</i> cultivadas para obtener controles positivos.....	41
Tabla V. Cebadores para amplificar ADN de bacterias en general. La secuencia de cebadores se presentan en dirección 5´-3´.....	42
Tabla VI. Cebadores específicos para <i>Leptospira spp.</i> La secuencia de cebadores se presentan en dirección 5´-3´.....	43
Tabla VII. Cebadores del MLST de Ahmed et al. (2006). Nombres y secuencias de los cebadores así como el tamaño del producto de PCR. La secuencia de cebadores se presenta en dirección 5´-3´.....	45
Tabla VIII. Cebadores del MLST de Thaipadungpanit et al. Nombres y secuencias de los cebadores así como el tamaño del producto de PCR. La secuencia de cebadores se presentan en dirección 5´-3´.....	46
Tabla IX. Análisis estadístico de la concentración de ADN por grupo de conservadores.....	56
Tabla X. Resultados del análisis MAT. Aut: Autumnalis; Bal: Ballum; Bat: Batavie; Bra: Bratislava; Can: Canicola; Cel: Celledoni; Gri: Grippytyphosa; Har: Hardjo; Ict: Icterohaemorrhagiae; Pom: Pomona; Wol: Wolfi; Tar; Tarassovi.....	77

Lista de figuras

Figura 1. Microfotografía electrónica de <i>L.interrogans</i> serovariedad icterohaemorrhagiae (tomado de Levett, 2001)	9
Figura 2. Esquema de transmisión de leptospirosis (tomado de Ko et al., 2009) .	11
Figura 3. Ciclo anual de hembras y machos de FEN	26
Figura 4. Mapa del área de estudio, Islas San Benito e Isla Cedros	31
Figura 5. Mapa de distribución de muestreo en las Islas San Benito..	34
Figura 6. Toma de sangre de un destetado.....	35
Figura 7. Toma de muestra de riñón de lobo marino.....	36
Figura 8. Ubicación de trampas y toma de muestra de riñón de ratón	37
Figura 9. Resultados de pruebas de microaglutinación positiva y negativa	60
Figura 10. Número de individuos con títulos para las diferentes serovariedades.	64
Figura 11. Evaluación visual de bandas.	66
Figura 12. Gráfica esperada de concentración de ADN extraído a partir de muestras de orina	68
Figura 13. Caso I de contaminación y baja concentración de ADN extraído de muestras de orina.	69
Figura 14. Caso II de contaminación y baja concentración de ADN extraído de muestras de orina.	69
Figura 15. Gel de 1% de agarosa ADN extraído de cultivo de <i>Leptospira sp.</i> de tres serovariedades diferentes.....	71
Figura 16. Bandas de ADN de FEN. Se amplificó usando el cebador ZCWC03 ..	71
Figura 17. Bandas de ADN extraído de muestras de orina amplificando para cebadores de A) bacterias en general Gram + y C) Gram -.	72

Figura 18. PCR con ADN de muestras de orina con amplificación del cebador tpi A (554 pb) del MLST de (Thaipadungpanit J et al., 2007).....	73
Figura 19. Gel 1.5% agarosa. Comparación de volumen final en PCR con cebadores G1/2 (285 pb) y B64-I/II (563 pb)..	74
Figura 20. Gel al 1.7% de agarosa corrido por 28 min con uso de albúmina de suero bovino para mejorar la amplificación.....	76
Figura 21. Gel al 1.7% de agarosa corrido por 28 min, con diferentes concentraciones de ADN y con diferentes ciclos de amplificación	78
Figura 22. Bandas de ADN de <i>Leptospira sp</i> en diluciones, amplificando para ADK (531 pb) (MLST de Ahmed et al., 2006).....	79
Figura 23. PCR donde se observa inhibición en las eluciones de muestras de orina inoculadas con ADN de cultivo, en comparación con las bandas intensas de ADN diluido en AE. PCR con secY cebador (549 pb) de MLST de Thaipadungpanit et al., (2007).....	80
Figura 24. Extracción de las muestras de arriba se hizo con el buffer de lisis AVL y la de abajo con ATL.....	81
Figura 25. Gel 1.7% de agarosa cebador ADK (531 pb). Orina filtrada e inoculada con <i>Leptospira sp.</i> diluidas de 10^0 a 10^7 y tres métodos de extracción diferentes.....	82
Figura 26. Amplificación de bandas inespecíficas para una muestra de orina conservada de tres formas diversas (I: RLS ;IB: RLS con β -mercaptoetanol y QB:GLS2 con β -mercaptoetanol). Cebadores usados G1/2.....	83
Figura 27. Gel 1.7% de agarosa se hizo con el cebador SucA (559 pb). Amplificación de bandas de tamaño del control positivo para seis muestras de riñón de ratón.....	84
Figura 28. Gel 1.7% de agarosa se hizo con el cebador 65ab/DG74. Se observa bandas de tamaño del control positivo para amplificar cualquier tipo de bacterias.....	85
Figura 29. Riñón teñido con H-E (100X). Se observan hemorragias e infiltración leucocitaria en glomérulos.....	87
Figura 30. Riñón teñido con H-E (100X). Espacio perinurinario aumentado y ruptura de la cápsula de Bowman.....	88

- Figura 31.** Tinción Wright (100X). Glomérulo con células infiltradas mononucleadas y sustancia hialina infiltrada en el espacio periurinario. 89
- Figura 32.** Tinción Tricrómica de Gallego (100X). Riñón con luz de túbulo disminuida por el aumento del tamaño de las células que lo conforman, cariorrexis, vacuolas con sustancia hialina que sale a la luz del túbulo desde las células con la membrana celular degradada. 91
- Figura 33.** Tinción Wright (40 X). Necrosis multifocal del epitelio tubular con infiltración hialina intracelular y extracelular..... 92
- Figura 34.** Tinción Wright (100 X). Infiltración hialina y ruptura del tejido del túbulo. 92

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas emergentes son definidas como infecciones que previamente no existían en una población o que ya se encontraban, pero que rápidamente han incrementado su rango geográfico de dispersión o su incidencia (Morse, 1995). Estas enfermedades han demostrado tener correlaciones significativas con factores socio-económicos, ambientales y ecológicos (Jones et al., 2008). Asimismo, se han descrito como agentes de cambio ambiental ya que pueden causar la extinción de alguna especie en peligro de; alteración de las relaciones (por ejemplo depredador, presa). Estos efectos pueden ser amplificados por la fragmentación del medio ambiente y por los cambios climáticos globales (Epstein et al., 2003).

En las zonas costeras las enfermedades emergentes pueden afectar invertebrados, mariscos, peces, aves playeras y mamíferos marinos (Epstein et al., 2003). Algunos de los patógenos que se han identificado en mamíferos marinos son las infecciones protozoarias, como la sarcoidosis y el toxoplasma que afectan principalmente a nutrias, micosis como lobomicosis que afecta a delfines e infecciones bacterianas como morbillivirus, brucelosis y leptospirosis, que afecta la mortalidad de poblaciones de mamíferos en general (Bossart, 2011) y de mamíferos marinos en particular, llegando a provocar episodios de mortalidad masiva.

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica mundialmente diseminada que tiene un gran impacto sobre la salud de hombres, especies de importancia comercial y animal y animales de compañía, en particular en países de desarrollo de la zona tropical (Levett, 2001, Ko et al., 2009, Evangelista, 2010, Adler, 2011, Zuerner et al., 2009). El análisis de focas y lobos marinos varados a lo largo de la costa de California ha demostrado que la exposición a *Leptospira spp.* patógenas es una causa importante de mortalidad en estas especies (Cameron et al., 2008).

Los animales que no desarrollan la enfermedad como tal, pero son transmisores de las bacterias (hospedero de mantenimiento o vector, (Levett, 2001), presentan una etapa muy prolongada de leptospirosis, es decir, eliminan la bacteria por medio de la orina durante mucho tiempo y pueden ser un factor determinante en la difusión de la infección. Por otro lado se encuentran también hospederos incidentales que presentan una fase aguda de la enfermedad y no son un factor importante de transmisión de la infección, como los humanos por todas las serovariedades y el ganado por la serovariedad Pomona (Bolin, 1996).

Ésta enfermedad es ocasionada por una bacteria espiroqueta Gram negativa perteneciente a la familia Leptospiraceae, caracterizada por su forma delgada y en espiral (Fig. 1). Se han clasificado 13 especies patógenas que comprenden más de 260 serovariedades (serovariedad = reacción específica entre las propiedades antigénicas del suero sanguíneo de un animal infectado y el antígeno). Esta

diversidad de serovariedades, existe gracias a las características del lipopolisacárido de la membrana externa de la bacteria (Adler y de la Peña, 2011).

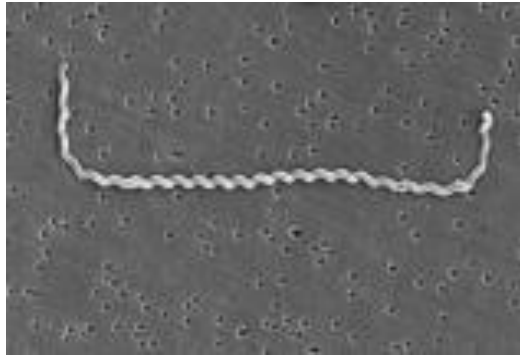


Figura 1. Microfotografía electrónica de *L.interrogans* serovariedad icterohaemorrhagiae (tomado de Levett, 2001)

Se ha observado la asociación de algunas serovariedades a regiones geográficas y a diferentes hospederos de mantenimiento. El mecanismo por el que se da la especificidad entre un animal y una serovariedad se desconoce, pero se tienen documentados los siguientes casos: con ovejas las serovariedades Hardjo y Pomona; con cerdos las serovariedades Pomona, Tarassovi y Bratislava; con vacas las serovariedades Hardjo, Pomona y Grippotyphosa; con perros la serovariedad Canícola; con ratones la serovariedad Ballum; con ratas las serovariedades Ballum e Icterohaemorrhagiae y con lobos marinos y zorros la serovariedad Pomona (Bolin, 1996).

Cualquiera de los hospederos se puede contagiar de forma directa o indirecta. Indirectamente se adquiere al estar en contacto con agua o tierra contami-

nada con orina de organismos enfermos. La bacteria puede sobrevivir por largos periodos de tiempo en condiciones de humedad. Una persona o animal con la piel húmeda, fisurada o con una herida evidente, se puede contagiar de leptospirosis si llega a tener contacto con ese ambiente contaminado (Vijayachari et al., 2008).

El contagio directo se da al exponerse a *Leptospira spp.* de tejidos, orina o cualquier otro fluido corporal de un organismo infectado, o transmisor asintomático (Fig.2). Entre animales puede ser vía sexual, sanguíneo, transplacentario y al amamantarse de un animal enfermo. De animal a humano se da principalmente entre personas que suelen estar en contacto con animales, como granjeros y veterinarios. De humano a humano sólo se ha documentado el contagio a través de la lactancia (Bolin, 1988).

Una vez que la bacteria entra en el organismo, se dispersa en el cuerpo vía sanguínea, llegando a provocar uveítis, daño en el sistema nervioso central, hemorragia pulmonar, isquemia de la corteza renal, necrosis del epitelio tubular, así como lesiones hepáticas que dan lugar a ictericia. En ganado y cerdos se han observado problemas reproductivos como abortos, momificación fetal y agalactia (Adler and de la Peña-Moctezuma, 2010). En mamíferos marinos la leptospirosis muchas veces genera una falla renal que puede llevar a la muerte (Cameron, 2008). Cuando un mamífero marino muere por leptospirosis, su cuerpo se pierde en el mar o se vara en las playas, situación que puede contribuir a la transmisión

de la enfermedad en los animales presentes en las zonas costeras (Zuerner, 2009).

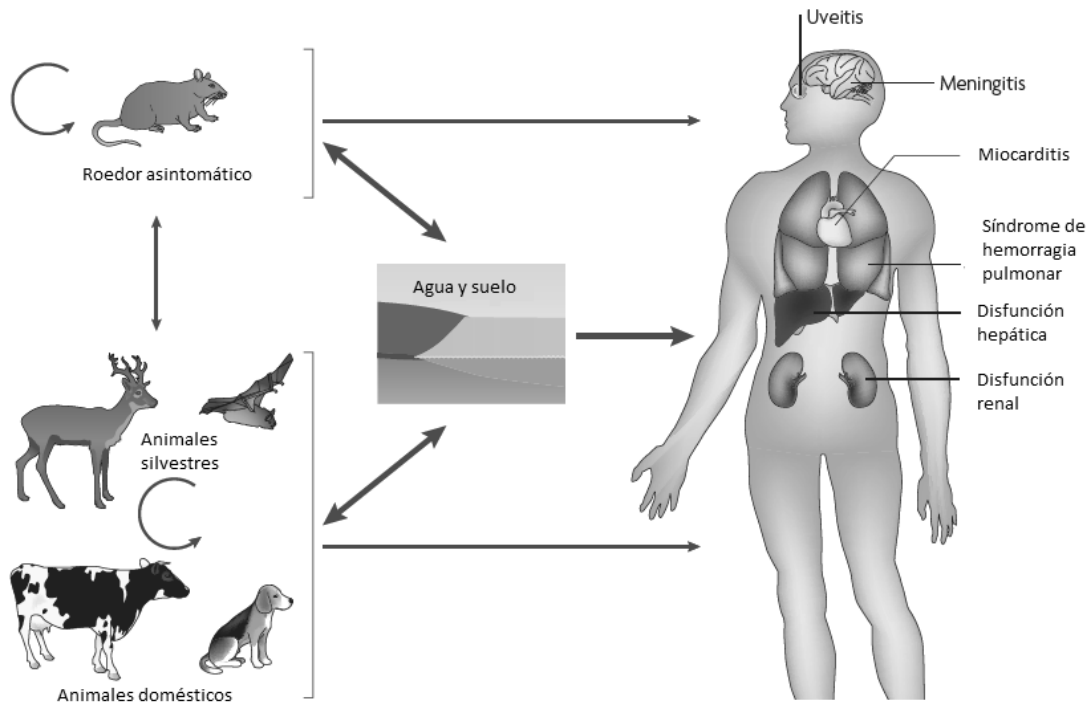


Figura 2. Esquema de transmisión de leptospirosis (tomado de Ko et al., 2009)

En el lobo marino de California la leptospirosis es una enfermedad endémica. En esta especie ocurren varamientos masivos debidos a leptospirosis cada cuatro o cinco años, colocándolo la *Leptospira* spp. patogénicas como primera causa de mortalidad (Lloyd-Smith et al., 2007). Los lobos marinos de California comparten espacios de descanso, cría y muda con otros pinnípedos. En particular, en Baja California hay un importante traslapo de área de distribución con FEN. Dicho vínculo espacial sugiere la posibilidad de contagio entre estas especies.

2. ANTECEDENTES

2.1 Enfermedades infecciosas emergentes y animales silvestres

Las enfermedades infecciosas han tenido un aumento significativo en poblaciones humanas. En una revisión reciente de Jones et al., (2008), de 335 eventos reportados en el *Journal of Infectious Diseases* se encontró una relación significativa con respecto al tiempo. De los reportes analizados, las zoonosis representaban un 60.3% de las que el 71.3% tuvieron un origen en fauna silvestre.

La mayoría de las enfermedades que afectan poblaciones humanas han tenido su origen en la fauna silvestre, tal es el caso del SIDA y del sarampión (Wolfe et al., 2007). Las enfermedades de la fauna silvestre se pueden clasificar en tres categorías: 1) las transmitidas de animales domésticos a silvestres; 2) las asociadas a intervenciones humanas; 3) aquellas en las que no se ven factores humanos o de contacto con animales domésticos (Daszak et al., 2000). El aumento global de las actividades humanas ha generado una invasión del medio ambiente donde se encuentra la fauna silvestre, provocando no sólo su desplazamiento, sino una interacción con animales domésticos que puede derivar en brotes de enfermedades (Williams E. S., 2002, Jones et al., 2008). Es común que estas enfermedades se transmitan entre diferentes especies (Epstein et al., 2003), lo que puede resul-

tar en la desaparición de una población invadida por un patógeno nuevo, o en su transformación en nuevo reservorio de infección (Hayman, 2011).

El riesgo de salud, económico y ambiental de las enfermedades infecciosas de origen animal implica la necesidad urgente de aumentar nuestro entendimiento de ellas. Problema de particular importancia en los mamíferos marinos ya que la gran mayoría de los estudios son desarrollados en animales varados por lo que no son organismos representativos de sus poblaciones naturales. Un progreso muy importante dentro de este tema ha sido el desarrollo de herramientas moleculares que pueden proporcionar información a través de muestreos no invasivos (Thompson et al., 2010), que se pueden aplicar en animales de poblaciones silvestres mejorando la calidad del muestreo y reduciendo los problemas éticos de la investigación.

Un continuo monitoreo de los patógenos en poblaciones de animales silvestres tiene un valor práctico ya que ayuda a encontrar los motivos de la mortalidad y un valor general porque se mejora la comprensión de la dinámica de transmisión de los patógenos (Leendertz et al., 2006). La salud animal es un punto clave para conservar especies y por ende el medio ambiente (Daszak et al., 2000, Lafferty and Gerber, 2002, Leendertz et al., 2006, Smith et al., 2009).

2.2 Patógenos en mamíferos marinos

El estudio de los mamíferos marinos es de especial dificultad por sus características acuáticas, generalmente pelágicas y su tendencia a migrar en largas rutas migratorias (Gulland and Hall, 2007), por lo que se estudian principalmente animales varados o en cautiverio. El análisis sobre las causas de varamiento y la atención a los mamíferos marinos varados, proporcionan información importante sobre las enfermedades infecciosas y el conocimiento práctico necesario para el cuidado de la salud de estos animales en cautiverio, y la evaluación de problemas de salud en el medio silvestre (Gerber et al., 1993).

En el medio natural los mamíferos marinos se enfrentan a varios factores de riesgo para la salud, que interactúan entre ellos, así como a la demografía, su sistema social, y las condiciones generales del medio ambiente. Por ejemplo la contaminación de xenobióticos como los organoclorados, metales pesados e hidrocarburos, pueden generar una inmunosupresión y aumentar la susceptibilidad a enfermedades (Harvell et al., 1999, Van Loveren et al., 2000, Vos et al., 2003).

Los mayores registros de mortalidad se han dado por morbilivirus. En noviembre de 1988 más de 18,000 focas de puerto *Phoca vitulina* y varios cientos de foca gris *Halichoerus grypus* en el Mar del Norte y al sur del Mar Báltico (Heide-Jorgensen et al., 1992, Van Loveren et al., 2000). En 2000 se contabilizaron cerca

de 20,000 decesos de *Phoca caspica* en el Mar Caspio (Kennedy et al., 2002). En cetáceos de 1987 a 1988 se vararon 2,500 delfines *Tursiops truncatus* en el Atlántico (Lipscomb et al., 1994) y 35 más en 1993 en el Golfo de México (Lipscomb et al., 1996).

Otro ejemplo importante de enfermedad en mamíferos marinos es el virus del moquillo de foca, que frecuentemente ataca a la *Phoca groenlandica* a la que se culpa, por su movimiento al puerto, de haber provocado brotes de moquillo en *Mustela vison*. Este virus a su vez se ha encontrado en delfines, *Globicephala me- las*, que se vararon en masa entre 1982 y 1993 y en 400 delfines *Stenella co-reoualba* en el Mediterráneo en 1990 (Heide-Jorgensen et al., 1992).

Una enfermedad que ataca a los mamíferos marinos y puede provocar muertes masivas es la brucelosis, que también daña a animales terrestres y a humanos. Se han registrado casos de animales domésticos contagiados por animales silvestres y de personas contagiadas por tener contacto con animales domésticos y con mamíferos marinos varados (Whatmore et al., 2008, Zheludkov and Tsirelson, 2010). La bacteria ha sido aislada de mamíferos marinos aparentemente no enfermos y de tejidos dañados así como de fetos abortados de organismos como focas, lobos marinos, morsas, delfines, marsopas, ballenas y nutrias (Nymo et al., 2011).

2.3 Leptospirosis en pinnípedos

En varias especies de pinnípedos se han reportado varamientos de animales infectados con *Leptospira spp.* patógenas y se han hecho algunos estudios con el fin de aislar la bacteria en poblaciones silvestres, normalmente tomando muestras de crías, dado que son más fáciles de muestrear. En la Tabla I se resumen los trabajos publicados en donde se ha diagnosticado a diferentes especies de pinnípedos con leptospirosis. En los organismos varados se han reportado síntomas como fiebre, ictericia, falla renal, depresión, anorexia, deshidratación, resistencia a usar las aletas traseras, vómito, temblor en los músculos y letargo (Dierauf et al., 1985, Gulland et al., 1996, Colegrove et al., 2005b, Cameron et al., 2008).

En el mar de Bering se estudiaron crías y adultos muertos de una población silvestre de lobo fino del norte *Callorhinus ursinus* (Smith et al., 1977). Se analizaron muestras de suero sanguíneo con pruebas de microaglutinación (MAT) contra leptospirosis, donde el título más bajo tomado como positivo fue de 1:10 y el más alto fue de 1:640, para la serovariedad Pomona. Se detectó una prevalencia de 7% para hembras, de 15.4% para machos y de 2% para crías de hasta cuatro meses.

El lobo marino de California es uno de los mamíferos marinos más analizados para leptospirosis. En 1970 más de 70 lobos marinos de California varados

murieron en las costas de San Francisco de los que se analizaron: 15 organismos muertos con pruebas histoquímicas y diez enfermos con MAT (Vedros et al., 1971). Hallaron positivos los cortes de riñón contra las serovariedades de Pomona, Grippotiphosa, Icterohaemorrhagiae y Autumnalis y nueve de los diez sueros arrojaron títulos de 1:1,000 a 1:10,000 para las serovariedades Pomona, Canicola, Icterohaemorrhagiae y Autumnalis. En ese mismo episodio de varamiento, McIlhattan et al. (1971) lograron aislar *Leptospira interrogans* serovariedad Pomona de un lobo marino de California que capturaron moribundo a partir de la orina y del riñón.

A lo largo de la costa de California, de 1981 a 1994 se han analizado pinípedos varados, y se observó que el 33% mostraba signos clínicos de leptospirosis (Gulland et al., 1996). En el Golfo de California se analizaron crías de *Zalophus californianus* con MAT y PCR (Acevedo-Whitehouse et al., 2003). Con MAT se hallaron 54% de las muestras de sangre positivas con títulos no mayores a 1:50 principalmente para la serovariedad Cynopteri. Con PCR se observaron 2 positivos en muestras de orina (N=42), una positiva en muestras de suero sanguíneo (N=96) y seis PCR positivos hechos de muestras de sangre completa (N=96).

El contagio de leptospirosis en cautiverio en tres focas de puerto (*Phoca vitulina*) en un centro de recuperación, en el Marine Mammal Center (Stamper et al., 1998). Al inicio de su admisión en el centro de rehabilitación eran seronegativas

para *Leptospira spp.*, pero al observar síntomas de falla renal y analizarlas nuevamente con MAT, presentaron títulos mayores de 1:1600 para *L. interrogans* serovariedad Grippotyphosa. El análisis port-mortem del tejido renal demostró, necrosis tubular y nefritis intersticial, así como la presencia de espiroquetas en el parénquima de uno de los individuos.

En Nueva Zelanda se estudiaron crías del lobo fino, *Arctocephalus forsteri* de la población que se encuentra en la península de Ontago (Mackereth et al., 2005). Se capturaron y recapturaron organismos y se les tomaron muestras de sangre para analizarlas con MAT. Se tomaron como sospechosos de leptospirosis organismos con títulos entre 1:100 y 1:400 y como positivos organismos con títulos de 1:800 a 1:12,800. De 110 focas, ocho presentaron títulos sospechosos y cinco títulos positivos, con las serovariedades Canicola, Hardjo y Pomona.

Tabla I. Recopilación de los estudios previos realizados a pinnípedos analizados para leptospirosis. Ca: California; NA: No aplica; LoCa: Lobo marino de Ca.; LoNZ: Lobo fino de Nueva Zelanda; Grippo: Grippotyphosa

Nombre común	No	Lugar	Población	Etapas	<i>Leptospira sp.</i>	Serovariedad	Referencia
Lobo fino del norte	67 a 139	Alaska	Natural	Mixtos	<i>L.interrogans</i>	Pomona	Smith et al 1977
FEN	3	Ca.	Varada	Crias	<i>L. kirshneri</i>	Grippo.	Stamper et al 1998
FEN	1	Ca.	Varada	Crias	<i>L.interrogans</i>	Bratislava	Stamper et al 1998
FEN	28	Ca.	Varada	Mixtos	<i>L.interrogans</i>	Pomona, Bratislava	Colgrove et al. 2005
FEN	28	Ca.	Varada	Mixtos	<i>L. kirshneri</i>	Grippo.	Colgrove et al. 2005
FEN	1	Ca.	Varada	Adulto	<i>L.kirschneri</i>	NA	Cameron et al. 2008
Foca de puerto	10	Ca.	Varada	Crias	<i>L.kirshneri</i>	Grippo.	Stamper et al 1998
LoCa	24	Ca.	Varada	Crias	<i>L.interrogans</i>	Pomona, Autumnalis	Vedros et al. 1971
LoCa	1	Ca.	Varada	Adulto	<i>L.interrogans</i>	Pomona	Mcllhatan et al. 1971
LoCa	6	Ca.	Varada	Mixtos	<i>L.interrogans</i>	Pomona	Dierauf et al.1985
LoCa	105	Central Ca.	Varada	Mixtos	<i>L.interrogans</i>	Pomona	Gulland et al. 1996
LoCa	10	Ca.	Varada	Añeros	<i>L.interrogans</i>	Pomona, Hardjo	Stamper et al. 1998
LoCa	225	Ca.	Varada	Mixtos	<i>L.interrogans</i>	Pomona	Colagross-Schouten et al. 2002
LoCa	96	Golfo de Ca.	Natural	Crías	<i>L.interrogans</i>	Pomona	Acevedo-Whitehouse et al 2003
LoNZ	11	Nueva Zelanda	Natural	Crías	<i>L.interrogans</i>	Canicola Pomona	Mackereth et al. 2005
LoNZ	8	Nueva Zelanda	Natural	Crías	<i>L.borgpetersenii</i>	Hardjo	Mackereth et al. 2005

2.4 Leptospirosis en foca elefante del norte

Los precedentes señalan que FEN pueden presentar *Leptospira spp.* en su organismo (Stamper et al., 1998, Colegrove et al., 2005b, Cameron et al., 2008). De acuerdo a los primeros FEN que se analizaron para determinar la presencia de leptospirosis, fueron seis elefantes marinos que se vararon en 1995 en California (Colegrove et al., 2005). Se colectaron muestras de tejido para analizarlas con técnicas histológicas y de sangre para hacer microaglutinaciones. Las muestras histológicas presentaron nefritis tubulointersticial, degeneración tubular y necrosis, todos síntomas de daño renal característico en una infección por *Leptospira spp.*. Los análisis de MAT arrojaron resultados positivos para *L. interrogans* serovariedades Pommona, Bratislava y *L. kirschneri* serovariedad Grippytyphosa.

En 1996 se analizaron diez FEN en un centro de rehabilitación después de haber estado en contacto con dos focas de puerto que seroconvirtieron para leptospirosis durante su estancia en el centro (Stamper et al., 1998). Se observaron tres FEN con títulos mayores a 1:3200 para la serovariedad Grippytyphosa y una de ellas con títulos de 1:1,600 para la serovariedad Bratislava.

En 2004 un FES adulto fue atendido en un centro de rehabilitación de California (Cameron et al., 2008). Este animal presentaba signos clínicos de daño renal y el PCR de ADN extraído de una muestra de orina resultó positivo para *L.*

kirschneri. El análisis histoquímico post-mortem del tejido renal fue positivo para *Leptospira spp.* El último reporte de leptospirosis en FEN es de 2005, cuando se analizó histológicamente y con herramientas moleculares, PCR, un organismo varado en las costas de California (Cameron et al., 2008).

Los antecedentes de leptospirosis en FEN aquí mencionados muestran que la especie es susceptible ante la enfermedad. Desafortunadamente, todas las evidencias fueron obtenidas de un número muy pequeño de animales varados, de origen e historial individual desconocido. Además, estos animales, como todos los animales varados, muy probablemente no representan una muestra balanceada de su población, ya que al ser objeto de estudio por el hecho de estar varados nos habla de un sesgo en el muestreo. Por lo tanto es muy importante hacer estudios de leptospirosis en poblaciones silvestres, para conocer la incidencia real e importancia de esta enfermedad sobre la demografía y viabilidad de estas especies en su medio de vida natural.

2.5 Leptospirosis en el archipiélago Cedros-San Benito

La Isla de Cedros y las cercanas Islas San Benitos son un lugar de relevancia para los pinnípedos de Baja California, en estas islas se encuentra la segunda colonia de reproducción de mayor tamaño de FEN, una de lobo marino de California, la única colonia de reproducción de lobo fino de Guadalupe a fuera de Isla de

Guadalupe, y un número importante de focas de puerto. Todas estas especies comparten de mayor o menor forma su hábitat en tierra, con un traslape mayormente marcado entre FEN y el lobo marino de California. Por lo tanto éstas islas son un lugar ideal para estudiar leptospirosis en FEN, e investigar el efecto que tiene el traslape de medio ambiente terrestre con vectores de leptospirosis.

El riesgo de infección podría verse aumentado por la presencia de roedores en estas islas. Recientemente, roedores originarios de Isla de Cedros (*Peromyscus eremicus cedrosensis*) fueron trasladados accidentalmente a las Islas San Benito y su enorme incremento demográfico (GECI, 2009) ha tenido un impacto dramático en otras especies. En general, estas islas tienen un historial de introducción de especies como vacas, burros, cabras, ovejas, perros, gatos, ratas de Noruega y ratones, algunos de los cuales se han convertido en ferales (Mellink, 1993). En la Isla Cedros, se han estudiado casos en donde las especies introducidas no sólo desplazan organismos nativos y sobre-explotan los recursos, sino que también se sabe que pueden ser transmisores de enfermedades o agentes patógenos que antes no se encontraban en ese hábitat (Mack, 2000, Williams, 2002).

Además, hay una intensa actividad de pesca y varios campamientos pesqueros por temporadas, con mucha movilidad de los pescadores que se trasladan continuamente desde el pueblo de Cedros a los campamientos. Todos estos facto-

res generan un potencial de infección cruzada de leptospirosis entre pinnípedos, mamíferos terrestres, y humanos.

La colonia de FEN de estas islas ha disminuido en número, a diferencia de las demás poblaciones de FEN en California (comunicación personal del Dr. Galimberti¹, 2011). La reducción de tamaño poblacional fue muy importante, en particular en las aéreas de alta densidad de FEN. Su causa es actualmente desconocida. Este estado de riesgo demográfico hace el estudio de agentes patógenos más importante y urgente.

2.6 Biología de la especie

La foca elefante del norte tiene pertenece al orden Carnívora, a la familia Phocidae, al género *Mirounga* y especie *M. angustirostris*. La palabra *Mirounga* se deriva de “*miouroung*” nombre aborígen australiano para el elefante marino del sur (*M. leonina*) y el nombre de la especie, del latín “*angus*”, angosto y “*rostrum*”, hocico.

Este género de focas presenta un marcado dimorfismo sexual que se caracteriza por la presencia de una probóscide alargada en los machos, la piel engrosada alrededor del cuello y su gran tamaño (machos: 360-400 cm, 1500-2700 Kg;

¹ Dr. Filippo Galimberti, director de Elephant Seal Research Group (ESRG)

hembras: 240-170 cm, 250-700 Kg). El color de pelo varía entre gris y café, excepto las crías que al nacer son de color negro y después de ser destetados, mudan el pelo quedando de color plateado (Reiter et al., 1978, Le Boeuf and Laws, 1994).

FEN presenta un ciclo vital bifásico ya que se alimenta en el mar durante primavera y otoño y regresa a tierra para mudar (verano) y reproducirse (invierno) (Le Boeuf, 1985). Para alimentarse llegan a viajar desde California y norte de México hasta Alaska, donde se alimentan principalmente de cefalópodos y también de algunos crustáceos, peces teleósteos, cartilagosos, elasmobranquios, ciclóstomos y tunicados (Antonel et al., 1987). La extensa ruta migratoria no sólo los expone a un gran número de factores de riesgo y agentes patógenos, sino patógenos a lo largo de toda ella, si no que también los hace diseminadores potenciales de enfermedades, de la misma manera que *Z. californianus* dispersa *Leptospira* spp. (Zuerner et al., 2009).

Las focas elefante, siempre regresan en la tierra a las playas donde nacieron (Le Boeuf and Laws, 1994), es decir, presentan una alta filopatría. En tierra son altamente gregarios y frecuentemente se observan en contacto con otros pinípedos en sus zonas de descanso, muda y apareamiento. Esta cercanía promueve y facilita el intercambio de patógenos zoonóticos que podrían aumentar el riesgo de infección entre los animales presentes. FEN es un depredador tope y al

exponerse en sus rutas migratorias a patógenos marinos y terrestres puede ser usado como índice de la salud general del ambiente (Bossart, 2011). La ruta migratoria de FEN es muy amplia ya que pueden recorrer hasta 21,000 Km dos veces al año (Feldhamer et al., 2007). Por lo tanto FEN tiene la capacidad de exponer el medio de las islas a parásitos recogidos a lo largo de su ruta de migración, así como a llevar patógenos de las islas a lugares más lejanos.

El periodo de vida en tierra más importante es la temporada de reproducción, que inicia al final de Noviembre y termina al principio de Marzo (Fig. 3). El sistema de apareamiento se basa en harenes, que pueden llegar a un tamaño de más de 450 hembras, con una densidad muy alta de animales, en particular en el área central del harén, que genera un contacto estrecho y continuo entre las crías, las hembras y los machos, y una situación ideal para la transmisión de patógenos.

Una hembra preñada, pare una cría después de 11 meses de gestación, de los cuales ocho fueron pasados en el agua. Cuando la cría nace, la hembra permanece en tierra (en ayuno) en promedio 28 días, tiempo que dura la lactancia (Reiter et al., 1978, Le Boeuf and Laws, 1994).



Figura 3. Ciclo anual de hembras y machos de FEN

Una vez que pasa la etapa de lactancia, las crías son destetadas, salen del harén, y se congregan con otras crías destetadas anteriormente (Le Boeuf and Ortiz, 1977). Cuando una cría evade abandonar el harén suele ser objeto de mordeduras por las hembras (Reiter et al., 1978), por lo que se pueden observar en los harenes y en los conglomerados de destetados crías heridas. También los grupos de destetados pueden ser muy grandes y densos, por lo que las crías se pueden volver un foco de contagio de enfermedades.

En general los machos viven menos años en promedio que las hembras ya que su comportamiento de alta competencia los desgasta energéticamente y los expone a infecciones. Al final de cada pelea los machos muestran heridas sangrantes en el rostro, cuello y dorso. (Deutsch et al., 1990). Estas heridas sangrantes están en contacto no sólo entre machos al combatir, sino también con las hembras al herirlas durante el forcejeo para copular y con las crías lactantes den-

tro del harén, a las que incluso pueden llegar a matar por aplastarlas (Le Boeuf and Mesnick, 1990). La alta frecuencia de heridas superficiales de machos, hembras y crías puede ser otro factor importante en la difusión de agentes patógenos.

3. OBJETIVO PRINCIPAL

Detectar la presencia de *Leptospira sp.* en la foca elefante del norte que habita en las Islas San Benito y Cedros, Baja California, así como otros pinnípedos y mamíferos terrestres que se encuentren en el área de estudio (*Z. californianus* y *P. eremicus cedrosensis*).

3.1 Objetivos Particulares

1. Desarrollar un método de conservación, extracción y cuantificación de ADN de *Leptospira spp.* en orina, sangre y riñones, que sea eficaz para muestras colectadas en el campo y con métodos no invasivos.
2. Identificar animales expuestos a *Leptospira spp.* por medio de pruebas de microaglutinación (MAT) en muestras de suero sanguíneo de FEN.
3. Identificar la presencia de ADN de *Leptospira sp.* en muestras de FEN por el método molecular de PCR.
4. Comparar resultados de PCR y de MAT del suero sanguíneo de *M. angustirostris*.
5. Determinar las serovariedades de *Leptospira sp.* que predominan en las poblaciones analizadas.
6. Determinar la presencia o ausencia de *Leptospira sp.* en vectores potenciales (lobo marino de California y ratones) y en el medio ambiente.

4. HIPÓTESIS

Los elefantes marinos del norte de las Islas San Benito han sido expuestos a *Leptospira spp.* patógenas, por una posible infección cruzada con otros hospederos (lobo marino de California y ratones).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Área de estudio

El trabajo de campo se realizó en las Islas San Benito y en la Isla de Cedros. Las Islas San Benito son un archipiélago de tres islas volcánicas que se encuentran a 30km al noroeste de la Isla de Cedros (28°8'12."N, 115°13'36"O) en el municipio de Ensenada, Baja California. Reciben su nombre de acuerdo a su ubicación, la Isla del Oeste (SBO) (28°18'17"N, 115°34'59"O), Isla del Medio (SBM) (28°18'38"N, 115°34'02"O) e Isla del Este (SBE) (28°18'12"N, 115°32'33"O) (Fig. 4). Presentan un clima árido con lluvias de invierno, la vegetación presente es matorral desértico (www.islas.org.mx/index.php).

La Isla del Oeste es la de mayor tamaño (3.86 km²) y en ésta existe una pequeña población de pescadores de temporada (promedio de 27 pescadores de abulón, cuatro pescadores de langosta, seis vigilantes y un farero). La pesca se hace por temporadas, del 1 de diciembre al 30 de junio extraen abulón y langosta del 16 de septiembre al 15 de febrero. Cuando estas temporadas coinciden con vacaciones escolares, los trabajadores suelen llevar a sus familias, situación que hace bastante irregular el tamaño de la población local. Las Islas SBM y SBE están deshabitadas (<http://www.cedmex.com.mx/>). Otro movimiento de personas en esta isla se presenta gracias al turismo esporádico y la explotación de algas (AGARMEX).



Figura 4. Mapa del área de estudio, Islas San Benito e Isla Cedros

La Isla de Cedros (28° 8'12"N, 115°13'36"O) es la isla de mayor tamaño del Pacífico norte mexicano con 348.30 km² (<http://www.inegi.org.mx>). Presenta una vegetación de matorral costero, chaparral, bosque de pinos, arbustos de junípero y matorral de dunas (Rzedowski, 1978). Está poblada por 1339 personas de acuerdo al censo de 2010 hecho por INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía; <http://www3.inegi.org.mx>), aunque también presenta una fuerte variación de acuerdo a las actividades pesqueras.

5.2 Muestreo

De enero a abril de 2010 se muestrearon 224 crías de FEN destetadas, de las cuales se obtuvo 836 alícuotas de orina y 104 muestras de sangre (Anexo 10.1.2). De tres elefantes marino de un año y dos de dos años sólo se tomó muestra de orina. También se tomaron: 1) muestras de charcos de orina de 26 lobos marinos de California; 2) gotas de sangre de siete lobos marino de California; 3) cinco muestras de pozas de agua cercanas a elefantes marinos. Se extrajo una porción de riñón de tres crías de FEN muertas, encontradas el mismo día de su deceso, de un lobo marino de California que presentaba rigor mortis y de 18 ratones capturados y sacrificados (Anexo 10.1.3).

De enero a abril de 2011 se muestrearon 61 destetados de FEN, se obtuvieron 132 alícuotas de orina, 38 muestras de sangre y una muestra de riñón de una cría muerta.

Todas las muestras de orina recolectadas en 2010 se analizaron con PCR para identificar el mejor método de conservación y para detectar *Leptospira spp.*; las alícuotas de 2011 sólo se analizaron para detectar *Leptospira spp.* De las muestras de sangre recolectadas en 2010, 96 de FEN y siete de lobo marino de California, se analizaron con PCR para detectar *Leptospira spp.* Las 46 muestras restantes de FEN se analizaron con MAT. Los 22 fragmentos de riñón se estudiaron con PCR para detectar *Leptospira spp.* Con las muestras de las tres crías de elefantes se hicieron cortes histológicos para observar daños en el tejido.

5.2.1 Muestras de orina

Las muestras de orina son en las que se invirtió más esfuerzo de recolección, en vista de su naturaleza no invasiva y por la facilidad para tomarlas (Holland et al., 2005), en comparación con las muestras de sangre y de tejido renal. FEN se muestreó en todas las playas accesibles del complejo insular aunque el mayor esfuerzo de muestreo se hizo en la Isla SBO, en las playas más cercana al campamento pesquero (Fig.5). En esas playas se encuentra la concentración más grande de elefantes en la isla.

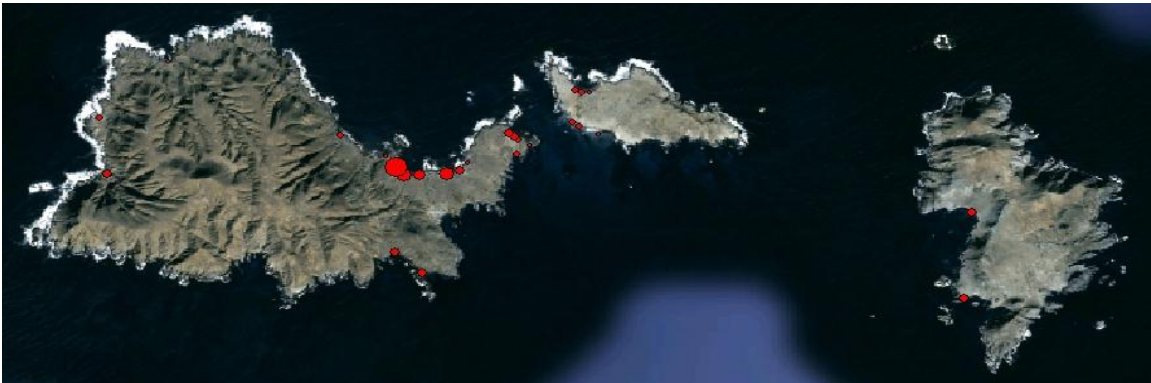


Figura 5. Mapa de distribución de muestreo en las Islas San Benito. Con marcas rojas se indican las zonas de muestreo de orina, el tamaño de la marca indica el esfuerzo, a mayor tamaño del círculo rojo, mayor esfuerzo de muestreo.

A las crías destetadas de FEN se les sujetó con el dorso hacia el suelo y se les dio un masaje en el vientre para provocar que orinaran y con un vaso plástico desechable (marca First Street, 2 oz.) se recolectó del orificio uretral. Las muestras de orina de *Zalophus californianus* se tomaron de pequeñas gotas que quedaban en las rocas al momento de que los lobos se desplazaban ante nuestra presencia y de pozas en las loberas.

5.2.2 Muestras de sangre

Las muestras de sangre de FEN se tomaron en Vacutainers™ de calibre 20 con agujas de 1.5 pulgadas (Dierauf, 1994, Sanvito et al., 2004), sin anticoagulante para el MAT (tapón rojo) y con anticoagulante (K₂EDTA, tapón morado) para hacer PCR (Ver anexo 10.1.2). La punción se hizo antes de la base de la aleta entre el dedo pulgar e índice (Fig.6).

Entre las muestras para el MAT recolectadas en marzo de 2011 se recapturó dos veces al mismo destetado con una semana de diferencia en la captura y esa muestra doble se usó como referencia para observar cambios en los títulos del MAT.



Figura 6. Toma de sangre de un destetado

Las muestras de sangre de *Z. californianus* se pipetearon de gotas que dejaban los organismos sobre las rocas una vez que se les tomaba una muestra de piel de la aleta caudal (colectada para otro proyecto de investigación).

5.2.3 Muestras de riñón

Las muestras de riñón de FEN se colectaron el mismo día de su muerte. Todos los destetados habían muerto el mismo día que la muestra se tomó. Los cuerpos de las crías se midieron y se abrieron con un bisturí desde el orificio uretral hasta la parte baja del esternón y se hicieron otros cortes transversales en la

piel hacia ambos lados. Con cuidado de no lastimar algún vaso sanguíneo, se apartaron los primeros órganos para así llegar a los riñones y extraerlos (Dierauf, 1994). Se cortaron por la mitad y se tomó un trozo del centro.

También se muestreó el riñón de una hembra de lobo marino hallada muerta durante julio de 2010 en la Isla SBO. El cadáver presentaba rigor mortis, carecía de glóbulos oculares, no tenía signo alguno de daño externo como mordidas o marcas de red. Se le extrajeron ambos riñones, se abrieron longitudinalmente y se tomaron fragmentos de la parte superior, media e inferior de cada riñón (Fig.7).



Figura 7. Toma de muestra de riñón de lobo marino. Izquierda: hembra de lobo marino de California adulta muerta en una playa de SBO. Derecha: riñón abierto longitudinalmente con cortes transversales recolectados para hacer PCR.

En el periodo del 22 de marzo al 5 de abril de 2010, se hizo la recolecta de siete organismos de *P. eremicus cedrosensis* que se capturaron en trampas Sherman (Ver anexo 10.1.3). Del 5 al 12 de julio del mismo año se colectaron 11 ratones. Las trampas se colocaron entre arbustos ó rocas cerca de las playas ocupadas por harenes de foca elefante (Fig.8).



Figura 8. Ubicación de trampas y toma de muestra de riñón de ratón. Izquierda: la flecha señala una trampa Sherman escondida en un matorral cercano a una playa en SBO. Derecha: ratón disectado para extraer sus riñones. La flecha señala el riñón izquierdo.

5.2.4 Muestreo ambiental

De las pozas en donde descansaban algunos FEN o lobos marinos se tomaron muestras en tubos Falcon ó en tubos de 5 mL con la ayuda de una pipeta de plástico. De todas las pozas se tomó la localización con GPS, el pH y la temperatura (Ganoza et al., 2006).

5.2.5 Conservación de las muestras

Muchos factores pueden afectar la conservación de muestras colectadas en el campo. Algunos de ellos son tipo de muestra, momento de recolección, contenedores, conservadores, tiempo y forma de transporte pueden afectar la viabilidad del material (Holland et al., 2003, De Paoli, 2005).

Inmediatamente después de la colecta de la orina, se prepararon alícuotas que fueron tratadas con 37 diferentes protocolos de preservación (Tabla II). Para evitar la degradación del ADN en la orina, se probaron: congelamiento, EDTA, etanol, glicerina, RNA later® y soluciones a base de guanidina (Leendertz et al., 2006, Elliott and Peakman, 2008).

Los tratamientos para conservar las muestras de orina se dividieron en dos grupos: 1) tratamientos con muestra de orina concentrada mediante centrifugación y 2) orina mezclada con una solución protectora del ADN sin centrifugación previa. Durante la recolecta se llenaron los tubos estériles de 15 mL con orina, para los tratamientos 1). Los tratamientos 2) solo se mezclaron con la orina usando una pipeta de plástico inmediatamente después de haber recolectado la orina en el campo en tubos Falcon de 15 mL que contenían la solución conservadora. Todas las muestras de orina se transportaron en una hielera que contenía bolsas de gel congeladas para mantener la temperatura menor a 15° C (Ver Anexo 10.1.2).

Tabla II. Lista de tratamientos usados para conservar la orina. * :Pastilla hecha en campo centrifugando 10 min a 6500rpm.; EDTA: ácido etilendiaminotetraacético; RLS: sol. de lisis para RNA; GHE: hidrocloreuro de guanidina; GLS: sol. lisis de guanidina; βME: betamercaptoetanol; PBS: sol. amortiguadora de fosfatos; Norgen: preservativo comercial de muestras de orina (www.norgenbiotek.com). Los preservantes marcados como caseros se prepararon en el laboratorio F.C., UABC.

Clave	Preservante	Principio activo	Tratamiento	Tipo
A8	PB comercial	Guanidina-HCl	8mL orina+8mL PBcomercial	Orina
A	PB comercial	Guanidina-HCl	4mL orina+4mL PBcomercial	Orina
B	EDTA	EDTA	2.5mL orina+2.5mL EDTA	Orina
C	Congelamiento	Frío		Orina

D	RNAlater comercial	Sulfato de amonio	Pastilla*+2mL RNAlater	Pastilla
E	GHE1	Guanidina-HCl	Pastilla*+2mL GHE1	Pastilla
F	Comercial	NORGEN	NORGEN	Orina
G	Etanol	Etanol	3mL orina+3mL etanol	Orina
H	RLS	Guanidina-tiocianato	4mL orina+4mL RLS	Orina
HB	RLS+βME	Guanidina-tiocianato	4mL orina+4mL RLS+βME	Orina
I	RLS	Guanidina-tiocianato	Pastilla*+2mL RLS	Pastilla
IB	RLS+βME	Guanidina-tiocianato	Pastilla*+2mL RLS+βME	Pastilla
J	GLS1	Guanidina-tiocianato	Pastilla*+2mL GLS1	Pastilla
JB	GLS1+βME	Guanidina-tiocianato	Pastilla*+2mL GLS1+βME	Pastilla
JJ	GLS1	Guanidina-tiocianato	4mL orina+4mL GLS1	Orina
JJB	GLS1+βME	Guanidina-tiocianato	4mL orina+4mL GLS1+βME	Orina
L	PBS	PBS	2.5mL orina+2.5mL PBS	Orina
M	Glicerol	Glicerol	2.5mL orina+2.5mL Glicerol	Orina
N	GHE1	Guanidina-HCl	4mL orina+4mL GHE1	Orina
P	GHE1	Guanidina-HCl	Pastilla*+2mL GHE1	Pastilla
Q	GLS2	Guanidina-tiocianato	Pastilla*+2mL GLS2	Pastilla
QB	GLS2+βME	Guanidina-tiocianato	Pastilla*+2mL GLS2+βME	Pastilla
QQ	GLS2	Guanidina-tiocianato	4mL orina+4mL GLS2	Orina
QQB	GLS2+βME	Guanidina-tiocianato	4mL orina+4mL GLS2+βME	Orina
R	RNAlater comercial	Sulfato de amonio	4mL orina+8mL RNAlater	Orina
S	RNAlater casero	Sulfato de amonio	Pastilla*+2mL RNAlater ca-	Pastilla
T	RNAlater casero	Sulfato de amonio	4mL orina+8mL RNAlater	Orina
U	PB comercial	Guanidina-HCl	Pastilla*+2mL PB comercial	Pastilla
V	PB casero	Guanidina-HCl	Pastilla*+2mL PB casero	Pastilla
W8	PB casero	Guanidina-HCl	4mL orina+8mL PB cas	Orina
W	PB casero	Guanidina-HCl	4mL orina+4mL PB cas	Orina
X	GHE2	Guanidina-HCl	Pastilla*+2mL GHE2	Pastilla
XX	GHE2	Guanidina-HCl	4mL orina+4mL GHE2	Orina
Y	Filtro ZYMO original	Guanidina tiocianato	15mL orina+1mL lisis	Orina
YY	Filtro ZYMO genérico	Guanidina-tiocianato	15mL orina+1mL lisis	Orina
Z	GHE3	Guanidina-HCl	Pastilla*+2mL GHE3	Pastilla
ZZ	GHE3	Guanidina-HCl	4mL orina+4mL GHE3	Orina

Las soluciones de PB y RLS, se compraron líquidas, pero el PBS y el EDTA se prepararon diluyendo el reactivo comercial en agua destilada con una concentración de 1X para el PBS y de 40mM para el EDTA. El conservador GHE está compuesto por guanidina-HCl y EDTA, la diferencia entre GHE1, GHE2 y GHE3 radica en la concentración de guanidina, siendo mayor en el GHE3 que en el GHE1. El GLS es una solución de lisis que se basa también en la guanidina, las diferencias entre GLS1 y GLS2 residen en una concentración diferente entre EDTA y el Tris-HCl, así como la presencia de otros reactivos en menor cantidad. El RNAlater se preparó usando EDTA, citrato de sodio y amonio (Anexo 10.1.4). A los conservadores GLS y RLS se les agregó 1% de β -mercaptoetanol para hacer una nueva solución conservadora, el β -mercaptoetanol se usa por ser un buen agente reductor.

El glicerol se usó al 30% el etanol al 80% .Los filtros Zymo consistieron en un sistema de jeringa, filtro y solución de lisis, en el que la orina se inyectó por el filtro para atrapar cualquier tipo de célula en él y posteriormente se hizo pasar la solución de lisis para recuperar el ADN de la muestra. De esa manera evitamos con cargar en el campo toda la muestra líquida, ahorrando espacio en las hieleras y esfuerzo al transportar.

Las muestras de riñón tanto de pinnípedos como de ratones, se guardaron en tubos con rosca, de 5 mL para los pinnípedos y de 2 mL para los ratones, a

los que se les agregó alcohol 95%, (Ver anexo 10.1.3). Estos se etiquetaron y se cargaron en la hielera con bolsas de gel congelado hasta llegar al campamento donde se guardaron en refrigeración (Dierauf, 1994, Leendertz et al., 2006).

La sangre sin EDTA se guardó en el campo a temperatura ambiente (aproximadamente 15 y 20° C) y se transportó en posición vertical para promover la coagulación y por lo tanto separación del suero. Al llegar al campamento las muestras se centrifugaron 10min a 6500rpm y se separó el suero que se conservó de dos maneras: 1) se guardó en tubos de 2mL con rosca y se congelaron y 2) se guardó 0.5mL para conservarlo con 1.2mL de RNAlater (Tabla III). De las muestras sin anticoagulante también se guardó una fracción del coágulo en tubos con rosca. Las muestras tomadas de las rocas se agregaban a tubos con rosca de 2 mL que ya contenían 1mL de RNAlater casero (Ver Anexo 10.1.4).

Tabla III. Lista de tratamientos usados para conservar la sangre sin EDTA durante su traslado y claves de etiquetamiento.

Clave	Preservante	Principio activo	Tratamiento	Tipo
D	Congelamiento	Frío		Suero
E	RNAlater casero	Sulfato de amonio	0.5mL suero+1.2mL RNAlater	Suero
I	Congelamiento	Frío	0.5mL sangre entera+1.2mL RNAlater	Coágulo Sangre entera
X	RNAlater comercial	Sulfato de amonio		

Las muestras de sangre con EDTA se transportaron en una hielera con paquetes de gel frío, estas muestras no necesitan mantenerse en una posición específica por lo que los vacumtainers se colocaron de forma horizontal dentro de una

bolsa de plástico procurando que no tuvieran contacto con los paquetes congelados. Una vez en el campamento se colocaron a -20°C

Durante la estancia en la isla, aproximadamente de dos semanas, todas las muestras se guardaron en un congelador cuya temperatura variaba entre -10 y -20°C ya que el flujo de energía eléctrica no es constante. Las muestras congeladas se transportaron en heleras con paquetes de gel frío. La mayoría de las muestras se llegaron congeladas hasta el laboratorio. En el laboratorio las muestras se colocaron en un congelador con temperatura estable de -20°C .

5.2.6 Evaluación de métodos de conservación

Después de extraer el ADN de todas las muestras se evaluaron los métodos de conservación usados, de dos maneras: A) se cuantificó el ADN de cada una con NanoDrop® 1000 (NanoDrop®, software V3.7.1, <http://www.nanodrop.com/Support.aspx>) y se hizo una prueba T con una corrección Welch para saber cuál es el mejor método de conservación y B) se evaluaron visualmente las bandas en un gel de agarosa al 1.5% calificándolas con un valor de 0 = ADN no visible a 5 = banda de ADN muy buena.

Para evitar sesgar la estimación de la concentración de ADN medida con el Nanodrop®, descartamos para su análisis las muestras que presentaban una concentración mayor a 300 ng/μL.

5.3 Métodos Moleculares

5.3.1 Extracción de ADN de las muestras

La primera centrifugación de las muestras de orina es crucial debido a que la extracción de ADN se realizó con las células precipitadas (botón),. Por lo tanto se probaron dos métodos de centrifugación inicial: 1) muestras de 3.5-12 mL de orina en tubos Falcon a 5500 rpm durante 7 min; 2) muestras de 2 mL de orina en tubos Eppendorf a 14 000 rpm durante 30 min.

Se usaron cuatro paquetes comerciales para la extracción de ADN a partir de orina. Estos fueron: DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen®, No. Catálogo69504, <http://www.qiagen.com>), Norgen® Urine Bacteria Genomic DNA Isolation Kit (Norgen®, No. Catálogo 22400, <http://www.norgenbiotek.com>), FitAmp™ Urine DNA isolation (Epigentek®, No. Catálogo P-1017, <http://www.epigentek.com>) y ZR Urine DNA Isolation Kit™ (Zymo Research®, No. Catálogo D3060, <http://www.zymoresearch.com>) y un método usando el reactivo Gene Releaser®

(BioVentures, No. Catálogo GR-T, <http://www.bioventures.com>). Por medio de la observación de las bandas y la cuantificación del ADN extraído se decidió trabajar la mayoría de las muestras con el kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen).

El kit DNeasy® Blood & Tissue, se probó con dos buffer de lisis diferentes, el ATL y el AVL, (Qiagen). Con este mismo kit, usando el buffer ATL, se extrajo el ADN de las muestras de sangre y de riñón.

5.3.2 Limpieza de ADN

Se utilizaron tres métodos de limpieza, dos productos comerciales específicos para eliminar impurezas en muestras de ADN, y el uso doble de las soluciones de lavado del kit de extracción DNeasy® Blood & Tissue. De los productos de limpieza comerciales, uno era específico para limpiar producto de PCR (GET™ CLEAN DNA, GBiosciences, No. catálogo 786-356, www.gbiosciences.com) y el otro era específico para limpiar muestras de ADN extraído de muestras de orina (Power-Clean DNA®, MO BIO, No. catálogo:12877-50, <http://www.mobio.com>).

Las soluciones de lavado del kit Qiagen® se usaron de cuatro formas diferentes y tomando en cuenta a las dos soluciones distintas de lavado AW1 y AW2, al final se probaron cuatro tratamientos: a) el uso regular que marca el protocolo, un lavado de la columna con AW1 y después un lavado con AW2; b) doble lavado con el buffer AW1 y un lavado con AW2; c) un lavado con AW1 y lavado doble con

AW2 y d) ambos lavados por duplicado. Con el fin de homogenizar las muestras para observar diferencias en los tratamientos, se hicieron 16 alícuotas de 14.9 mL en tubos Falcon a partir de orina filtrada y homogenizada previamente, a cada tubo se agregó 0.1 mL de cultivo de *Leptospira sp.* y posteriormente se llevó a cabo la extracción general, al momento de hacer los lavados se aplicaron los tratamientos descritos previamente.

Se analizaron las bandas de las extracciones en geles de agarosa al 1.5% y las medidas del Nanodrop® tanto de concentración de ADN como de otros picos indicadores de contaminación.

5.3.3 Extracción de ADN de *Leptospira sp.*

De un cultivo de las bacterias en medio EMJH (Ver Anexo 10.2.1) se extrajo el ADN con kit DNeasy® Blood & Tissue de las siguientes serovariedades: Bratislava, Grippothiphosa, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Hardjoprajitno, Ballum mus 127, Celledoni y CAL 7 (Tabla IV).

Tabla IV. Grupo de serovariedades de *Leptospira sp.* cultivadas para obtener los controles positivos. Se presentan los serogrupos, serovariedades y organismos en los que se ha reportado su aislamiento. (Bharti et al., 2003, Foronda et al., 2011, Levett, 2001)

Especie	Serogrupo	Serovariedad	Hospedero
<i>L. interrogans</i>	Australis	Bratislava	LoCa., NES
<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	NES, LoCa.
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	LoCa.

<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	LoCa., ratones
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Ganado, LoCa.
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjoprajitno	Ganado
<i>L. burgpetersenii</i>	Ballum	Ballum Mus 127	Ratones
<i>L. burgpetersenii</i>	Celledoni	Celledoni	Humanos
<i>L. santarosai</i>	Mini	CAL 7	Perros
<i>L. burgpetersenii</i>	Panamá	CZ2214K	Ratones
<i>L. interrogans</i>	Tarassovi	Tarassovi	Ganado, cerdos

LoCa.= Lobo marino de California,

Las serovariedades se eligieron de acuerdo a lo que se ha encontrado en la foca elefante, en el lobo marino de California, (Colegrove et al., 2005a, Cameron et al., 2008). La serovariedad CAL 7 es un aislado que se hizo en el Laboratorio de Diagnóstico y Constatación Bacteriológica, UNAM, a partir de una investigación que se llevó a cabo en México (Carmona–Gasca et al., 2011).

También se usó en las pruebas ADN de las serovariedades *Cynopteri*, *Tarassovi* y CZ2214K del serogrupo Panamá, cuyo ADN ya se encontraba extraído en el Laboratorio de Bacteriología de la Unidad de Servicio de Diagnóstico y Constatación de la FMVZ, UNAM.

5.3.4 PCR

Los primeros análisis hechos se hicieron con cebadores para amplificar microsatélites de foca elefante con ZCWC03. En el laboratorio ya se tiene estandarizada la reacción para amplificar ADN de FEN así que solo se usaron las mismas

condiciones con Green buffer al 1X, 0.2 mM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl₂, 0.02 U Taq, 0.3 μM de cebador forward y 0.075 μM de cebador reverse con taq y 0.3 μM de dye FAM y 1.1 μL de ADN para tener al final un volumen de 15 μL. Se usó la escalera 50 pb de Invitrogen para todas las electroforesis que se hicieron en esta investigación. Estas PCR se hicieron con el fin de confirmar la presencia de ADN de FEN en las muestras de orina por las células de descamación de la vejiga o del tracto urinario.

Se buscó ADN bacteriano para comprobar polimerización de fragmentos de ADN bacteriano a partir de las muestras de orina (Tabla V). El ADN se amplificó con PCR, inicialmente se usaron cebadores para ADN bacteriano en general, que contiene una posición 20 degenerada con el fin de lograr detectar un mayor número de bacterias (Klausegger et al., 1999).

Para destruir el ADN endógeno bacteriano se expuso cinco minutos a luz UV la mezcla de reactivos para la PCR (agua, magnesio y buffer) sin el ADN extraído, sin cebadores y sin taq polimerasa. Se amplificó usando las condiciones marcadas por Klausegger et al. (1999).

Tabla V. Cebadores para amplificar ADN de bacterias en general. El primero es el reverso para los tres cebadores siguientes degenerados. La secuencia de los cebadores se presentan en dirección 5'-3'.

Nombre	Secuencia	Especies que amplifica
DG74	AGG AGG TGA TCC AAC CGC A	
65ab	AAC TGG AGG AAG GTG GGG AY	Todas las bacterias
143	GAY GAC GTC AAR TCM TCA TGC	Gram positivas
68d	AYG ACG TCA AGT CMT CAT GG	Gram negativas

Posteriormente se usaron cebadores específicos para *Leptospira sp.* (Tabla VI). Con este método molecular se pueden identificar fragmentos específicos de ADN de *Leptospira sp.* patógena (Cameron et al., 2008). Para el par de cebadores B64-I/II y G1/2 se optimizó su uso en el Geen buffer al 1X (Quiagen) 2 mM de Cl₂Mg, 0.2 mM de dNTP's (Promega), 0.3 µM de cada cebador (Invitrogen) y 0.02U de Taq polimerasa (Sigma) a 55° C durante cuarenta ciclos de 45 seg de alineamiento (Gravekamp et al., 1993, Zuerner et al., 2009).

Tabla VI. Cebadores específicos para *Leptospira sp.* Se estandarizaron con ADN de cultivo bacteriano. La secuencia de los cebadores se presentan en dirección 5'-3'.

Nombre	Secuencia	pb	Especies
G1	CTG AAT CGC TGT ATA AAA GT	285	<i>Todas menos L. kirshneri</i>
G2	GGA AAA CAA ATG GTC GGA AG		
B64-I	ACT AAC TGA GAA ACT TCT AC	563	<i>L. kirshneri</i>
B64-II	TCC TTA AGT CGA ACC TAT GA		

Las dos PCR anidadas, se llevaron a cabo con las características que se reporta en la literatura. La pareja de cebadores P66 2/3 y los B INT F/R (Bomfim et al., 2008) así como los lipL32_J_F/R y lipL32_J1_F/R (Jouglard et al., 2006). La PCR anidada es un tipo de PCR en el que se aumenta la resolución de una PCR regular usando dos pares de cebadores para el mismo locus, disminuyendo la posibilidad de amplificar locus erróneos.

5.3.5 Uso de cebadores de MLST

El Multilocus Sequencing Typing (MLST) es una técnica que permite la identificación y clasificación genotípica de microorganismos con genotipos altamente relacionados. Para lograr lo anterior, hay que obtener una amplificación y secuenciación de los fragmentos de genes deseados y posteriormente alinearlos con las secuencias ya existentes (Ahmed et al., 2006, Levett, 2007).

En este trabajo se usaron dos grupos de cebadores de MLST, el de seis parejas de cebadores de Ahmed, *et al.* 2006 (tabla VII), y el de siete parejas de cebadores de Thaipadungpanit et al. 2007 (Tabla VIII). Para este trabajo se usaron las condiciones de PCR que cada autor marca para los cebadores.

Tabla VII. Cebadores del MLST de Ahmed et al. (2006). Se muestran los nombres, las secuencias de los iniciadores así como el tamaño del producto de PCR. La secuencia de cebadores se presentan en dirección 5'-3'.

Nombre	Secuencia	Producto (bp)
Adk	GGGCTGGAAAAGGTACACAA ACGCAAGCTCCTTTTGAATC	531
icdA	GGGACGAGATGACCAGGAT TTTTTTGAGATCCGCAGCTTT	674
LipL41	TAGGAAATTGCGCAGCTACA GCATCGAGAGGAATTAACATCA	520
rrs2	CATGCAAGTCAAGCGGAGTA AGTTGAGCCCCGCAGTTTTTC	520
secY	ATGCCGATCATTTTTTGCTTC CCGTCCCTTAATTTTAGACTTCTTC	549
LipL32	ATCTCCGTTGCACTCTTTGC ACCATCATCATCATCGTCCA	474

Tabla VIII. Cebadores del MLST de Thaipadungpanit et al (2007). Se muestran los nombres, las secuencias de los cebadores así como el tamaño del producto de PCR. La secuencia de los cebadores se presentan en dirección 5'-3'.

Nombre	Secuencia	Producto (bp)
pntA	TGCCGATCCTACAACATTA AAGAAGCAAGATCCACAACACTAC	637
sucA	AGAAGAGGCCGGTTATCATCAG CTTCCGGGTGCTCTCCATTTA	559
pfkB	CCGAAGATAAGGGGCATACC CAAGCTAAAACCGTGAGTGATT	559
tpiA	AAGCCGTTTTCTAGCACATTC AGGCGCCTACAAAAGACCAGA	554
mreA	GTAAAAGCGGCCAACCTAACAC ACGATCCCAGACGCAAGTAA	601
glmU	GGAAGGGCACCCGTATGAA TCCCTGAGCGTTTTGATTT	556
fadD	AGTATGCGTATCTTCCTCCTT TTCCCACTGTAATTTCTCCTAA	576

5.3.6 Pruebas para mejorar en tiempo y calidad la amplificación

PCR multiplex

Los dos cebadores más usados encontrados en la literatura se optimizaron bajo las mismas condiciones de temperatura y magnesio, por lo que se intentó hacer una PCR multiplex con ambos cebadores G1/2 y B64 I/II (Cai et al., 2002, Sugathan and Varghese, 2005). Se usó ADN extraído de cultivo de *Leptospira sp.* para hacer las PCR en un gradiente de temperatura de 52° a 58° C. Al mismo tiempo se amplificaron muestras de *L. interrogans* con G1/2 y de *L. kishnerii* con B64 I/II en el mismo gradiente, para comparar las amplificaciones con el gradiente y la PCR multiplex. Para esta prueba se hicieron PCR con un volumen total de 12 μL y 0.8 μL de ADN. Para hacer la PCR multiplex se agregó la mitad de cada cebador al mix y la mitad de ADN de cada especie de *Leptospira sp.* a cada pozo del gradiente.

Variación en el volumen de la reacción

Se compararon dos volúmenes finales de reacción, de 25 y 12 μL , con los cebadores G1/2 y B64 I/II. Las condiciones de amplificación fueron las mismas que se describieron previamente y se usaron 3 μL de ADN de *Leptospira sp.* para la reacción mayor y 1 μL de ADN para la reacción de 12 μL . solo se amplificó una muestra por reacción con su respectivo control negativo y se usaron ambos juegos de cebadores para los dos volúmenes de reacción. Las cuatro amplificaciones con sus controles se corrieron en un gel al 1.5% y se compararon los resultados.

Variación de concentración de ADN

Se buscó el volumen indicado de ADN para evitar un efecto de no amplificación por la poca o mucha cantidad de ADN de *Leptospira sp.*, por la concentración de ADN de FEN o de cualquier otra bacteria en la muestra (Hoelzel, 2002). Se comparó el volumen entre hacer las PCR con 12 y con 25 μ L de ADN en un gel al 1.5% de agarosa.

Otro gel de prueba se hizo con el cebador G1/2 usando magnesio con una concentración de 2 mM y 40 ciclos, en el que se probaron tres concentraciones diferentes, de 4, 8 y 12 μ L de muestra (Kennedy and Oswald, 2011) quedando al final dividido el gel en tres columnas. Cada columna tenía 12 muestras (numeradas del 1 al 12) de izquierda a derecha, las muestras 1, 2, 3, 7, 8, 9 y 10 eran muestras de sangre de FEN conservada con EDTA; las muestras 4, 5, 11 y 12 eran muestras de sangre de FEN conservada con RNAlater casero; la muestra 6 era de riñón de lobo marino de Ca. y las muestras 7', 8', 9' y 10' eran muestras de orina de FEN inoculadas con 100 (7' y 9') y con 1000 (8' y 10') *Leptospira sp.* Las muestras de orina inoculadas número 7' y 8' se extrajeron usando el buffer AVL y las muestras 9' y 10' se extrajeron con el buffer ATL.

Variación de ciclos al termociclar

En el mismo gel anterior dividido por columnas se usó para comparar la variación en el número de ciclos al termociclar, por lo que se repitieron las condicio-

nes descritas anterior mente pero se termocicló por 50 ciclos. Se corrió un solo gel de 80 pozos, arriba se colocaron las muestras termocicladas con 40 ciclos y en la parte inferior las muestras termocicladas con 50 ciclos, ambas flanqueadas por controles positivos y un negativo para cada fila.

Facilitador de PCR (albúmina)

Se usó albúmina bovina como facilitador para aumentar la resolución de las bandas tomando en cuenta la posibilidad de contaminación de las muestras de ADN (Kennedy and Oswald, 2011). . Las pruebas se hicieron con el primer ZCWC03 ya que se observó que más fácilmente amplificaba por la presencia de ADN de foca. Se probaron tres concentraciones diferentes, de albúmina 0.05, 0.1 y 0.2% del volumen total y sin albúmina. Se corrieron al mismo tiempo bajo las mismas condiciones de temperatura, magnesio y concentración de ADN que ya se detallaron con anterioridad.

5.3.7 Pruebas de límite de detección de los cebadores más usados

Diluciones de ADN bacteriano

Las primeras pruebas se hicieron simplemente diluyendo ADN extraído de medio de cultivo EMJH en AE, este ADN diluido se uso para hacer PCR y analizar que cebadores llegaban a amplificar en una dilución mayor. El ADN base usado para diluir se obtuvo a partir de una extracción hecha a 25mL de cultivo con densi-

dad óptica de 0.5 nm. Las diluciones de ADN se hicieron en AE (1:10, 1:40, 1:1600, 1:640, 1:2560, 1:10,240) y se realizaron PCR con G1/2 y B64 i/II. Se agregaron cinco diluciones más (1:40,960, 1:163840, 1:655360, 1:2621440, 1:10485760) para analizar los cebadores del MLST de Ahmed (2006) y para el MLST de Thaipadungpanit (2007) solo se hicieron cuatro diluciones (1:20480, 1:40960, 1:81920, 163840). Las pruebas de PCR se hicieron bajo las condiciones que cada autor menciona para los cebadores y las ya estandarizadas para G1/2 y B64 i/II. Se corrieron las muestras en geles al 2% y se observaron diferencias.

La siguiente prueba de límite de detección también es en base a la dilución de ADN en AE, pero en esta ocasión solamente se usaron cuatro diluciones (1:2560, 1:10,240, 1:20480 y 1:30720). Las mismas diluciones se hicieron por duplicado para cada cebador, pero la réplica se diluyó en una elución de una extracción de ADN de orina filtrada. La dilución en la elución de orina se hizo para corroborar la posible acción de moléculas inhibitoras presentes en las eluciones de las muestras extraídas. Esta prueba se hizo con los cebadores del MLST de Ahmed (2006) y con G1/2.

Variación en la detección según la solución de lisis usada en la extracción

Para saber si se perdía ADN de *Leptospira* durante su extracción se hicieron varias pruebas. Se tomaron dos muestras de orina filtradas en el campo y se dividieron en ocho alícuotas de 900 µL cada una. Se escogieron muestras filtradas

ya que se deseaba observar la respuesta sin posibles inhibidores como lo podían ser los conservadores agregados y para tener pocas células de foca elefante.

Las alícuotas se inocularon con bacterias cultivadas en medio EMJH, aforadas a 1 mL con diluciones de cultivo específicas para que cada alícuota tuviera una concentración final de 5, 25, 50, 100, 1 000, 5 000, 10 000 y 100 000 bacterias (Santamaría et al., 2005, Palaniappana et al., 2005). Se hizo una extracción de ADN para todas las alícuotas, cada set de ocho con dos soluciones de lisis diferentes, AVL y ATL. Después se tomaron medidas de ADN en el NanoDrop y se clasificó la calidad de las bandas amplificadas en pruebas de PCR.

Variación en tamaño de muestra de la extracción y revoluciones al centrifugar

Esta prueba se hizo para saber si el tamaño del tubo en el que se hacía la primera centrifugación de la extracción y si el volumen de la muestra, interferían al hacer la extracción de ADN. Para evitar variación intrínseca entre muestras, se mezclaron ocho muestras de orina filtrada de diferentes focas, se homogenizaron y se dividieron en 16 tubos Eppendorf con 900 μ L de orina cada uno y ocho tubos Falcon de 15 mL con 14.9 mL de muestra cada uno. Se agregaron a cada alícuota 100 μ L de cultivo con diferentes concentraciones de *Leptospira sp*, 10^0 ; 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 y 10^7 (Palaniappana et al., 2005) para cada grupo de ocho tubos. Estas alícuotas fueron extraídas como se indica el protocolo de Qiagen, usando buffer de lisis AVL y emulando la centrifugación que se hace en el campo (Anexo

10.1.2). El método 1) de extracción fue aplicado a los primeros ocho tubos Eppendorf, consiste en centrifugar 30 min a 14,000 rpm como lo marca el protocolo y continuar con el botón; 2) se hace una centrifugación de 15 min a 6,500 rpm (como en el campo) y a continuación se trabaja con el botón como lo marca el protocolo usado (30 min de centrifugación a 14,000 rpm, incubación de 30 min a 56° C con la solución de lisis y los siguientes pasos que marca Qiagen en su protocolo de extracción) y el 3) en donde los tubos Falcon se centrifugaron 15 min a 6,500 rpm antes de continuar con el protocolo que marca Qiagen para la extracción. De cualquier manera después de la primera centrifugación se dejaba aproximadamente 0.5mL sobre el botón, se resuspendía el botón y se continuaba con la extracción.

Con el método anteriormente descrito esperábamos saber si habíamos perdido sensibilidad para analizar las muestras de orina con PCR, debido a el método de extracción de ADN, en particular a la primera centrifugación. El primer método de extracción fue el que se usó en CEIEPAA (FCVZ, UNAM, Querétaro) y los siguientes métodos son los que se usaron en las muestras colectadas durante 2010 para extraer ADN a partir de orina. Entre esos dos últimos métodos se intenta saber si el tamaño de la muestra influyó en la posible pérdida de *Leptospira sp.*, al trasladar desde el campo solamente los botones de algunas muestras colectadas. Se usaron los cebadores de MSLT de Thaipadungpanit et al., (2007), con las condiciones que el autor marca para su uso y el G1/2 con las condiciones antes mencionadas en esta tesis.

5.3.8 PCR con muestras de orina correspondientes a los organismos analizados con MAT

De acuerdo a los datos obtenidos de las pruebas de microaglutinación, se hicieron PCR con G1/2 y B-64 I/II a las correspondientes muestras de ADN extraído de la orina de los animales analizados con MAT. Las condiciones de PCR usadas fueron las ya establecidas en esta tesis para esos cebadores.

5.3.9 Comparación de PCR hechas con muestras extraídas a partir de diferentes métodos de conservación

Una de las variantes que se requería descartar era que el método de conservación representara alguna forma de inhibición para la PCR. Algunas muestras colectadas en el campo eran lo suficientemente grandes como para dividir las en varias submuestras con conservadores diferentes. Se tomaron cuatro de esas muestras de ADN con sus 6 y 7 métodos de conservación diferentes (muestra1: métodos H, HB, I, IB, QQB y U; muestra 2: H, HB, I, IB, J y U; muestra 3: H, HB, I, IB, Q, QB y U; muestra 4: H, HB, I, IB, J, Q, QB) y se termociclaron usando los cebadores G1/2 y B64-I/II con las condiciones de PCR descritas previamente.

5.3.10 Confirmación de las amplificaciones, triplicando las PCR

Para tener resultados certeros y no dudar ante la posible contaminación y la presencia de bandas inespecíficas, se decidió hacer tres veces cada PCR para poder compararlas entre ellas. Las réplicas se hicieron bajo las mismas condiciones de acuerdo a cada cebador y se corrieron en geles todos al 1.7% de albúmina, para equiparar resultados.

5.4 Prueba de microaglutinación

Éste es una de los análisis más utilizados en el diagnóstico de la leptospirosis, por la especificidad para identificar la serovariedad infectante. Sin embargo presenta algunas desventajas como, la necesidad de mantener cultivos de diferentes serovariedades, además que puede dar un falso positivo al reaccionar con anticuerpos de vacunas; así como que la enfermedad es detectable entre cinco y siete días después de la aparición de los síntomas (Bharti et al., 2003, Levett, 2001, Myers, 2008).

Para llevar a cabo esta prueba, se mezcla el cultivo de una serovariedad en varias diluciones de suero sanguíneo y después de incubar, se observa en el microscopio de campo oscuro. Si se ven las bacterias aglutinadas en la superficie, se

infiere la presencia de anticuerpos (Faine, 1982) y se reporta la mayor dilución de anticuerpos en la que se observó la aglutinación.

Para analizar el suero sanguíneo de destetados con el método anterior, las muestras se enviaron al Laboratorio de Diagnóstico y Constatación Bacteriológica de la Universidad Autónoma de México (UNAM), que se encuentra en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Antes de enviarlas, en el laboratorio de la UABC, las muestras de sangre de destetados se centrifugaron 15 min a 14,000 rpm para retirar restos celulares, se pipeteó el sobrenadante a un Eppendorf® ya etiquetado y finalmente se empaquetaron (Ver Anexo 10.1.2).

Las ocho muestras de destetados tomadas en abril de 2010 se analizaron para las serovariedades Autumnalis, Ballum, Batavie, Bratislava, Canicola, Celledoni, Grippytyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes, Tarassovi. Las 38 muestras de marzo de 2011 se enfrentaron a las serovariedades Autumnalis, Batavie, Bratislava, Canicola, Celledoni, Grippytyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Mini, Pomona, Pyrogenes, Tarassovi. Todos los organismos destetados tenían de uno a dos meses de edad. Las serovariedades se escogieron de acuerdo a lo reportado para FEN y vectores que pudieron haber estado en contacto con FEN en la isla, así como las reportadas para México (Vado-Solís et al., 2002, Carmona-Gasca et al., 2011).

Después del viaje de campo y una vez que estaban en la UNAM, el suero de cada organismo se diluyó 1:25 en solución salina y se conservó en un Eppendorf®. Se usaron placas Evergreen® (www.evergreensci.com) de 96 pozos (12x8) de fondo plano. En cada placa, una por organismo, se agregaron 50µL de solución salina en las filas de la B a la H y en toda la fila A 100µL de suero diluido 1:25 de un solo organismo. De la fila A se pipetearon 50µL a la fila B, quedando con una dilución final de 1:50 y de la fila B se pipetea 50µL a la fila C para diluir a 1:100 y así sucesivamente se diluyó la concentración del suero hasta la fila G. La fila H funcionó como control, es decir, sólo se coloca solución salina (Ver Anexo 10.2.2).

A cada columna se agregaron 50 µL de cultivo bacteriano en medio líquido EMJH de una sola serovariedad. De esa manera la fila A quedó con una dilución de 1:50, la B 1:100 la C 1:200 y así sucesivamente para cada serovariedad. Se incubó la placa por al menos 1.5 hrs a 30° C y se observó cada pozo en el microscopio de campo oscuro a 5X para apreciar si se presentaban o no aglutinaciones en la superficie de la solución (Fig. 8).

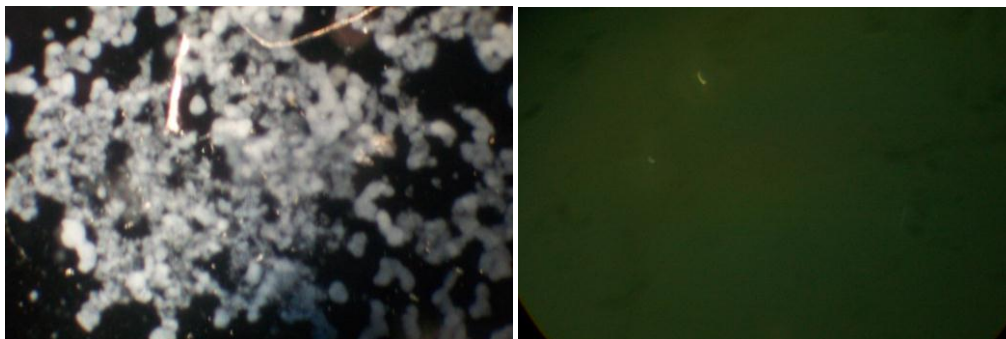


Figura 9. Resultados de pruebas de microaglutinación positiva (Izquierda) y negativa (derecha). Ampliación en 5X en microscopio de campo oscuro.

Aunque se considera como títulos positivos valores desde 1:20 al analizar crías de lobo de California en la época de reproducción de la especie (Godinez et al., 1999, Acevedo-Whitehouse et al., 2003), no existe referente bibliográfico para el análisis de una población de FEN. Por lo tanto se optó por el valor propuesto por la Organización Mundial de la Salud (OMS, (Myers, 2008)) que marca como límite determinante para diagnosticar humanos con leptospirosis títulos iguales o mayores de 1:100.

5.5 Métodos Histológicos

Los métodos Histológicos permiten el estudio microscópico de un tejido para observar deformaciones o daños causados por enfermedades o traumas (Stevens and Lowe, 2001). Tales hallazgos permiten emitir un diagnóstico o determinar una causa de la muerte (Dierauf and Gulland, 2001). Para lograr dicho análisis se necesita una muestra de tejido, que en este caso se limita a los organismos que mueren naturalmente, por lo que sólo se trabajó con muestras de riñón de FEN destetados encontrados el mismo día de su deceso en la Isla.

Se hizo una disección y se extrajo una muestra de cada riñón, que se colocaron en recipientes estériles con alcohol al 95% y se conservaron en refrigeración. Una vez en el laboratorio de histología, las muestras se colocaron en casetes

y se deshidrataron (Ver Anexo 10.3.1) automáticamente en un procesador de tejidos, se incluyó, cortó y desparafinó (Ver Anexo 10.3.2) de acuerdo a lo establecido en el manual para el curso teórico-práctico de Histología de la UABC(2008).

Se aplicaron cuatro técnicas de tinción a los cortes histológicos. Las diferentes técnicas fueron Hematoxilina-Eosina (H-E), Warthing-Starry, Tricrómica de Gallego y Wright. Estas técnicas permiten identificar lesiones, intrusiones o estructuras no correspondientes a un riñón sano.

La coloración de los tejidos tiene por objeto aumentar el contraste entre sus diferentes estructuras. La coloración H-E (Ver Anexo 10.3.3) por ser topográfica, permite realizar el estudio de órganos y tejidos en su totalidad. Intervienen dos colorantes, la hematoxilina que tiñe los núcleos, ribonucleoproteínas citoplásmicas y mielina, así como la hematoxilina que es un colorante básico que se usa para teñir el citoplasma en color rosa (Tapia-Vázquez et al., 2008).

La tinción Tricrómica de Gallego (Ver Anexo 10.3.3) también es una técnica topográfica que permite poner de manifiesto las fibras colágenas especialmente. Se usa la mezcla de dos colorantes, el carmín índigo y el ácido pícrico, el primero se fija sobre las estructuras más densas. Al final se observan los núcleos rojo violeta, los haces de colágeno azules, las fibras musculares verde-amarillas y la capa córnea amarilla (Ayala-Cano et al., 2009).

La tinción de Wright resalta (Ver Anexo 10.3.3) los elementos formes de la sangre así como sus gránulos facilitando la identificación de cada elemento celular. La tinción Warthing- Starry resalta específicamente las espiroquetas tiñéndolas de negro por un aglomerado de plata reducida que contrasta con el tejido de fondo amarillo o café claro originado por una concentración baja de plata depositada (Faine, 1964, Colagross-Schouten et al., 2002).

6. RESULTADOS

6.1 Prueba de microaglutinación

Los títulos obtenidos de las 46 muestras de suero analizadas se observan en Figura 10 y en la tabla con los resultados de cada microaglutinación en el anexo 10.2.2.

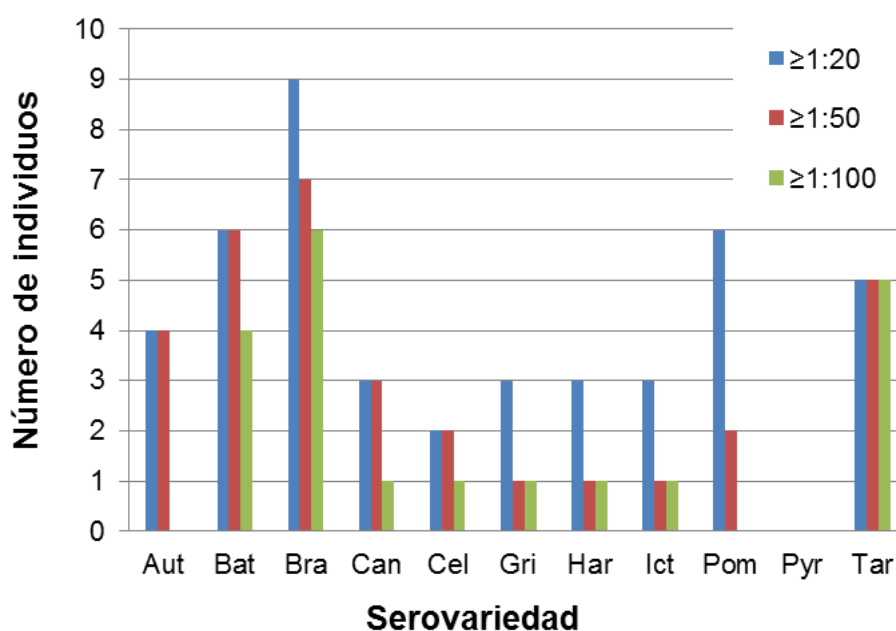


Figura 10. Número de individuos con títulos para las diferentes serovariedades. 1:20+, 1:50+, 1:100+: respectivamente individuos con título de 1:20 o mayor, 1:50 o mayor, 1:100 o mayor. Aut: Autumnalis; Bat: Batavie; Bra: Bratislava; Can: Canicola; Cel: celledoni; Gri: Grippotyphosa; Har: Hardjo; Ict: Icterohaemorrhagiae; Pom: Pomona; Pyr: Pyrogenes y Tra: Tarassovi

Las serovariedades con el mayor número de individuos positivos fueron Bratislava (13.0% con 1:100 o más), Tarassovi (10.9%) y Batavie (8.7%). El título máximo observado es de 1:3200, que fue obtenido para dos serovariedades (Bra-

tslava y Tarassovi) en un individuo, y para una serovariedad (Tarassovi) en otro. Considerando el título máximo observado en cada individuo, el promedio de todas las pruebas MAT (con título) fue de 1:485 (coeficiente de variación = 1.93). Excluyendo los de los individuos con título de 1:3200, los organismos con títulos más altos fueron siete individuos con 1:200 para una o más serovariedades, y tres con 1:400. El porcentaje de machos positivos para una o más serovariedades fue mayor que el porcentaje de hembras con el criterio de 1:50 o más (51.7% N=29 vs 35.3% N=17), pero la diferencia no fue estadísticamente significativa (Prueba exacta de Fisher: $P = 0.14$). Con el criterio de 1:100 el porcentaje de individuos positivos fue igual en los dos sexos (34.5% vs 35.3%). Los dos individuos con títulos de 1:3200 eran machos, pero no se observó una diferencia significativa en el título máximo de machos y hembras (mediana = 1:200 en ambos sexos, prueba exacta de Mann-Whitney: $P = 0.63$).

6.2 Métodos moleculares

6.2.1 Tratamientos para conservar el ADN en la orina

Con las muestras colectadas durante 2010, 266 muestras y 836 alícuotas, se hicieron los análisis. Se agruparon los tratamientos en muestras conservadas con sales, guanidina, congelamiento, alcohol, glicerol y filtros, Por medio del análisis visual en los geles de agarosa se calificaron las bandas observadas en las fotos de cada extracción. Se tomó en cuenta la intensidad de brillo de cada banda

como medida de la cantidad de ADN. Para ello se estableció un valor de 5 a la banda más brillante y de cero a la muestra en la que no se observaba banda. En la siguiente figura (Fig. 11) se observan unas bandas ejemplo para cada valor asignado.

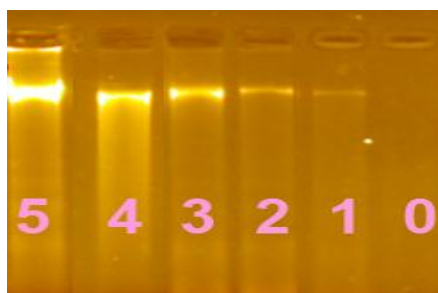


Figura 11. Evaluación visual de bandas. La figura muestra un ejemplo de la clasificación cualitativa de las bandas de ADN en los geles, basada en la intensidad de la banda.

También se analizó la degradación de las bandas calificándolas como no degradadas, escasamente degradadas, mediana y fuertemente degradadas. Del análisis visual de las bandas de ADN se obtuvo un puntaje medio de 2.96 para los buffers hechos a base de sal y una media de 1.39 (Tabla IX) para los que tienen base de guanidina. Se aplicó una prueba T con una diferencia media entre medias igual a $P=0.0001$.

Tabla IX. Evaluación visual de las bandas de ADN por tipo de conservador. ES: error estándar; LCI: límite de confianza inferior al 95%; LCS: límite de confianza superior al 95%.

Tratamiento	N (alícuotas)	Media	ES	LCI	LCS
Filtros (11)	20	0.3	0.29	-0.26	0.87
Congelar (26)	54	1.56	0.17	1.22	1.89
Guanidina (141)	270	1.39	0.17	1.05	1.72
Sales (61)	65	2.96	0.2	2.58	3.36

Las muestras de ADN extraídas a partir de muestras de orina conservadas en filtros Zymo, revelan ser las menos eficientes y le sigue el congelamiento. Los métodos que presentaron la mayor eficacia fueron: soluciones salinas (RNA later) y las soluciones que contenían guanidina. Los anteriores se dividieron en buffers con guanidina y los hechos a base de sales para su análisis.

Con los datos obtenidos del Nanodrop® a partir de 323 tratamientos de guanidina y 82 hechos a base de sales, se obtuvo una concentración media de 34.55 ng/μL para los de guanidina y de 110.99 ng/μL para los hechos con sales. Se aplicó una prueba T con una corrección de Welch: la diferencia media=76.45; intervalo de confianza al 95% de la diferencia= -99.20, 60.56; t= -8.21; gl= 85.58; P= 0.0001 (Tabla X). Los resultados de ambos análisis (clasificación cualitativa y medida de concentración) nos indican que los tratamientos hechos a base de sales son los mejores conservadores de ADN en las muestras de orina.

Tabla X. Concentración de ADN por tipo de conservador. ES: error estándar; LCI: límite de confianza inferior al 95%; LCS: límite de confianza superior al 95%.

Tratamiento	N (alícuotas)	Media	ES	LCI	LCS
Filtros (11)	18	16.86	6.54	4.04	29.68
Congelar (14)	14	61.59	17.99	26.32	96.85
Guanidina (146)	323	34.55	3.11	28.46	40.64
Sales (51)	82	110.99	13.02	85.47	136.52

Al medir el ADN en el Nanodrop® se observaron tres tipos de gráficas diferentes: 1) curva con un solo pico de absorbancia a 260 nm, correspondiente al

espectro absorbido por el ADN, sin evidencias de contaminación (Fig. 12); 2) curva con dos picos, uno a 230 y otro a 290 nm y un valle a 260 nm, indicando contaminación y baja concentración de ADN (Fig. 13); 3) curva con un pico cargado a la izquierda a 230 nm, indicando presencia prevalente de contaminantes y baja concentración de ADN (Fig. 14).

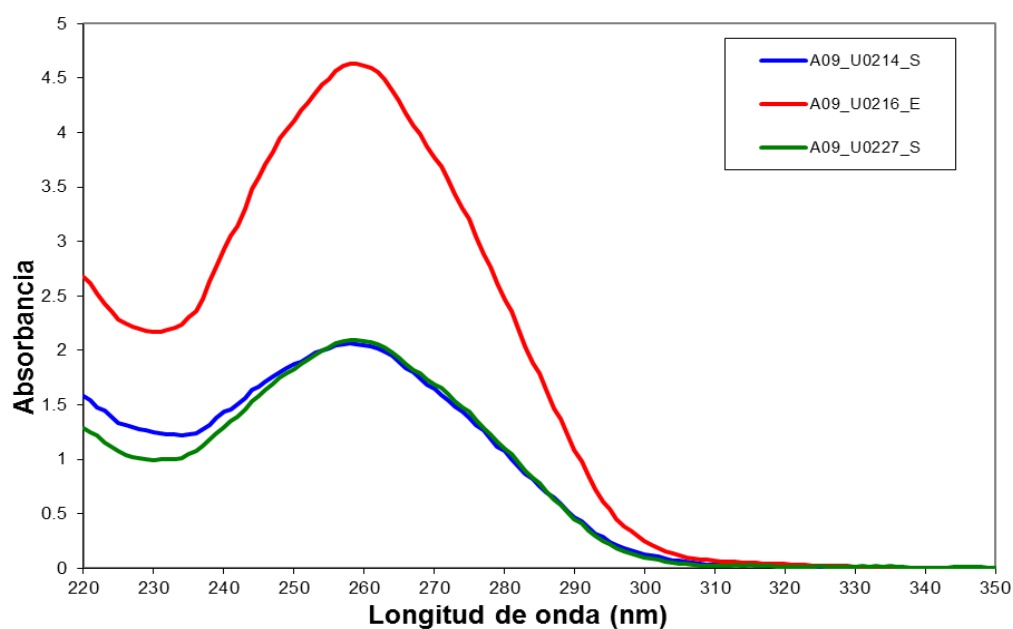


Figura 12. Gráfica esperada de concentración de ADN extraído a partir de muestras de orina (un solo pico en la región de máxima absorbancia del ADN, 260 nm)

Otro tipo de curva presentó una curva con dos picos, uno a 230 y otro a 290 nm arrastrando los datos de la concentración de ADN (Fig. 12) la última curva mostró un pico cargado a la izquierda en el espectro de 230 nm, indicando contaminación en las muestras de ADN extraído (Fig. 13).

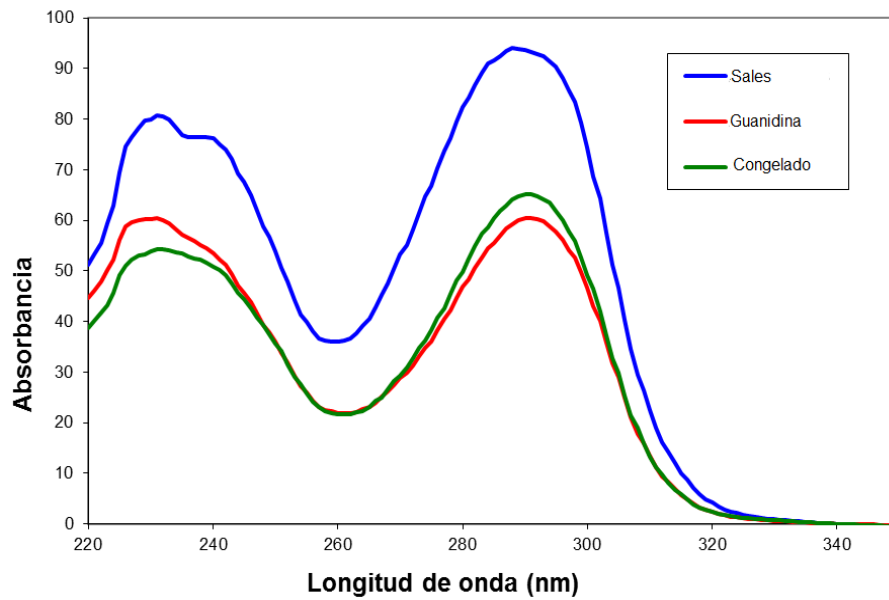


Figura 13. Caso I de contaminación y baja concentración de ADN extraído de muestras de orina.

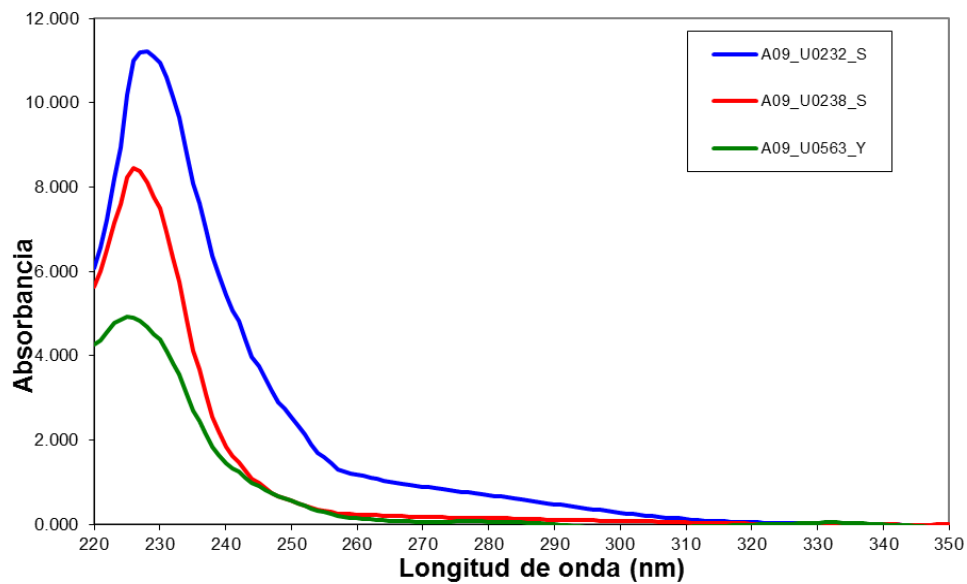


Figura 14. Caso II de contaminación y baja concentración de ADN extraído de muestras de orina.

6.2.2 Limpieza de ADN

Con dos kits de limpieza (GET™ CLEAN DNA y Power-Clean DNA®) sólo se observó una gran disminución del ADN en las muestras, pero no mejoró la calidad ya que las curvas a 230 y 290 nm, indicadoras de contaminantes, permanecieron.

La prueba hecha duplicando los lavados con AW1 y con AW2 generó una reducción en los contaminantes, pero en el gel de agarosa de la extracción no se observaron bandas claras. En el gel de las PCR hechas usando los tres cebadores con mejor límite de detección (LipL41, ADK y RRS) no hubo resultados que marcaran una diferencia entre los métodos de limpieza.

6.2.3 Extracción de ADN de cultivos de *Leptospira sp.* (controles positivos)

De todas las extracciones del cultivo de las 10 serovariedades de bacterias *Leptospira sp.* generaron bandas de ADN de buena calidad en los geles. El promedio general de la concentración de la primera elución de acuerdo a las medidas de Nanodrop® fué de 78.94 ng/μL (Fig. 15).

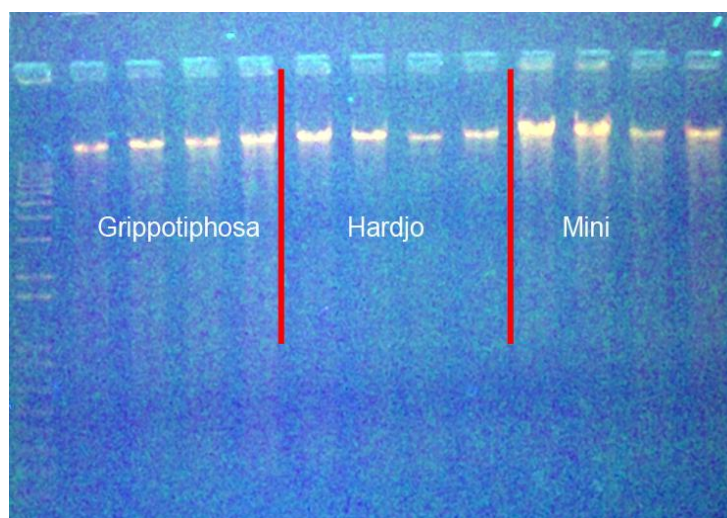


Figura 15. Gel de 1% de agarosa ADN extraído de cultivo de *Leptospira sp.* de tres serovariedades diferentes

6.2.4 Amplificación de ADN de FEN y bacterias

Con el primer cebador usado (ZCWC03) solo se obtuvieron amplificaciones a partir de muestras de orina de machos y las bandas más brillantes se obtuvieron a partir de 30 min de incubación al extraer el ADN, tiempo que se uso para la extracción de todas las muestras siguientes (Fig. 16).

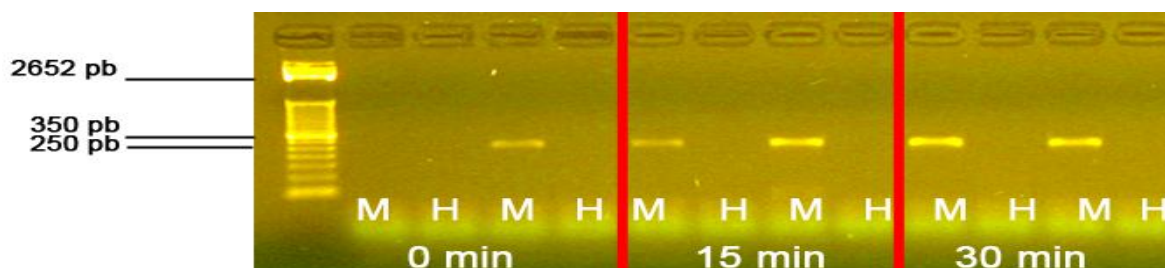


Figura 16. Bandas de ADN de FEN, M: masculino; H: hembra. Se amplificó usando el cebador ZCWC03 con tres tiempos de incubación para digerir la muestra, izquierda 0 min, centro 15 min y derecha muestras 30 min.

Las pruebas con muestras de orina y cebadores para amplificar bacterias fueron positivas. Los problemas de contaminación del control positivo se resolvieron exponiendo la mezcla de PCR sin ADN a la luz UV (Fig. 17).

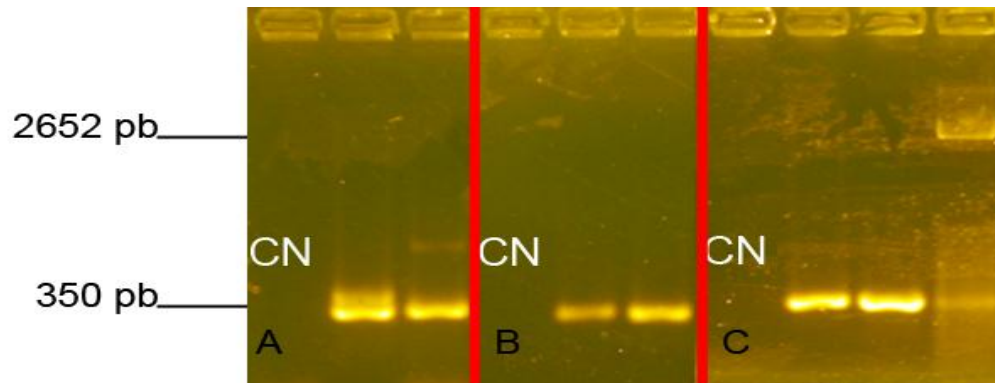


Figura 17. Bandas de ADN extraído de muestras de orina amplificando para cebadores de A) bacterias en general (65ab /DG74), B) Gram + (143/ DG74) y C) Gram - (68d/DG74).

6.2.5 PCR con muestras de orina

Las PCR que se hicieron con muestras de orina en su mayoría no presentaron bandas, las que presentaron bandas no siempre eran de tamaño específico y las que sí pertenecían al tamaño deseado solían tener en el mismo carril bandas de menor tamaño por debajo como se muestra en la figura 18. El cebador *tpiA* (554 pb) del MLST de Thaipadungpanit, (2007) presenta, para las seis muestras de ADN extraído a partir de orina, presentan bandas brillantes de tamaño que varía entre 150 y 200 pb. Solamente dos muestras (3 y 4) tienen bandas de tamaño

específico de acuerdo al control positivo y la escalera, pero incluso estas muestras presentan entre seis y siete bandas de menor tamaño.

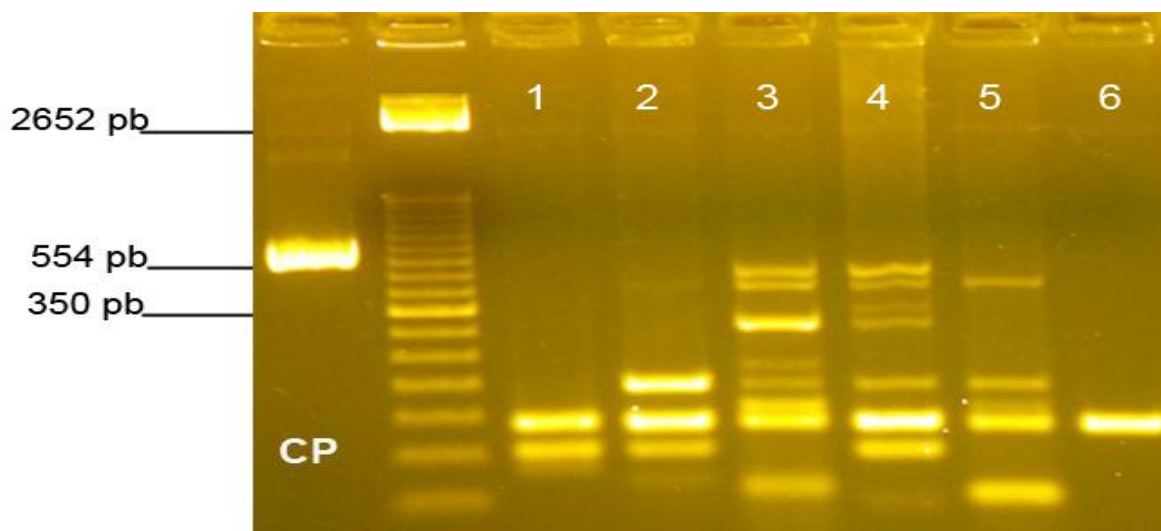


Figura 18. PCR con ADN de muestras de orina. Se observa la amplificación de bandas inespecíficas y dos bandas de tamaño específico para el cebador tpi A (554 pb) del MLST de (Thaipadungpanit J et al., 2007).

6.2.6 Optimización de las reacciones de PCR (mejoras en tiempo y calidad)

PCR multiplex

El intento de PCR multiplex no funcionó como se esperaba. A la temperatura que amplificaba bien G1/2 no presentaban buenas bandas con B64 I/II y a la temperatura que amplificaba bien el cebador B64 I/II no lo hacía para G1/2. Por lo

anterior se decidió no usar este método con las muestras problemas ya que nos acarraría un nuevo factor para considerar al analizar las muestras.

Variación en el volumen de la reacción

Con volúmenes de reacción totales de 25 μL y 15 μL amplificaron ambas muestras de ADN sin diferencias aparentemente importantes. El ADN usado estaba diluido 1:10 y con tan solo 1 μL se obtenían resultados positivos como se observa en la figura 19. Por lo tanto se trabajó con volumen de 15 μL de reacción en todas las PCR.

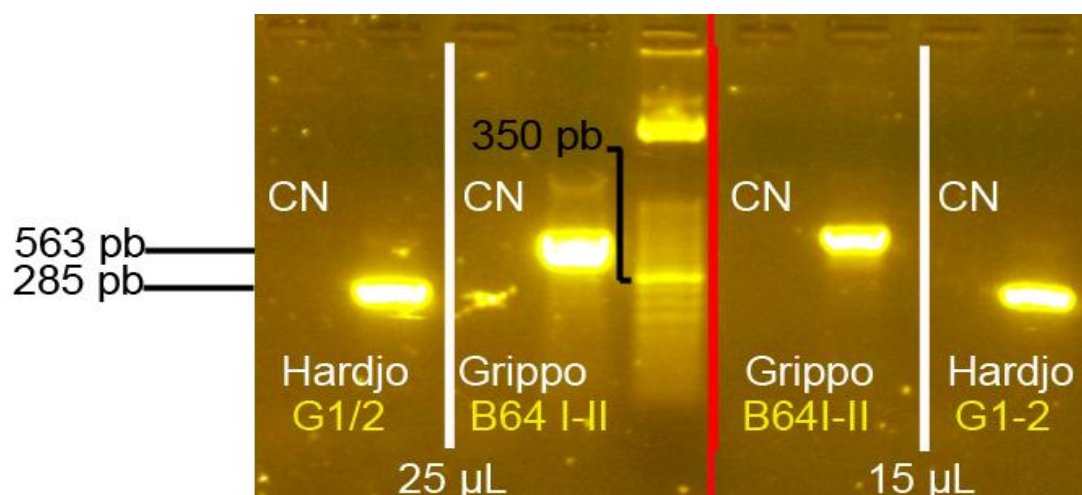


Figura 19. Gel 1.5% agarosa. Comparación de volumen final en PCR con cebadores G1/2 (285 pb) y B64-I/II (563 pb). La reacción de 25 μL (izquierda) se hizo con 3 μL de ADN y la de 15 μL (derecha) con 1 μL de ADN, ambas reacciones tenían una concentración de 2mM de MgCl_2 . CN: Control Negativo.

Facilitador de PCR (BSA)

El uso de albúmina bovina no generó cambios importantes en las amplificaciones. En la figura 20 se observan cuatro filas con 23 muestras cada una, la primera fila de PCR se hizo sin albúmina, la siguiente se hizo con 0.05% de albúmina, la tercera con 0.1 y la última con 0.2% de albúmina.

Observando la figura se aprecia que la muestra siete es más brillante con 0.05 y 0.1 % de albúmina, a diferencia de 0.2% y sin albúmina en donde no se presentan y las muestras cuatro y ocho solo amplificaron con albúmina al 0.2%, al contrario de las muestras seis y 14 que si presentan bandas sin albúmina y con 0.05 y 0.1% de albúmina y no en 0.2% de albúmina. En cuanto al total de bandas, se amplificaron 15 sin albúmina y 15 con 0.05%, 13 bandas con 0.1% y 12 con 0.2% de albúmina. Por lo que al no encontrar una diferencia importante no se usó para analizar las muestras.

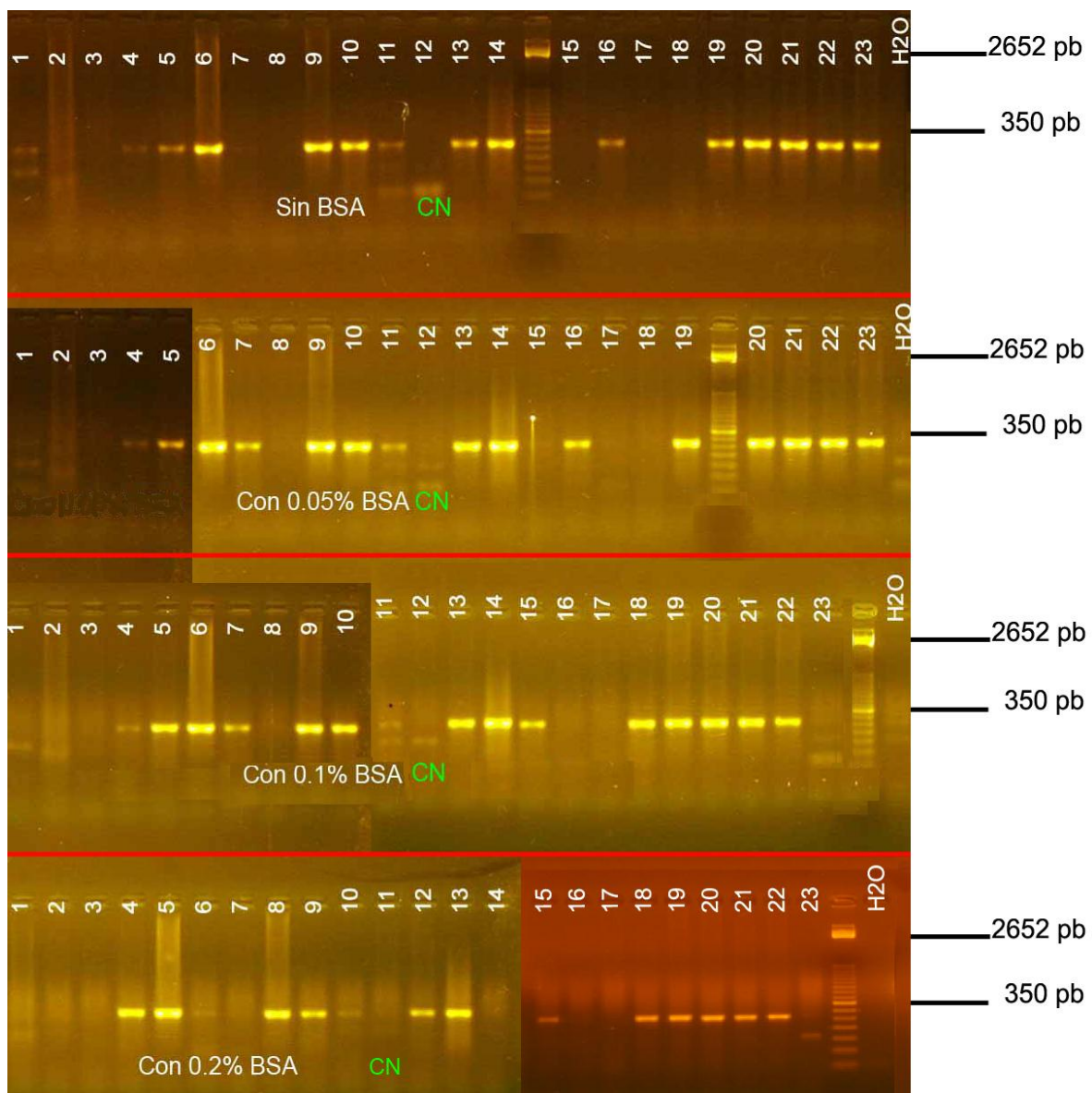


Figura 20. Gel al 1.7% de agarosa corrido por 28 min se observan las mismas muestras cuatro veces a lo largo del gel con diferente concentración de albúmina de suero bovino en cada fila. CN: control negativo. Del lado derecho se indican los tamaños de las bandas más brillantes de la escalera.

Variación en la concentración de ADN y en el número de ciclos de la PCR

Las PCR se hicieron con el primer G1/2 y muestras de sangre (1-5,7-11) y de orina (7', 8', 9' y 10') foca elefante, una de riñón de foca de puerto (6) y sangre de lobo de California (12). En el gel de la figura 21 se observa horizontalmente las diferencias por el número de ciclos 40 y 50. Las muestras de la parte superior del gel se sometieron a 40 ciclos y solo se observan dos líneas tenues de tamaño específico (muestras de sangre 9 y 11) en la primera columna. La línea inferior que muestra las PCR termocicladas con 50 ciclos, presenta bandas mucho más brillantes de tamaño específico e inespecífico.

El gel también está dividido de manera vertical por dos líneas verdes. Cada columna contiene muestras con diferentes concentraciones de ADN. En la primera columna las muestras tienen 4 μ L de ADN, en la siguiente tienen 8 y en la última 12 μ L. La primera columna es la que presenta más bandas de tamaño específico e inespecífico. En la parte superior, es decir a cuarenta ciclos, si se observaron dos bandas tenues de tamaño específico (9 y 11) y cuatro bandas mayores de 500 pb (bandas No. 6-8 y la 10).

En la parte inferior, es decir con 50 ciclos se observan cuatro bandas brillantes (1, 3, 6 y 8). Trazando una línea horizontal sobre los controles que están en cada esquina y después de que el gel haya corrido 50 min, se puede observar que las bandas más brillantes tienen un tamaño mayor a 300 pb cuando el tamaño esperado es de 285 y que las bandas de los controles positivos (CP) están por deba-

jo de la banda correspondiente a 300pb de la escalera.

En la columna de 8 μ L de ADN solo se observa una banda en la zona inferior (50 ciclos) cuyo peso es menor a 200pb y en la última columna se aprecia una pequeña banda de 100 μ L de ADN en la zona de 50 ciclos. En general en la PCR hecha con 50 ciclos se observa mayor acumulación de dímeros al final de los carriles del gel.

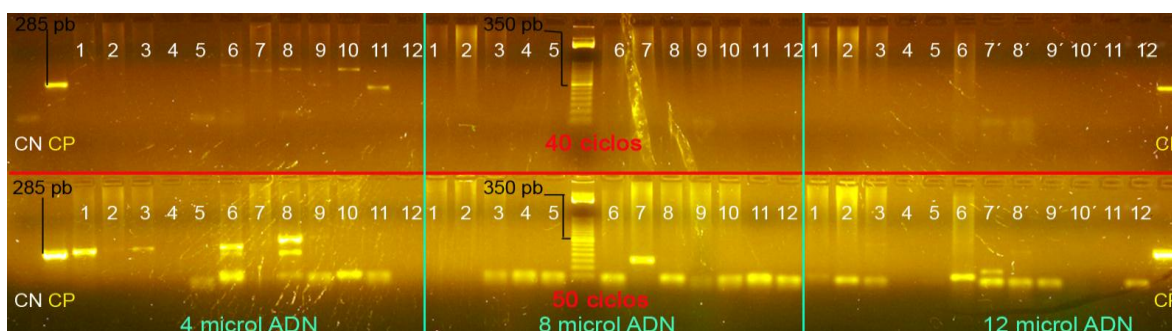


Figura 21. Gel al 1.7% de agarosa corrido por 28 min. Las mismas muestras de ADN en la línea superior y la inferior, pero con diferentes concentraciones de ADN (columnas) y con diferentes ciclos de amplificación (renglones). CN: control negativo; CP: control positivo.

6.2.7 PCR límite de detección

Diluciones de ADN bacteriano

Las diluciones de ADN bacteriano en AE nos mostraron que el límite de detección de los cebadores del MLST de Ahmed (2006) y de G1/2 y B64 I/II es de 1:10,240. En la figura 22 se observa el límite del cebador ADK y aunque en la dilución 1:40,960 no amplificó, se puede hacer un análisis más refinado con diluciones

intermedias entre ambas. Los cebadores del MLST de Thaipadungpanit et al., (2007) alcanzaron a cubrir las cuatro diluciones hasta 1:163840, mostrando un límite de más alcance, las únicas diferencias entre esos cebadores es que el fadD presentó bandas más tenues que cualquiera de los otros seis cebadores.

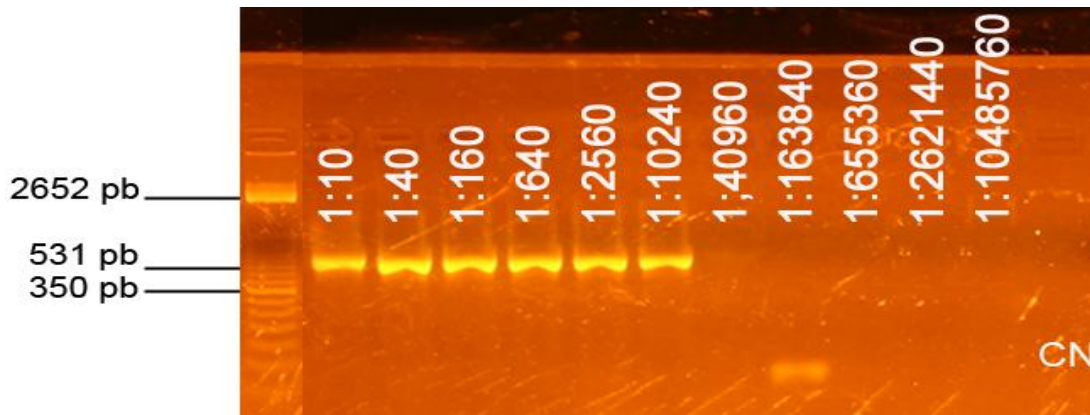


Figura 22. Bandas de ADN de *Leptospira sp* en diluciones, amplificando para ADK (531 pb) (MLST de Ahmed et al., 2006) hasta 1:10240.

ADN de *Leptospira* inoculado en elución de orina

Se observó inhibición en las bandas de las muestras de ADN inoculado en eluciones de muestras de orina. Las cuatro primeras bandas del gel de la figura 23 se observan muy brillantes a diferencia de las siguientes cuatro, que corresponden a la prueba de inocular ADN en una muestra de orina que no había amplificado para ningún cebador. Las muestras prueba solo presentan dos bandas con las dos diluciones más altas usadas para esta PCR con secY (549 pb). Los otros cebadores del MLST de Ahmed (2006) y G1/2 presentan casos semejantes en donde to-

das las bandas de las muestras inoculadas en la elución de orina se ven más tenues que las de el ADN inoculado en buffer AE. Solamente tres cebadores fueron capaces de amplificar todas las muestras, aunque como ya se mencionó, las bandas inoculadas en elución de orina son más tenues, esos cebadores son G1/2, ADK y LipL41. El cebador GspD solo amplificó la primera dilución inoculada en elución de orina, ICDA y RRS amplificaron las tres primeras eluciones y LipL32 y SecY solo amplificaron las dos primeras (Fig. 23). Con este nuevo experimento podemos analizar que los cebadores del MLST de Ahmed et al. (2006) llegan a amplificar hasta 1:30720, al igual que G1/2 cuando el ADN está diluido en AE. El único cebador del MLST que presentó bandas muy tenues al amplificar estas diluciones fue ICDA.

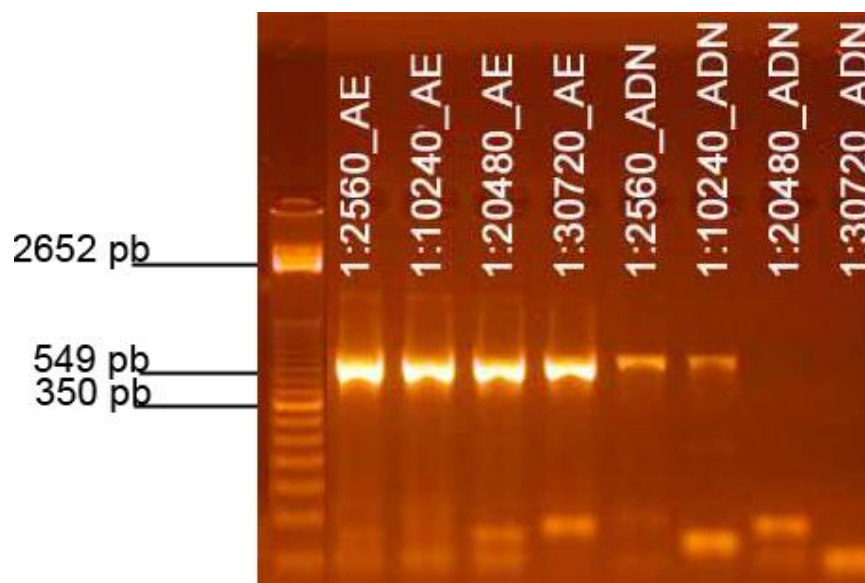


Figura 23. PCR donde se observa inhibición en las eluciones de muestras de orina inoculadas con ADN de cultivo, en comparación con las bandas intensas de ADN diluido en AE. PCR con secY cebador (549 pb) de MLST de Thaipadungpanit et al., (2007).

Variación en las soluciones de lisis en muestras de orina inoculadas con *Leptospira sp.*

Esta prueba demostró que las muestras lisadas durante la extracción con solución de lisis ATL presentaron una deficiencia al ser amplificadas. En la figura 24 se observa en la fila superior del lado izquierdo de la escalera las bandas amplificadas con G1/2 en donde se puede observar que amplifica hasta 100 bacterias, a diferencia de la fila inferior en donde no se observa más que una ligera amplificación con 5,000 bacterias. Del lado derecho no se ven cambios importantes en la amplificación, aunque de igual manera la extracción se hizo con dos soluciones de lisis diferentes. A partir de esta muestra se hicieron las extracciones con la solución de lisis AVL (Qiagen) por lo que las muestras colectadas en 2011 se extrajeron con tal solución.

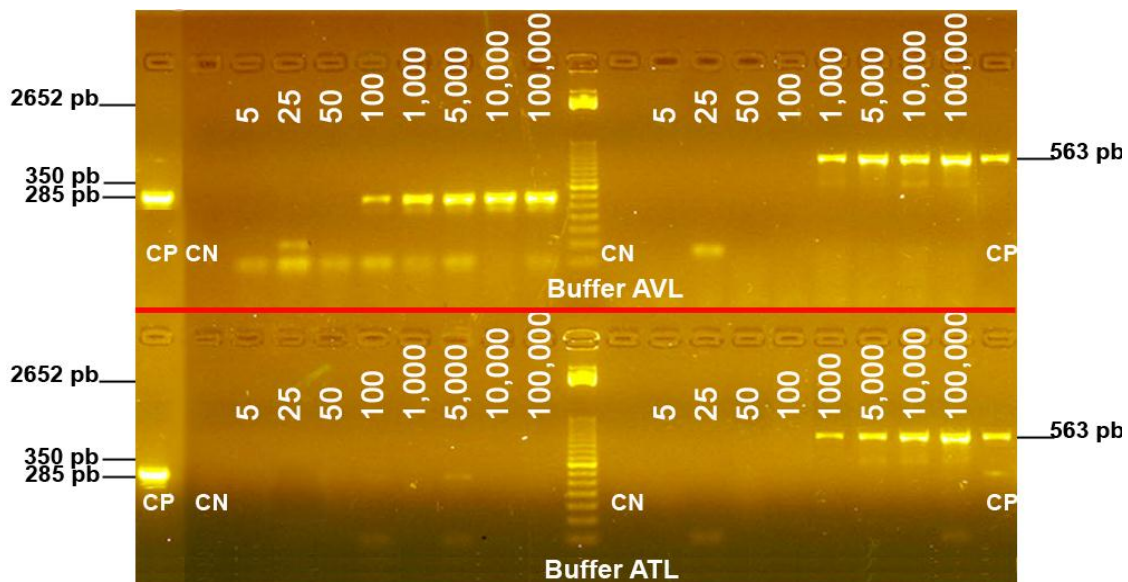


Figura 24. Lado izquierdo de la escalera amplificaciones con G1/2 (285 pb) y del lado derecho de la escalera con B64 I/II (563 pb). La extracción de las muestras de arriba se hizo con el buffer de lisis AVL y la de abajo con ATL.

Variación en volumen de muestra y contenedor durante la primera centrifugación de la extracción de orina.

La prueba muestra en general que los cebadores amplificaron la primera dilución extraída (10^7) con el método 1). Solamente el cebador GspD no amplificó para ninguna dilución de ningún método de extracción. La figura 25 muestra el ejemplo de la prueba hecha a los cebadores del MLST de Ahmed et al. (2006) y a G1/2. Se observan las amplificaciones hechas con el cebador ADK (531 pb), los controles positivo y negativo y las diluciones de bacterias correspondientes a cada método de extracción. El peor método de extracción para todos los casos es el 3) por lo que al final de esta prueba sabemos que se pueden perder bacterias en una muestra de mayor volumen (15 mL) al centrifugar a bajas revoluciones por minuto (6,500) durante poco tiempo (15 min). Por lo anterior es que todas las muestras colectadas durante el 2011 se centrifugaron 30 min a 14,000 rpm.

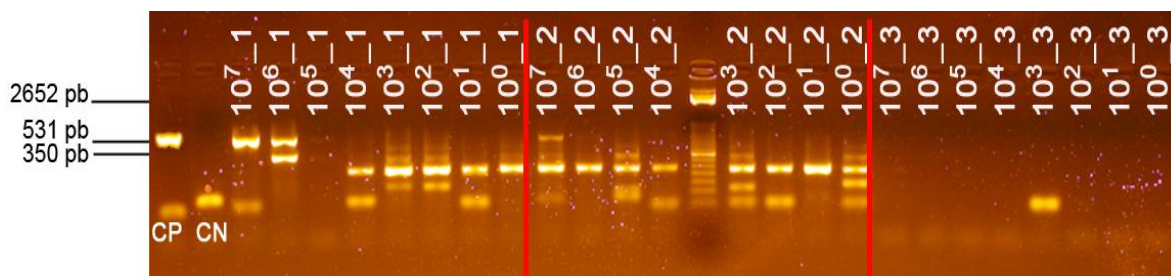


Figura 25. Gel 1.7% de agarosa cebador ADK (531 pb). Orina filtrada e inoculada con *Leptospira sp.* diluidas de 10^0 a 10^7 y tres métodos de extracción diferentes. Solamente las muestras con más bacterias de los métodos de extracción 1 y 2, presentan amplificación positiva. El método 3 no presentó ninguna amplificación específica.

6.2.8 Comparación de PCR entre métodos de conservación

Se hicieron pruebas con muestras de ADN de orina que tuvieran más alícuotas con diferente método de conservación, para saber si alguna alícuota conserva mejor el ADN de bacteria. Los primeros resultados fueron amplificación inespecífica bastante intensa de algunas muestras y otras no. Para estas PCR se usaron muestras que en los datos de Nanodrop® arrojaba una buena concentración de ADN y poca contaminación. En la figura 26 observamos una muestra conservada de tres formas diferentes I: RLS; IB: RLS con β -mercaptoetanol y QB: GLS2 con β -mercaptoetanol. Solo se presenta una banda definida con el método IB, y en los otros carriles con I y QB se observan por lo menos dos bandas tenues por cada carril. Todas las bandas observadas en la imagen son de menor tamaño que el control positivo.

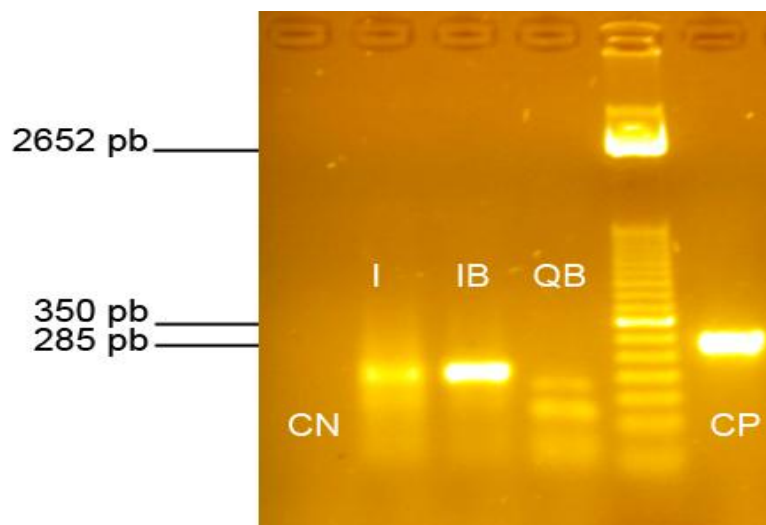


Figura 26. PCR prueba en donde se observa la amplificación de bandas inespecíficas para una muestra de orina conservada de tres formas diversas (I: RLS ;IB: RLS con β -mercaptoetanol y QB:GLS2 con β -mercaptoetanol). Cebadores usados G1/2 (285 pb) en un gel 1.5% de agarosa.

6.2.9 PCR a partir de ADN extraído de riñón

De las muestras de riñón de animales muertos encontrados en el campo la mayoría amplificó inespecíficamente. Al probar el MLST de Thaigpandunpagnit et al. (2007) algunos cebadores presentaron una banda clara de tamaño específico, pero no siempre se repetían las muestras positivas con todos los cebadores. De 29 muestras de ratón, 13 fueron positivas con el primer sucA. De 6 riñones de elefante analizados, 3 tuvieron amplificación, uno con los cebadores sucA y ADK, otro con fadD y uno más solamente con sucA (Fig. 27).

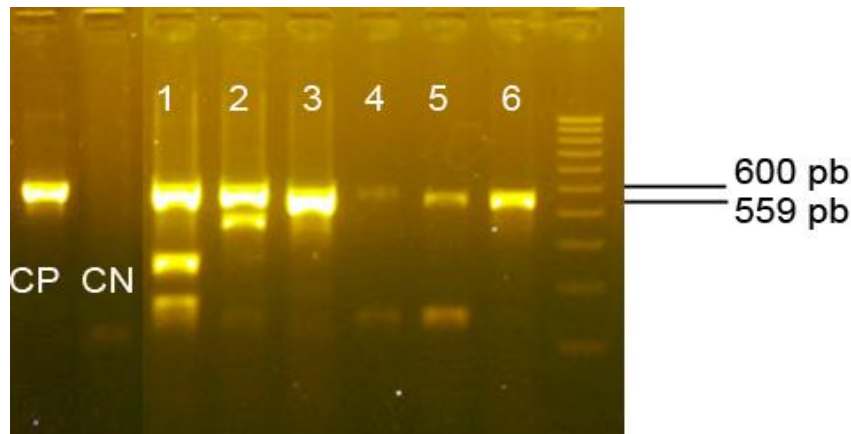


Figura 27. Gel 1.7% de agarosa se hizo con el cebador SucA (559 pb). Se observan bandas de tamaño del control positivo para seis muestras de riñón de ratón. También se presentan bandas de menor tamaño por debajo de las bandas específicas.

6.2.10 PCR a partir de ADN extraído de sangre

Las PCR para microsatélites de ZCWC03 amplificó el 96% de las muestras, por lo que dedujimos que el PCR no se inhibe y que hay ADN amplificable, de FEN. Usando el cebador 65ab que amplifica ADN de cualquier bacteria se amplificó el 47% de las muestras de FEN y el 25% de LoCa (n=8), pero para ambos casos amplificó una serie de hasta cuatro bandas por muestra (Fig. 28). En ocasiones el Control Negativo también era positivo, por lo que se radió el mix, sin ADN, con luz UV durante 5 min.

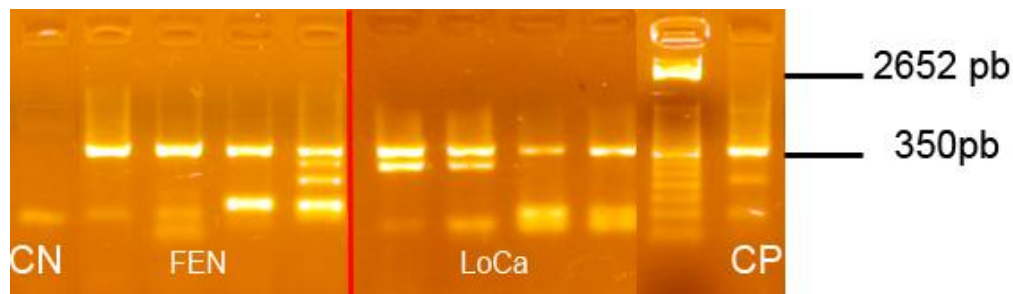


Figura 28. Gel 1.7% de agarosa se hizo con el cebador 65ab/DG74. Se observa bandas de tamaño del control positivo para amplificar cualquier tipo de bacterias. Del lado izquierdo del gel se amplificaron muestras de foca elefante y del lado derecho de Lobo de California.

Con el cebador 68d se logró amplificar el 85% de las muestras de FEN y el 100% de las de LoCa (n=7). Este cebador amplificó, una sola banda definida.

El cebador B64 solamente amplificó los controles positivos (563 pb) que se hacen con el ADN de *Leptospiras sp.* cultivadas. A diferencia del G1/2 que amplifi-

có diferentes bandas que no son del tamaño esperado (283 pb). La mayoría de las muestras no presenta ni siquiera amplificación inespecífica. El 2% (n=289) muestras presentan bandas del tamaño buscado, pero al repetir la PRC el resultado no pudo ser confirmado.

6.2.11 PCR por triplicado

En ningún caso con ningún primer se obtuvieron resultados positivos en las tres ocasiones que se hizo cada PCR. Se observaron bandas de tamaño inespecífico, que se repetían aleatoriamente en las replicas. Por lo anterior no se hicieron réplicas por cada PCR.

6.3 Resultados histopatológicos

6.3.1 Muestra H0022

Se obtuvieron siete laminillas teñidas con H-E, ocho con Wright, una con tricrómica de Gallego y dos con Warthing-Starry.

Tinción H-E: se observó que los vasos sanguíneos no presentan daños. Las cápsulas de Bowman presentan una granulación hialina en el epitelio plano simple, que es más abundante en los túbulos contorneados. Los túbulos contorneados proximales presentan destrucción, se aprecian núcleos pignóticos.

Tinción Wright: No hay presencia de polimorfonucleados, pero si se observó la infiltración de mononucleados en el asa de Henle y glomérulos. Se hicieron más evidentes las lesiones en el tejido necrótico con la presencia de nucleos pignóticos y tejido

Tinción Tricrómica de Gallego: las fibras colágenas lisas se encontraron en buen estado

Tinción de Warthing-Starry: No se observaron espiroquetas.

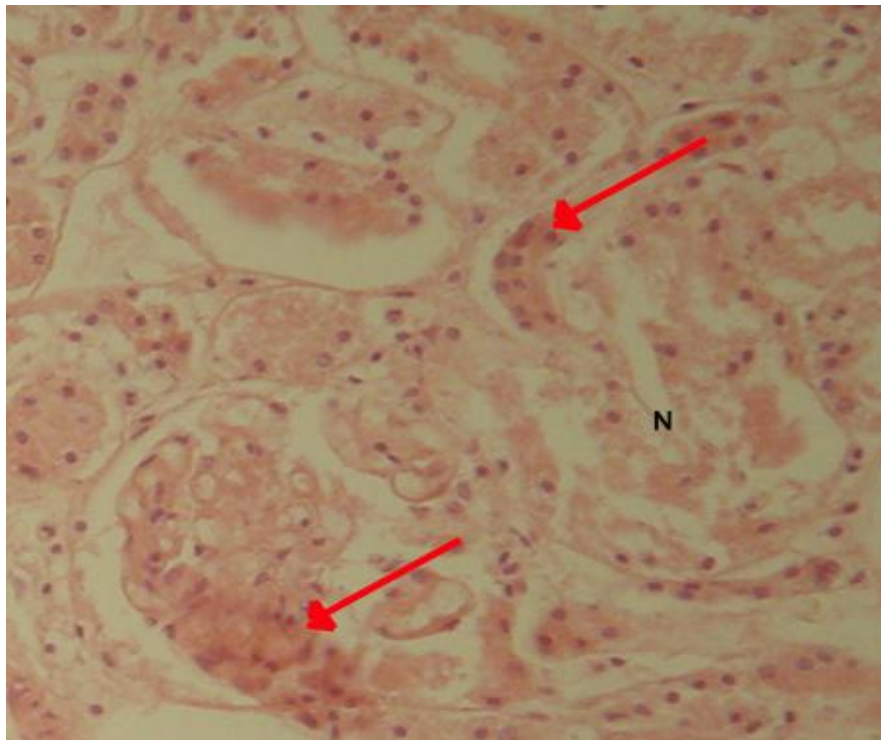


Figura 29. Riñón teñido con H-E (100X) Arriba. Flechas rojas: hemorragias; N: infiltración leucocitaria en glomérulos.

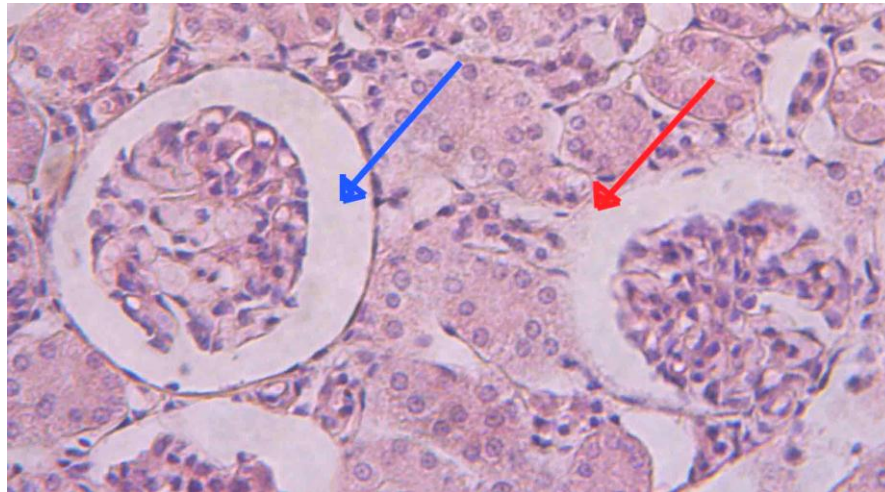


Figura 30. Riñón teñido con H-E (100X) Abajo. La flecha azul: espacio perinurinario aumentado; la flecha roja indica la ruptura de la cápsula de Bowman.

6.3.2 Muestra H0027

Se obtuvieron ocho laminillas teñidas con H-E, nueve con Wright, una con tricrómica de Gallego y dos con Warthing-Starry.

Tinción H-E: se observó deformación de las células epiteliales por la presencia de vacuolización con solución hialina. Los túbulos contorneados proximales presentan destrucción, por ruptura celular.

Tinción Wright: presencia de infiltrados intersticiales y en glomérulos de linfocitos.

Tinción Tricrómica de Gallego: se observó la ruptura de algunas fibras de vasos sanguíneos.

Tinción de Warthing-Starry: No se observaron organismos semejantes a espiroquetas.

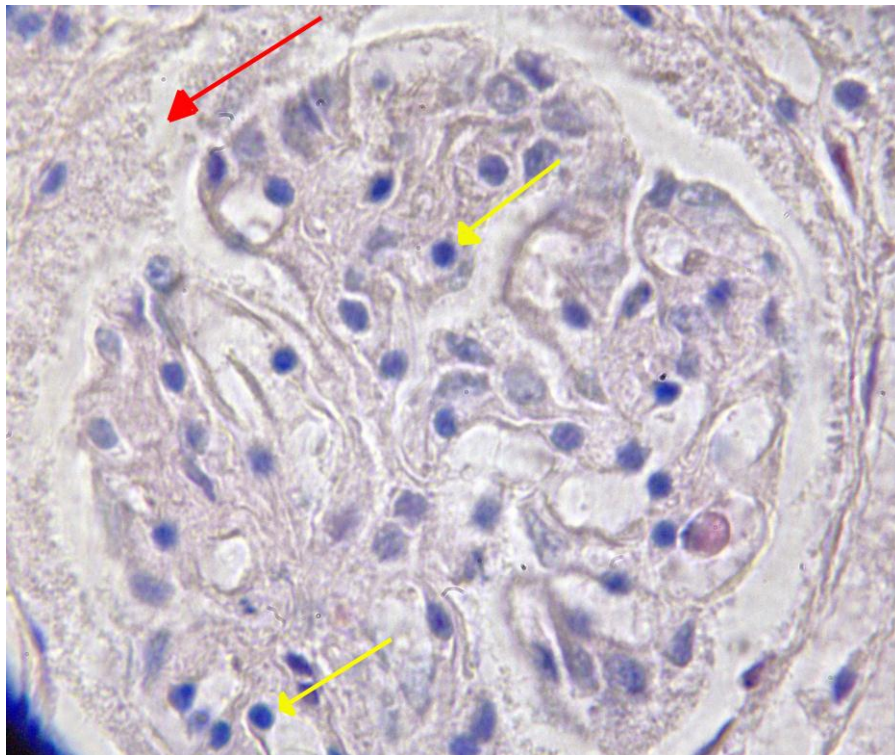


Figura 31. Tinción Wright (100X). Glomérulo en donde las flechas amarillas señalan células infiltradas mononucleadas y la roja sustancia hialina infiltrada en el espacio periurinario.

6.3.3 Muestra H0028

Se obtuvieron cinco laminillas teñidas con H-E, cuatro con Wright, dos con tricrómica de Gallego y dos con Warthing-Starry.

Tinción H-E: se observó una posible retracción en los túbulos contorneados proximales que promueve la pérdida de la morfología celular. Se observó lisis celular por la presencia de núcleos pignóticos. Los túbulos contorneados distales también presenciaron muerte celular al igual que los túbulos conectores que también se marcaron por la presencia de núcleos pignóticos. La presencia de una sustancia hialina en túbulos contorneados distales y cápsulas de Bowman así como engrosamiento del tejido epitelial de la cápsula en donde se observa la sustancia hialina. Se observa la presencia de una estructura conformada por un grupo de partículas oscuros en el centro de un par de glomérulos hacia el conducto cerca de los túbulos conectores proximales. La misma estructura se observó en túbulos contorneados distales.

Tinción Wright: esta muestra presenta una mayor presencia de mononucleados en glomérulos, se observó acidofilia en algunos túbulos de Malpigi y glomérulos, así como núcleos pignóticos y cariorrexis.

Tinción Tricrómica de Gallego: las fibras colágenas lisas se encontraron en buen estado pero se observó un aumento en los fibroblastos en sitios lesionados.

Tinción de Warthing-Starry: No se observaron espiroquetas

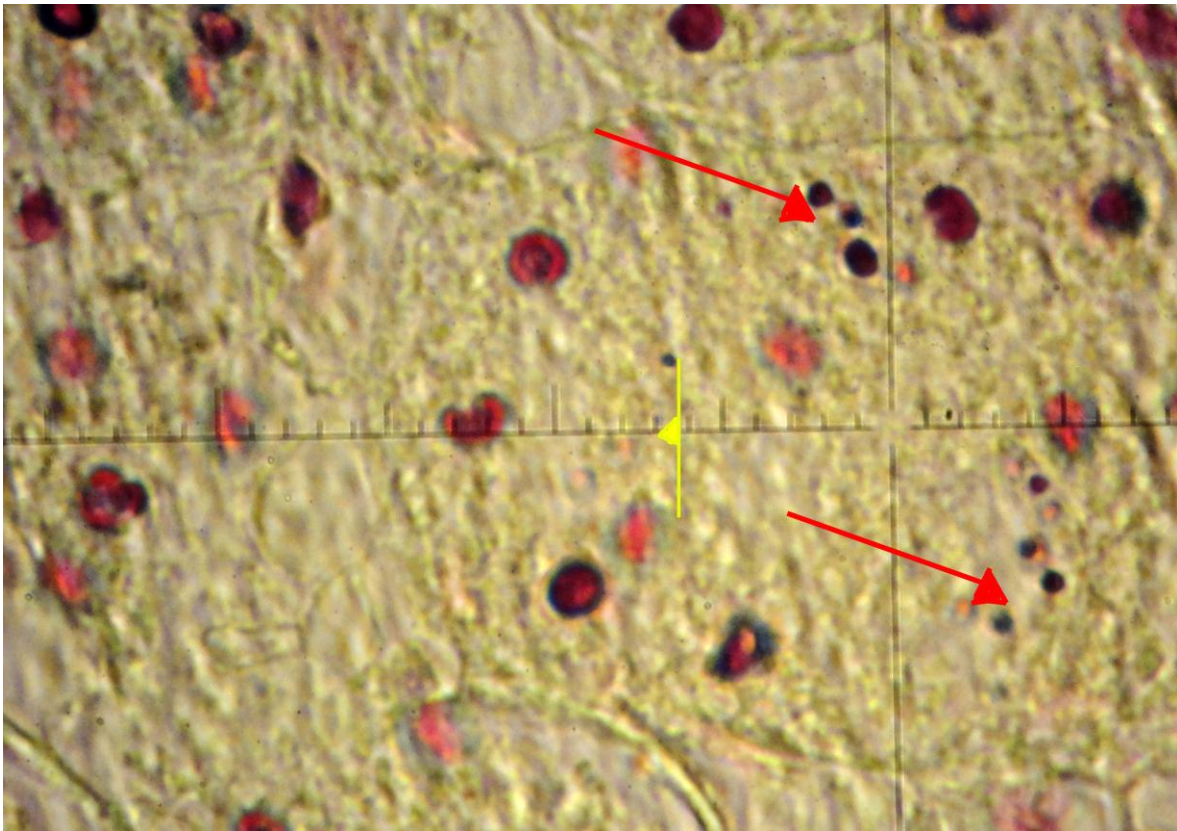


Figura 32. Tinción Tricrómica de Gallego (100X). Riñón teñido con luz de vaso disminuida por el aumento del tamaño de las células que lo conforman, se aprecia cariorrexis, flechas rojas, y la presencia de vacuolas con sustancia hialina que sale a la luz del túbulo desde las células con la membrana celular degradada. La línea amarilla señala la escasa luz del túbulo.

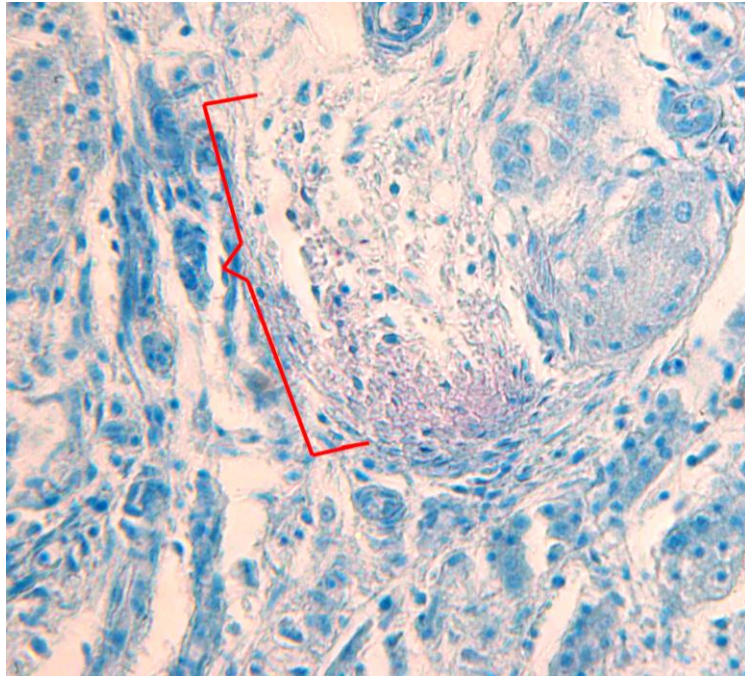


Figura 33. Tinción Wright (40 X). Necrosis multifocal del epitelio tubular con infiltración hialina intracelular y extracelular.

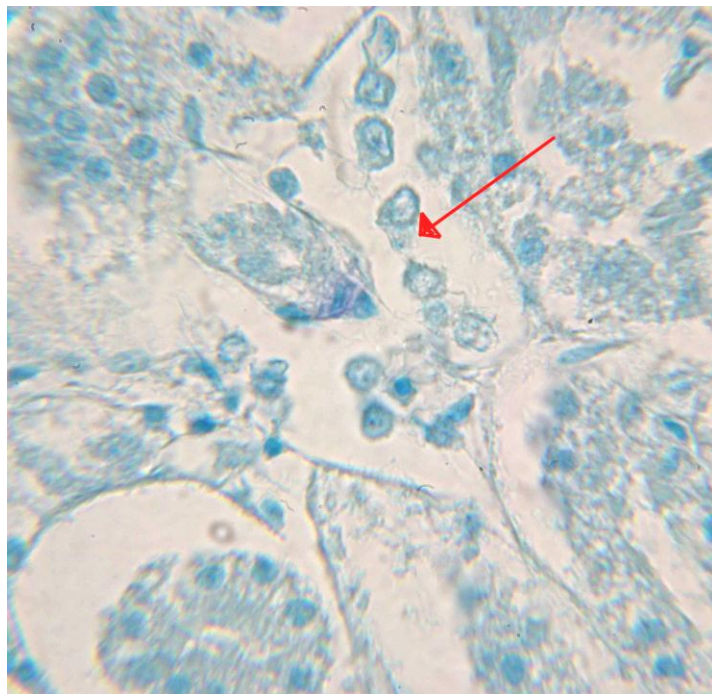


Figura 34. Tinción Wright (100 X). Infiltración hialina y ruptura del tejido del túbulo.

7. DISCUSIÓN

7.1 Evidencias de exposición a *Leptospira sp.* en la foca elefante del norte

Las pruebas de microaglutinación muestran que hay exposición a *Leptospira spp.* patógenas en la foca elefante del norte de las Islas San Benito, ya que se observaron títulos de por lo menos 1:100 para una o más serovariedades en el 61% de los animales analizados. Naturalmente la exposición a *Leptospira spp.* patógenas no significa que haya leptospirosis y de igual manera la identificación de algunos casos de leptospirosis no implica per se que la leptospirosis sea una enfermedad importante para la población, en vista de que la evolución del impacto de un agente patógeno sobre la demografía o viabilidad de una población es un tema complejo (Epstein et al., 2003). Por otro lado, se ha demostrado no solo que hay seroconversión para varias serovariedades patógenas en diferentes individuos, sino también que en algunos de ellos los títulos de MAT son iguales o mayores a los normalmente asociados a leptospirosis (Levett, 2001) y más altos de los observados en casos de leptospirosis en foca elefante con un diagnóstico final de falla renal (Colgrove et al. 2005). Así mismo éstos títulos son más altos que los encontrados incluso en otras especies de pinnípedos diagnosticados con leptospirosis como el lobo marino de California (Acevedo-Whitehouse et al., 2003). Ninguno de los animales muestreados tenían evidencias clínicas de leptospirosis co-

mo úlceras, letargo ó deshidratación (Cameron et al. 2008) y todos presentaban una condición corporal normal para su edad. Altos títulos en el MAT junto a falta de evidencias clínicas fueron observados previamente en destetados de foca elefante (Stamper et al. 1998). En concreto, nuestros resultados proporcionan la primera evidencia de exposición a *Leptospira sp.* en un pinnípedo de la costa del Pacífico de Baja California, y la primera evidencia de exposición a *Leptospira sp.* en una población silvestre de foca elefante del norte, ya que las evidencias previas de leptospirosis en esta especie fueron encontradas en animales varados (Colegrove, et al. 2005, Cameron et al. 2008).

La leptospirosis es una enfermedad importante para los pinnípedos y puede llegar a generar mortalidad masiva en algunas especies (Gulland and Hall, 2007, Lloyd-Smith et al., 2007, Zuerner et al., 2009). Además, los mamíferos marinos por su gran cantidad de grasas, suelen acumular toxinas que pueden producir una supresión del sistema inmune, y los hacen más susceptibles a cualquier tipo de enfermedad (Swart et al. 1994). En vista de lo anterior, es importante profundizar en la investigación para entender si efectivamente existe una infección aguda de leptospirosis en la población de foca elefante del norte de las Islas San Benito, y de México en general, y si la enfermedad tiene un efecto sobre la demografía y viabilidad de la especie.

La serovariedad más representada en este estudio fue la Bratislava, a diferencia de lo observado en el pinnípedo más estudiado para la leptospirosis, el lobo marino de California, que por lo general presenta seroconversión para Pomona (Zuerner, et al. 2009), serovariedad poco presente en las muestras que analizamos de FEN. Ésta serovariedad se encuentra normalmente en mamíferos terrestres, especialmente en caballos y cerdos (Adler y de la Peña-Moctezuma, 2010). Es importante destacar que Bratislava es una serovariedad de la especie *L. interrogans*, al igual que Pomona y no de *L. kirshneri* que es la especie de *Leptospira* más frecuentemente identificada en la foca elefante del norte con métodos moleculares (Cameron, et al. 2008). Las serovariedades de *L. kirshneri* no se encontraron frecuentemente en nuestras muestras de foca elefante del norte.

En las Islas San Benito se han introducido animales domésticos, pero no se conoce el detalle de éstas introducciones como para estimar el riesgo de transmisión de leptospirosis. El único animal no nativo introducido para el que se conoce la modalidad y temporización de introducción es el ratón *P. eremicus cedrosensis*, que en años recientes fue accidentalmente llevado de Isla de Cedros a las San Benito, ha ocupado gran parte del territorio de la Isla Oeste y no se ha podido controlar (comunicación personal del GECl², 2010). Colgrove et al. (2005) mencionan a ratones de género *Peromyscus* como importante fuente de contagio, y Collares-Pereira et al. (2001) resaltan el papel tan importante que juegan los roedores en

² Grupo de Ecología y Conservación de Islas, A.C.(www.islas.org.mx)

general para la transmisión de la leptospirosis. Una parte importante de los ratones muestreados dieron resultados positivos en las PCR, por lo que parecen portadores de *Leptospira sp.* Los ratones se han observado cerca de las áreas de descanso y reproducción de las focas elefante y por ello no se puede descartar un contagio cruzado entre ambas especies, que se puede presentar debido a el contacto con orina infectada.

El contacto con animales silvestres, ya sea por personas que llevan a cabo actividades profesionales o recreacionales incrementa la incidencia de leptospirosis en personas (Monahan et al., 2008, Bharti et al., 2003) y por ese motivo es que la presencia de *Leptospira sp.* y posiblemente de leptospirosis en las focas elefante, representa un riesgo potencial para la salud de los pescadores, sus familiares y los turistas que visitan las Islas San Benito.

7.2 Estudio de enfermedades en poblaciones silvestres de pinnípedos

Los pinnípedos, y los mamíferos marinos en general, son difíciles de estudiar por su estilo de vida. En particular es difícil tomar muestras para evaluar su estado de salud y estudiar sus enfermedades (Gulland, 2007), una tarea básica para la estimación de su estatus, probabilidad de sobrevivencia, y conservación. La mayoría de los datos disponibles sobre enfermedades de pinnípedos ha sido

tomada a partir de animales varados (Greig Denise J. et al., 2005) y son muy raros los estudios desarrollados en poblaciones silvestres, por la complejidad en la logística, la dificultad en el muestreo y los problemas de conservación de las muestras en el campo. Una de las posibles soluciones implica el muestreo con métodos no invasivos que se pueden implementar con mayor facilidad en poblaciones silvestres sin producir daño a los animales, así como el uso de herramientas moleculares para la detección de los patógenos, gracias a que éstos métodos, en teoría, tienen una mayor sensibilidad, y pueden trabajar con muestras de calidad inferior, comparándolos con los métodos tradicionales, por ejemplo, los serológicos (Cámeron, et al.2008). Desde este punto de vista las muestras de orina por son el medio ideal para el estudio de leptospirosis en pinnípedos, dado que las *Leptospira spp.* son emitidas naturalmente en la orina de los organismos infectados y que la orina es fácil de muestrear de forma no invasiva (Valiere and Tablerlet, 2000).

Desafortunadamente, los niveles de metabolitos y biomoléculas presentes en la orina se modifican a lo largo del día de acuerdo a la fisiología del animal (Landi and Caporaso, 1997). Como la composición química de las muestras de orina varia mucho (Holland, et al. 2003), puede afectar la estabilidad de la muestra y del ADN bacteriano (Lucchesi et al., 2004). Además, la orina contiene grandes cantidades de contaminantes e inhibidores de PCR, como la urea (Khan et al., 1991). Todos estos factores complican el uso de las muestras de orina para la detección de leptospirosis usando métodos moleculares y por estas razones en este

estudio se dedicó mucho esfuerzo a desarrollar un protocolo eficaz de preservación de las muestras de orina de foca elefante en el campo y de extracción de ADN de *Leptospira sp.*

El uso de soluciones saturadas de sales nos permitió preservar de manera eficaz el ADN en muestras colectadas en el campo, en poblaciones silvestres y bajo condiciones de difícil o imposible refrigeración estable. Contrariamente a lo reportado en literatura (Kravchenko et al., 2006), estas soluciones son más eficaces que las soluciones basadas en guanidina y similares y representan una solución universal para la conservación de ácidos nucleicos sin refrigeración. Adicionalmente, se puede obtener la misma calidad de preservación de las soluciones comerciales (RNAlater) usando soluciones preparadas en laboratorio con productos químicos básicos, de fácil acceso, económicos, y no peligrosos.

En cuanto a la extracción de ADN, usamos un kit comercial genérico (DNEasy, Qiagen), originariamente desarrollado para la extracción de muestras de tejido, que combinado con un buffer de lisis apropiado (AVL, Qiagen), puede producir resultados de extracción iguales o mejores a los de kits específicos para la extracción de muestras de orina, y a un costo por muestra mucho menor. Desafortunadamente nuestra capacidad de obtención de ADN en aparentemente buen estado a partir de las muestras de orina colectada en el campo, no culminó en una

aplicación exitosa de las herramientas moleculares para la detección de leptospirosis, como se detalla en la siguiente sección.

7.3 Herramientas moleculares para la detección de leptospirosis de pinnípedos

El uso de herramientas moleculares, en particular de la amplificación con PCR y cebadores específicos, parece ser una técnica óptima para la detección de la leptospirosis por su sensibilidad, su capacidad de distinguirla de otras enfermedades renales y la posibilidad de reconocimiento en organismos portadores que no manifiestan síntomas clínicos (Cameron et al., 2008). Desafortunadamente en el caso de la foca elefante del norte de este estudio las herramientas moleculares no fueron un método adecuado de detección de *Leptospira sp.*, ya que la amplificación de ADN de *Leptospira sp.* se obtuvo en pocos casos y nunca fue posible obtener una confirmación del resultado en PCR replicas de la misma muestra. Los resultados serológicos (ver 7.1) prueban que hay exposición a *Leptospira sp.* en esta población, y sugieren la posibilidad de presencia de leptospirosis, por los altos títulos obtenidos en algunos individuos. La falta de resultados obtenidos con herramientas moleculares nos sugiere que estas herramientas no están funcionando adecuadamente en muestras de orina de foca elefante. La eficacia del PCR en la detección de *Leptospira sp.* en muestras de orina depende de muchos factores, incluido el tipo de orina y la calidad de la preservación del ADN en ella (Lucchesi, et al. 2004, Cameron et al. 2008). La foca elefante del norte es un organis-

mo adaptado a la estricta conservación del agua, y produce una orina muy concentrada (Adams and Costa, 1993). Por lo que las muestras de orina de foca elefante puede presentar más problemas de amplificación de PCR que otras especies con orina menos concentrada. No obstante los esfuerzos hechos para optimizar la conservación de las muestras y extracción del ADN, resultó evidente que en la orina hay muchos componentes que pueden contaminar el ADN o inhibir el PCR y por ende, la falta de amplificación podría ser debida a características específicas de la orina de foca elefante.

Todos nuestros esfuerzos enfocados en mejorar la calidad de la amplificación no produjeron los resultados esperados. El uso de PCR anidada, que en teoría puede mejorar la especificidad de la detección de ADN de *Leptospira sp.* ((Nassi et al., 2003) no generó amplificación específica en los PCR. El aumento de número de ciclos del programa de PCR y el uso de un facilitador de amplificación (albúmina) tampoco dieron resultados.

La falta de amplificación del ADN de *Leptospira sp.* se podría deber a una concentración de ADN menor a el límite inferior de detección del PCR y de las varias parejas de cebadores. Esta hipótesis fue confirmada con una prueba hecha con leptospiros inoculadas, en donde se demostró que, para la mayoría de los cebadores, se necesita una concentración alta de *Leptospira spp.* (10^6 por mL o

más) para tener buena amplificación y bandas claras de tamaño esperado en los geles.

Las amplificaciones exitosas con cebadores para ADN genómico de foca elefante demostraron que hay ADN en las extracciones y que no hay tantos inhibidores de PCR como para bloquearla. En contraste, las pruebas hechas comparando buffer AE puro y buffer AE de eluciones de extracciones de orina, ambos inoculados con *Leptospira sp.*, que demostraron la presencia, en la elución de muestras de orina, una cantidad suficiente de inhibidores para bloquear la PCR. Nuestra conclusión es que probablemente existe una interacción entre la baja concentración de ADN de *Leptospira sp.* (comparada a la concentración del ADN genómico de foca elefante) y la presencia de inhibidores del PCR que explicaría la falta de amplificación en individuos con altos títulos en las pruebas de MAT. Hay que agregar que el ADN de *Leptospira sp.* se degrada muy fácilmente en muestras de orina, de igual manera que ocurre con muestras guardadas en el congelador (comunicación personal del Dr. A. de la Peña Moctezuma³, 2010). Por lo anterior, es posible que la precaución de guardar las muestras en congelación al regresar al laboratorio no haya sido suficiente para preservar el ADN de *Leptospira sp.* y que las extracciones se hayan hecho en muestras con ADN genómico bien preservado y en buena concentración y con ADN de *Leptospira sp.* escaso y degradado. Además, el hecho de que las PCR de muestras de riñón de las tres crías de

³ Líder del grupo de investigación en *Leptospira* y leptospirosis, FMVZ, UNAM
Responsable del Laboratorio de Bacteriología de la Unidad de Servicios de Diagnóstico y Constatación, CEI-EPAA, FMVZ, UNAM

foca elefante y de lobo de California muertos dieron positivos para *Leptospira spp.* patógenas demostrando no solo la exposición a *Leptospira sp.* para estas especies, sino también la eficacia general de las herramientas moleculares con otros tipos de muestras, que probablemente presentan menos problemas de concentración de ADN así como menor presencia de contaminantes e inhibidores con respecto a las muestras de orina.

El último factor que hay que considerar es la posible inexperiencia de los operadores en trabajo molecular específico para *Leptospira sp.* La parte molecular de este estudio se desarrolló en un laboratorio sin experiencia previa de detección de leptospirosis, con herramientas moleculares y la falta de resultados positivos, en contraste con los resultados serológicos, podría ser debida simplemente a falta de experiencia y de conocimiento de los protocolos para ADN bacteriano que, en cualquier caso, no se encuentran muy bien definidos para las muestras de orina de pinnípedos silvestres. En contraste, este laboratorio tenía una buena experiencia en la aplicación de herramientas moleculares en otro tipo de muestras y de ADN (genómico y mitocondrial), todos los operadores asistieron a un curso teórico-práctico sobre métodos de detección de leptospirosis, y la autora de esta tesis tuvo una estancia de entrenamiento en un laboratorio de referencia nacional por leptospirosis (Laboratorio de bacteriológico de la Unidad de Servicios de Diagnóstico y Constatación, CEIEPAA, FCVZ, UNAM). Además, otros laboratorios con larga experiencia de estudio de leptospirosis también han tenido dificultad al aplicar

herramientas moleculares en la detección de leptospirosis (A. de la Pena Moctezuma, comunicación personal), lo que podría indicar que la leptospirosis es una enfermedad particularmente difícil de detectar con métodos moleculares, en especial en animales silvestres y con muestras no invasivas, que pueden presentar baja concentración de ADN de la bacteria y contaminantes inhibidores de PCR.

8. CONCLUSIONES

Hay exposición a *Leptospira spp.* patógenas en la foca elefante de las Islas San Benito. Son las primeras evidencias de este tipo para un pinnípedo de la costa del Pacífico de Baja California y para una población silvestre de foca elefante del norte. La presencia de títulos de hasta 1:3200 sugiere la posibilidad de leptospirosis, pero no se encontraron individuos con síntomas claros de la enfermedad. Por lo anterior se requiere profundizar en la investigación para determinar la incidencia real de la enfermedad, su impacto poblacional, el riesgo de infección cruzada con otras especies de las islas y el riesgo de transmisión a humanos.

Fue posible desarrollar un protocolo aparentemente eficaz para la preservación de las muestras de orina en condiciones de campo, usando soluciones saturadas de sales, el mejor método de extracción del ADN de esas muestras fue un kit comercial con simples modificaciones. Desafortunadamente la conservación y extracción exitosa del ADN no se pudo aplicar eficazmente al usar herramientas moleculares para detectar *Leptospira sp.*

Los métodos moleculares no resultaron muy efectivos para la detección de *Leptospira sp.* en las muestras de orina de foca elefante del norte. No se obtuvieron bandas de tamaño esperado, ni si quiera en los PCR de muestras de animales con títulos de MAT muy altos (hasta 1:3200). Muy probablemente este resultado se dio por una combinación de la degradación del ADN de *Leptospira sp.* en las

muestras de orina y por la presencia de inhibidores del PCR particularmente problemáticos a baja concentración del template de ADN . La PCR funcionó mejor con las muestras de riñón, pero estas muestras se pueden conseguir solo en animales muertos y por lo mismo no son muy útiles para estudiar leptospirosis en poblaciones naturales. De los cebadores usados, los de mejor resolución y menor límite de detección fueron G1/2, LipL41 y sucA.

9. BIBLIOGRAFÍA

- ACEVEDO-WHITEHOUSE, K., DE LA CUEVA, H., GULLAND, F. M., AURIOLES-GAMBOA, D., ARELLANO-CARBAJAL, F. & SUAREZ-GUEMES, F. 2003. Evidence of *Leptospira interrogans* infection in California sea lion pups from the Gulf of California. *J Wildl Dis*, 39, 145-51.
- ADAMS, S. H. & COSTA, D. P. 1993. Water conservation and protein metabolism in northern elephant seal pups during the postweaning fast. *J Comp Physiol B*, 163, 7.
- ADLER, B., & DE LA PEÑA-MOCTEZUMA, A. 2011. *Leptospira. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Hoboken, NJ, USA Wiley-Blackwell.
- ADLER, B. & DE LA PEÑA-MOCTEZUMA, A. 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 140, 10.
- AHMED, N., DEVI, S. M., VALVERDE, M. D. L. Á., VIJAYACHARI, P., MACHANG'U, R. S., ELLIS, W. A. & HARTSKEERL, R. A. 2006. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 10.
- ANTONEL, G. A., LOWRY, S. M. & FISCU, C. H. 1987. Assessing Northern Elephant Seal feeding habits by stomach lavage. *Marine Mammal Science*, 3, 15.
- AYALA-CANO, S. G., TAPIA-VÁZQUEZ, O.-M. & MARTINEZ-GALLARDO, R. 2009. *Técnicas Selectas de Campo y Laboratorio para el Estudio de las Poblaciones de Fauna Silvestre*, Mexicali, Baja California, UABC.
- BHARTI, A. R., NALLY, J. E., RICARDI, J. N., MATTHIAS, M. A., DIAZ, M. M., LOVETT, M. A., LEVETT, P. N., GILMAN, R. H., WILLIG, M. R., GOTUZZO, E. & VINETZ, J. M. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Infectious Diseases*, 3, 15.
- BOLIN, C. 1996. Diagnosis of leptospirosis: reemerging.
- BOMFIM, M. R., BARBOSA-STANCIOLI, E. F. & KOURY, M. C. 2008. Detection of pathogenic leptospire in urine from naturally infected cattle by nested PCR. *Vet J*, 178, 251-6.
- BOSSART, G. D. 2011. Marine mammals as sentinel species for oceans and human health. *Veterinary Pathology*, 48, 16.
- CAI, H. Y., HORNBY, G., KEY, D. W., OSUCH, M. R. & MAXIE, M. G. 2002. Preliminary study on differentiation of *Leptospira grippityphosa* and *Leptospira sejroe* from other common pathogenic leptospiral serovars in canine urine by polymerase chain reaction assay. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 14, 5.
- CAMERON, C. E., ZUERNER, R. L., RAVERTY, S., COLEGROVE, K. M., NORMAN, S. A., LAMBOURN, D. M., JEFFRIES, S. J. & GULLAND, F. M. 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. *J. Clin. Microbiol.*, 46, 1728-1733.
- CARMONA-GASCA, C. A., LARA, L. L., CASTILLO-SÁNCHEZ, L. O., RAMÍREZ-ORTEGA, J. M., KO, A., PALOMERA, C. L. & DE LA PEÑA-MOCTEZUMA, A. 2011. Detección de *Leptospira santarosai* y *L. kirschneri* en bovinos: nuevos aislados con potencial impacto en producción bovina y salud pública. *Veterinaria México*, 42, 12.
- COLAGROSS-SCHOUTEN, A. M., MAZET, J. A. K., GULLAND, F. M. D., MILLER, M. A. & HIETALA, S. 2002. Diagnosis and seroprevalence of leptospirosis in California sea lions from coastal California. *Journal of Wildlife Diseases*, 38, 11.
- COLEGROVE, K. M., GREIG, D. & GULLAND, F. 2005a. Causes of live strandings of Northern Elephant Seals (*Mirounga angustirostris*) and Pacific Harbor Seals (*Phoca vitulina*) along the central California coast, 1992-2001. *Aquatic Mammals*, 31, 10.
- COLEGROVE, K. M., LOWENSTINE, L. J. & GULLAND, F. M. D. 2005b. Leptospirosis in northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*) stranded along the California coast. *Journal of Wildlife Diseases*, 41, 426-430.
- DASZAK, P., CUNNINGHAM, A. A. & HYATT, A. D. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife threats to biodiversity and human health. *Science*, 287, 8.
- DE PAOLI, P. 2005. Biobanking in microbiology: From sample collection to epidemiology, diagnosis and research. *Microbiology Reviews*, 29, 14.
- DEUTSCH, C. J., HALEY, M. P. & LE BOEUF, B. J. 1990. Reproductive effort of male northern elephant seals: estimates from mass loss. *Journal of Zoology*, 68, 13.
- DIERAUF, L. A. 1994. Pinniped forensic, necropsy and tissue collection guide. *NOAA Technical Memorandum*. U.S.
- DIERAUF, L. A. & GULLAND, F. 2001. *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine*, New York.
- DIERAUF, L. A., VANDENBROEK, D. J., ROLETTO, J., KOSKI, M., AMAYA, L. & GAGE, L. J. 1985. An epizootic of leptospirosis in California sea lions. *JAVMA*, 187, 4.
- ELLIOTT, P. & PEAKMAN, T. C. 2008. The UK Biobank sample handling and storage protocol for the collection, processing and archiving of human blood and urine. *International Journal of Epidemiology*, 37, 11.
- EPSTEIN, P. R., CHIVIAN, E. & FRITH, K. 2003. Emerging diseases threaten conservation. *Environmental Health Perspectives*, 111, 2.
- EVANGELISTA, K., COBURN, J. 2010. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol.*, 5, 13.
- FAINE, S. 1964. Silver staining of spirochaetes in single tissue sections. *Journal of clinical Pathology*, 3.

- FAINE, S. 1982. Guidelines for the control of leptospirosis. *World Health Organization*. Geneva, Switzerland.
- FELDHAMER, G., DRICKAMER, L., VESSEY, S. & MERRITT, J. 2007. Mammalogy: Adaptation, Diversity, and Ecology. *In: HILL, B. M. (ed.) Mammalogy: Adaptation, Diversity, and Ecology*. 3rd edition ed. Baltimore, Maryland: The Johns Hopkins University Press.
- FORONDA, P., MARTIN-ALONSO, A., DEL CASTILLO-FIGUERUELO, B. & VALLADARES, B. 2011. Pathogenic *Leptospira* spp. in wild rodents, Canary Island, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 17, 2.
- GANOZA, C. A., MATTHIAS, M. A., COLLINS-RICHARDS, D., BROUWER, K. C., CUNNINGHAM, C. B., SEGURA, E. R., GILMAN, R. H., GOTUZZO, E. & VINETZ, J. M. 2006. Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. *Plos Medicine*, 3, 12.
- GECI 2009. Grupo de ecología y conservación de islas.
- GERBER, J. A., ROLETTA, J., MORGAN, L. E., SMITH, D. M. & GAGE, L. J. 1993. Findings in pinnipeds stranded along the central and northern California coast, 1984-1990. *Journal of Wildlife Diseases*, 29, 11.
- GODINEZ, C. R., ZELAYA DE ROMILLO, B., AURIOLES-GAMBOA, D., VERDUGO-RODRIGUEZ, A., RODRIGUEZ-REYES, E. A. & DE LA PENAMOCTEZUMA, A. 1999. Antibodies against *Leptospira interrogans* in California sea lion pups from Gulf of California. *J Wildl Dis*, 35, 108-11.
- GRAVEKAMP, C., VAN DE KEMP, H., FRANZEN, M., CARRINGTON, D., SCHOONE, G. J., VAN EYS, G. J. J. M., EVERARD, C. O. R., HARTSKEERL, R. A. & TERPSTRA, W. J. 1993. Detection of seven species of pathogenic leptospire by PCR using two sets of primers. *J Gen Microbiol*, 139, 1691-1700.
- GREIG DENISE J., GULLAND, F. M. D. & KREUDER, C. 2005. A decade of live California sea lion (*Zalophus californianus*) strandings along the Central California coast causes and trends, 1991-2000. *Aquatic Mammals*, 31, 12.
- GULLAND, F. M. D. & HALL, A. J. 2007. Is marine mammal health deteriorating? Trends in the global reporting of marine mammal disease. *EcoHealth*, 4, 16.
- GULLAND, F. M. D., KOSKI, M., LOWENSTINE, L. J., COLAGROSS, A., MORGAN, L. & SPRAKER, T. 1996. Leptospirosis in California sea lions (*Zalophus californianus*) stranded along the central California coast, 1981-1994. *J. Wildl. Dis.*, 32, 572-580.
- HARVELL, C. D., KIM, K. J., BURKHOLDER, M., COLWELL, R. R., EPSTEIN, P. R., GRIMES, D. J., HOFMANN, E. E., LIPP, E. K., OSTERHAUS, A. D. M. E., OVERSTREET, R. M., PORTER, J. W., SMITH, G. W. & VASTA, G. R. 1999. Emerging marine diseases-climate links and anthropogenic factors. *SCIENCE*, 285, 8.
- HEIDE-JORGENSEN, M.-P., HÄRKÖNEN, T., DIETZ, R. & THOMPSON, P. M. 1992. Retrospective of the 1988 European seal epizootic. *Diseases of aquatic organisms*, 13, 26.

- HOELZEL, A. R. 2002. *Marine mammal biology : an evolutionary approach*, Oxford Blackwell Publisher.
- HOLLAND, N. T., PFLEGERA, L., BERGERB, E., HOA, A. & BASTAKI, M. 2005. Molecular epidemiology biomarkers—Sample collection and processing considerations. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 206, 8.
- HOLLAND, N. T., SMITH, M. T., ESKENAZI, B. & BASTAKI, M. 2003. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. *Mutation Research*, 543, 18.
- JONES, K. E., PATEL, N. G., LEVY, M. A., STOREYGARD, A., BALK, D., GITTLEMAN, J. L. & DASZAK, P. 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451, 5.
- JOUGLARD, S. D., SIMIONATTO, S., SEIXAS, F. K., NASSI, F. L. & DELLAGOSTIN, O. A. 2006. Nested polymerase chain reaction for detection of pathogenic leptospire. *Can J Microbiol*, 52, 747-52.
- KENNEDY, S., KUIKEN, T., JEPSON, P. D., DEAVILLE, R., FORSYTH, M., BARRETT, T., VAN DE BILDT, M. W. G., OSTERHAUS, A. D. M. E., EYBATOV, T., DUCK, C., KYDYRMANOV, A., MITROFANOV, I. & WILSON, S. 2002. Mass die-off of Caspian seals caused by canine distemper virus. *Emerging Infectious Diseases*, 6, 3.
- KENNEDY, S. & OSWALD, N. 2011. *PCR troubleshooting and optimization : the essential guide*, Norfolk, UK, British Library Cataloging.
- KHAN, G., KANGRO, H. O., COATES, P. J. & HEATH, R. B. 1991. Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA. *Journal of clinical Pathology*, 44, 7.
- KLAUSEGGER, A., HELL, M., BERGER, A., ZINOBER, K., BAIER, S., JONES, N., SPERL, W. & KOFLER, B. 1999. Gram type-specific broad-range PCR amplification for rapid detection of 62 pathogenic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 3.
- KO, A. I., GOARANT, C. & PICARDEAU, M. 2009. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol*, 7, 736-47.
- KRAVCHENKO, A. V., CHETVERINA, E. V. & CHETVERIN, A. B. 2006. Preservation of nucleic acid integrity in guanidine thiocyanate lysates of whole blood. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 32, 5.
- LAFFERTY, K. D. & GERBER, L. R. 2002. Good medicine for conservation biology: the intersection of epidemiology and conservation theory. *Conservation Biology*, 16, 12.
- LANDI, M. & CAPORASO, N. 1997. Sample collection, processing and storage in: Toniolo P., Boffeta P, Shuker DEG, et al. *In: CANCER*, I. A. F. R. O. (ed.). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- LE BOEUF, B. J. & MESNICK, S. 1990. Sexual behavior of male Northern Elephant Seal: I. lethal injuries to adult females *Behaviour*, 116, 19.
- LE BOEUF, B. J. & ORTIZ, C. L. 1977. Composition of elephant seal milk. *Journal of mammalogy*, 58, 2.

- LE BOEUF, J. & LAWS, R. M. 1994. *Elephant Seals: Population Ecology, Behavior, and Physiology*, Berkeley: University of California Press.
- LEENDERTZ, F. H., PAULI, G., MAETZ-RENSING, K., BOARDMAN, W., NUNN, C., ELLERBROK, H., JENSEN, S. A., JUNGLEN, S. & BOESCH, C. 2006. Pathogens as drivers of population declines: The importance of systematic monitoring in great apes and other threatened mammals. *Biological Conservation*, 131, 13.
- LEVETT, P. N. 2001. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14, 296-326.
- LEVETT, P. N. 2007. Sequence-based typing of *Leptospira*: epidemiology in the genomic era. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 1, 2.
- LIPSCOMB, T. P. F., SCHULMAN, Y., MOFFETT, D. & KENNEDY, S. 1994. Morbilliviral disease in Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the 1987-1988 epizootic. *Journal of Wildlife Diseases*, 30, 5.
- LUCCHESI, P. M. A., ARROYO, G. H., ETCHEVERRÍA, A. I., PARMA, A. E. & SEIJO, A. C. 2004. Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by PCR. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 37, 131-134.
- LLOYD-SMITH, GREIG, D. J., HIETALA, S., GHNEIM, G. S., LAUREN, P., LEGER, J. S., GRENFELL, B. T. & GULLAND, F. M. D. 2007. Cyclical changes in seroprevalence of leptospirosis in California sea lions: endemic and epidemic disease in one host species? *BMC Infectious Diseases*, 7, 11.
- MACKERETH, G., WEBB, K., O'KEEFE, J., DUIGNAN, P. & KITTELBERGER, R. 2005. Serological survey of pre-weaned New Zealand fur seals (*Arctocephalus forsteri*) for brucellosis and leptospirosis. *New Zealand Veterinary Journal*, 53, 5.
- MELLINK, E. 1993. Biological conservation of Isla de Cedros, Baja California, Mexico: assessing multiple threats. *Biodiversity and Conservation*, 2, 8.
- MONAHAN, A. M., MILLER, I. S. & NALLY, J. E. 2008. Leptospirosis: risk during recreational activities. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 9.
- MORSE, S. S. 1995. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases*, 1, 9.
- MYERS, M. 2008. Leptospirosis humana: guía para el diagnóstico, vigilancia y control. *Organización Mundial de la Salud; traducción del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa*. Rio de Janeiro.
- NASSI, F., KÖMMLING SEIXAS, F., DORNELES JOUGLARD, S. D., SIMIONATTO, S., SILVA, E. F., SEYFFERT, N., BROD, C. S. & DELLAGOSTIN, O. A. 2003. Leptospirosis diagnosis using nested-PCR. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34, 3.
- NYMO, I. H., TRYLAND, M. & GODFROID, J. 2011. A review of *Brucella* infection in marine mammals, with special emphasis on *Brucella pinnipedialis* in the hooded seal (*Cystophora cristata*). *Veterinary Research*, 42, 13.
- PALANIAPPANA, R. U. M., CHANGA, Y.-F., CHANGA, C.-F., PANB, M. J., YANGC, C. W., HARPENDINGA, P., MCDONOUGH, S. P., DUBOVIA, E., DIVERSA, T., QUD, J. & ROED, B. 2005. Evaluation of lig-based

- conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospire. *Molecular and Cellular Probes*, 19, 10.
- REITER, J., STINSON, N. L. & LE BOEUF, B. J. 1978. Northern elephant seal development: the transition from weaning to nutritional independence. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 3, 31.
- RZEDOWSKI, J. 1978. *Vegetación de México*, México, Limusa.
- SANTAMARÍA, E., PONCE, N., PUERTA, C. & FERRO, C. 2005. Validación de la PCR en la detección de parásitos de leishmania (*viannia*) spp. en lutzomyia (díptera: Psychodidae), como vectores. *Biomedica*, 25, 10.
- SANVITO, S., GALIMBERTI, F., DELAHUNTY, K. & MCKAY, D. 2004. Blood spots in pinnipedia hormone studies: measure of cortisol levels in Southern Elephant Seals (*Mirounga leonina*). *Aquatic Mammals*, 30, 6.
- SMITH, A., BROWN, R. J., SKILLING, D. E., BRAY, H. L. & KEYES, M. C. 1977. Naturally occurring Leptospirosis in northern fur seals (*Callorhinus ursinus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 13, 5.
- SMITH, K. F., ACEVEDO-WHITEHOUSE, K. & PEDERSEN, A. B. 2009. The role of infections diseases in biological conservation. *Animal Conservation*, 12, 1-12.
- STAMPER, M. A., GULLAND, F. M. & SPRAKER, T. 1998. Leptospirosis in rehabilitated Pacific harbor seals from California. *J Wildl Dis*, 34, 407-410.
- STEVENS, A. & LOWE, J. 2001. Texto y atlas de anatomía patológica. In: ELSEVIER (ed.) 2a ed. Madrid, España: Harcourt.
- SUGATHAN, S. & VARGHESE, T. 2005. Multiplex PCR on leptospiral isolates from Kolenchery, Kerala, India. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 23, 2.
- TAPIA-VÁZQUEZ, O.-M., MONTES-PÉREZ, M.-I., INDA-PRESICHI, E. A. & RODARTE-VENEGAS, D. 2008. Manual para el Curso Teórico Práctico de Histología. Ensenada, Baja California: Documento de la clase de Histología, Fac. Ciencias, UABC.
- THAIPADUNGPANIT J, WUTHIEKANUN V, CHIERAKUL W, SMYTHE LD, PETKANCHANAPONG W, LIMPAIBOON, R., APIWATANAPORN, A., SLACK, A. T., SUPUTTAMONGKOL, Y., WHITE, N. J., FEIL, E. J., DAY, N. P. J. & PEACOCK, S. J. 2007. A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated with an outbreak of human leptospirosis in Thailand. *PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES*, 1, 6.
- VADO-SOLÍS, I., CÁRDENAS-MARRUFO, M. F., JIMÉNEZ-DELGADILLO, B., ALZANA-LÓPEZ, A., LAVIADA-MOLINA, H., SUAREZ-SOLÍS, V. & ZAVALA-VELÁZQUEZ, J. E. 2002. Clinical-epidemiological study of leptospirosis in humans and reservoirs in Yucatán, México. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 44, 6.
- VALIERE, N. & TABLERLET, P. 2000. Urine collected in the field as a source of DNA for species and individual identification. *Molecular Ecology* 9, 3.

- VAN LOVEREN, H., ROSS, P. S., OSTERHAUS, A. D. M. E. & VOS, J. G. 2000. Contaminant-induced immunosuppression and mass mortalities among harbor seals. *Toxicology Letters*, 112, 6.
- VEDROS, N., SMITH, A., SCHONEWALD, J., MIGAKI, G. & HUBBARD, R. 1971. Leptospirosis epizootic among California sea lions. *Science*, 172, 2.
- VIJAYACHARI, P., SUGUNAN, A. & SHRIRAM, A. 2008. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *Journal of Biosciences*, 33, 557-569.
- VOS, J. G., BOSSART, G. D., FOURNIER, M. & O'SHEA, T. 2003. Toxicology of Marine Mammals. In: GARDNER, D. E., HAYES, A. W. & THOMAS, J. A. (eds.) *New Perspectives: Toxicology and the Environment*. London: Taylor & Francis.
- WHATMORE, A., DAWSON, M. C., GROUSSAUD, P., KOYLASS, M. S., KING, A., SHANKSTER, S. J., SOHN, A. H., PROBERT, W. S. & MCDONALD, W. L. 2008. Marine mammal brucella genotype associated with zoonotic infection. *Emerging Infectious Diseases*, 14, 2.
- WILLIAMS E. S., Y. T., ARTOIS M., FISCHER J., HAIGH S. A. 2002. Emerging infectious diseases in wildlife. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 1, 19.
- WOLFE, N. D., DUNAVAN, C. P. & DIAMOND, J. 2007. Origins of major human infectious diseases. *Nature*, 447, 5.
- ZHELUDKOV, M. M. & TSIRELSON, L. E. 2010. Reservoirs of Brucella infection in nature. *Biology Bulletin*, 37, 8.
- ZUERNER, R. L. 2005. Laboratory maintenance of pathogenic *Leptospira*. *Current Protocols in Microbiology*. Iowa, USA.
- ZUERNER, R. L., CAMERON, C. E., RAVERTY, S., ROBINSON, J., COLEGROVE, K. M., NORMAN, S. A., LAMBOURN, D., JEFFRIES, S., ALT, D. P. & GULLAND, F. 2009. Geographical dissemination of *Leptospira interrogans* serovar Pomona during seasonal migration of California sea lions. *Vet Microbiol*, 137, 105-10.

10. ANEXOS

10.1 Trabajo de campo

10.1.1 Marcaje de los animales

Con una solución de peróxido se escribió una clave que permite distinguir al animal muestreado, usando letras ó números pintadas en los costados y en la parte posterior de la zona dorsal a través de polvo decolorante activado con peróxido. Este tipo de marca es temporal por lo que se pierde durante la muda.

También se usaron marcas plásticas con código de letras y números (Dalton Jumbo Rototag®), normalmente usada para marcar vacas, en ambas aletas caudales. Este tipo de marca es permanente, y permite el reconocimiento de una temporada a la otra.

10.1.2 Muestreo de orina y sangre en *Mirunga angustirostris*

Para evitar contacto con fluidos de los animales y reducir el riesgo de mordidas se usaron un overol de trabajo, zapatos pesados, rodilleras, dos guantes de nitrilo por mano, y guantes de trabajo.

En una caja fácil de transportar se colocó el material y los tratamientos a usar, y se transportaban dos hieleras, en una se colocó gel frío (hielo reusable, blue hicc) y una gradilla para guardar las muestras de orina y sangre con anticoagulante, evitando el contacto directo con el gel frío y en la segunda solo una gradilla para colocar las muestras de sangre sin anticoagulante.

El material que se usó independientemente de la muestra que se tomó fue:

- Esponjitas desinfectantes (limpiar los guantes de sangre u orina para evitar contaminar las muestras)
- Guantes nitrilo (protección personal)
- 2 Hieleras (transportar muestras al campo, una con gel frío y otra vacía)
- Plumones indelebles (marcar muestras)
- Cuaderno y plumas (palm, archivo de muestras)
- Caja con divisiones (para guardar el material)
- Gel frío (mantener la temperatura de la hielera por debajo de 15°)
- Gradilla (para colocar las muestras en posición vertical)
- Bolsa de tela de 1m (bozal, para manejar al animal)
- Bolsas Ziploc® (para la basura)

En una caja fácil de transportar se colocó el material y los tratamientos a usar y en una hielera se colocaron el gel frío y la gradilla para guardar las muestras sin contacto directo con el gel frío.

Recolecta de orina

El siguiente fue el material usado para recolectar orina:

- Vasos desechables de plástico de tamaños diferentes
- Pipetas graduadas de plástico de 3mL
- Pipetas graduadas de plástico de 1.5mL
- Tubos Falcon de 15mL vacíos
- Tubos Falcon de 15mL con soluciones conservadoras
- Tubos Falcon de 50mL

Se necesitaron al menos dos personas expertas para manejar al destetado y recolectar las muestras. Se eligieron destetados no muy acerca de los harenes para evitar molestias durante la manipulación.

Para inmovilizar al destetado, se utilizó una bolsa de lona en forma cónica con un diámetro aproximado de 1.40m, 70cm de alto y un orificio en el extremo superior de 10 cm de diámetro. La bolsa es manejada por un operador experto. El destetado fue enfundado en la bolsa desde la cabeza hasta medio cuerpo, con las aletas anteriores dentro con el fin de bloquearlas. Posteriormente, se colocó al destetado en posición de cúbito dorsal. En esta fase se pone un cuidado especial en la cabeza del destetado para que no se golpee con alguna roca.

Con el destetado sobre su dorso, se limpió la zona del orificio uretral de arena o tierra y se sostuvo el vaso de 60mL al lado del orificio durante 20 segundos aproximadamente. Si el destetado no orinaba, se le daba un masaje firme sobre el vientre con dirección antero-posterior, presionando suavemente alrededor del orificio uretral. La orina fue pipeteada en los tubos con los diferentes tratamientos, y cada alícuota se marcó con una clave alfa numérica que indique el tipo y el número serial de la muestra, la fecha y el lugar de recolecta. Cada alícuota se colocó dentro de la hielera procurando que ninguna muestra estuviera en contacto directo con la bolsa del gel frío.

Al llegar al campamento algunas muestras se colocaron dentro de hieleras con hielo para mantener baja la temperatura y algunas se guardaron a temperatura ambiente. Las muestras con tratamiento que incluye centrifugación (pastilla) se procesaron con el siguiente protocolo:

1. Se centrifugaron los tubos de 5mL durante 10 minutos a 6500 rpm.
2. Se descartó el sobrenadante cuidadosamente con una pipeta de plástico de punta fina, dejando aproximadamente los últimos 300 μ L junto con el pastilla.
3. Se agregó 2 mL de la solución preservadora correspondiente (Tabla 1).
4. Se homogenizó la mezcla invirtiendo varias veces el tubo.
5. Se etiquetó cada tubo.

6. Se guardaron en la bolsa correspondiente al individuo.
7. Se tiraron por el retrete los residuos no peligrosos.
8. Se quemó la basura contaminada, que incluye todo lo que estuvo en contacto con la orina y con químicos peligrosos.

En el laboratorio las muestras se colocaron a -20 °C.

Recolecta de sangre

Las muestras de sangre fueron de dos tipos, las colectadas con anticoagulante (EDTA) para analizarlas con PCR y las que no contenían anticoagulante para analizar el suero con MAT. El siguiente fue el material usado para recolectar sangre:

- Tubos al vacío, Vacutainer®
- Tubos al vacío, Vacutainer® con EDTA
- Agujas
- Campana o adaptador para extracción por vacío

En una aleta posterior se pinchó con la aguja entre los dedos 3^o y 4^o en la parte superior, por encima de la unión de los dedos. Se introdujo el Vacutainer® (tapón morado) con EDTA y se dejó llenar por completo. Se desencajó el tubo de la aguja, se retiró la aguja de la aleta y se presionó con el dedo en la punción para evitar el sangrado. El tubo con sangre se invirtió suavemente para mezclar

perfectamente la sangre con el EDTA. El tubo se marcó y se colocó dentro de la hielera con gel frío dentro de una bolsa de plástico en posición horizontal.

El procedimiento de extracción de sangre para muestras sin anticoagulante es semejante al pasado excepto por que en este caso el Vacutainer® sin anticoagulante (tapón rojo) se dejó llenar hasta $\frac{3}{4}$. Al retirar el tubo con sangre de la aguja se evitó el agitarlo y se marcó y colocó dentro de la hielera que se mantenía a temperatura ambiente. Los tubos se acomodaron de forma vertical sobre una gradilla y se procura no agitar la hielera durante el traslado para evitar la hemólisis de la sangre.

En el campo las muestras fueron procesadas con el siguiente protocolo:

1. Se centrifugaron los Vacutainer® sin anticoagulante durante 10 min a 6500 rpm.
2. Se pipeteó el suero a un tubo Eppendorf de 1.75 mL.
3. Se llenaron todos los tubos posibles por cada muestra tratando de no tomar eritrocitos.
4. Se etiquetó cada tubo con la clave alfa numérica de la muestra que estaba marcada en el Vacutainer®.
5. Se preservaron las muestras en refrigeración hasta el laboratorio.

Una vez en el laboratorio todas las muestras de sangre con EDTA se guardaron a -20° C y las de suero se ultra-centrifugaron durante 15 min a 14000 rpm y se pipeteó el sobre nadante a un nuevo tubo que se etiquetó y guardo en un una caja de unicel, junto con gel refrigerante, perfectamente sellada para así ser enviada a FCVZ, UNAM.

10.1.3 Recolecta de riñón de ratón (*Peromyscus eremicus cedrosensis*).

El siguiente fue el material usado para recolectar riñones:

- Papel secante (limpiar superficies)
- Trampas Sherman
- Avena (cebo para atrapar a los ratones)
- Algodón (evitar el frío)
- Estuche y charola para disección
- Tubos de 1.75 mL con rosca (guardar muestras de ratón)
- Alcohol 95%

La captura de los ratones se hizo con trampas Sherman limpias, sin olor a cloro o detergente, para que los ratones no se alejen. Se colocaron dentro de las trampas un poco de avena cómo cebo y algodón o estropajo para evitar que los ratones mueran de frío. El funcionamiento de cada trampa fue revisado ante de

colocarla. Las trampas se colocaron cerca de arbustos y se bloquearon con piedras. Por cada trampa se tomó la posición GPS, y se marcó el lugar.

Durante la mañana del día siguiente se recolectaron las trampas, se tomaron los ratones, y se sacrificaron con una desarticulación de las vértebras cervicales ó con la inyección de 2 mL de etanol en el corazón. Por medio de una disección se extrajeron ambos riñones de cada ratón y se colocaron en tubos con etanol a temperatura ambiente.

10.1.4 Preparación de soluciones conservadoras

Preparación del equivalente de RNAlater (RNAlater casero)

Nuestra versión del RNAlater se preparó con el como se explica a continuación:

Se pesaron

- 0.93 g EDTA disódico (10 mM)
- 1.84 g Citrato de sodio (25 mM)
- 175 g sulfato de amonio

Una vez pesado lo anterior se agregó a un vaso de precipitados 250 mL de agua destilada. Se colocaron en el agua los reactivos pesados, junto con un agitador magnético. Se dejó en agitación a temperatura ambiente hasta que se los

reactivos fueron completamente desvuelto. Se ajustó el pH a 5.2 usando H_2SO_4 (concentración 1M). Se filtró con una jeringa y guardó en recipientes estériles.

Preparación del equivalente de PB (PB casero)

La versión de PB casero se preparó mezclando los siguientes reactivos y se aforaron a 250 mL con agua destilada

- 119.41 g de clorhidrato de guanidina
- 5 mL de Tris-HCl, pH 6,6 (1M)
- 95 mL de isopropanol

El buffer listo tiene una concentración final de 20mM de Tris-HCl y de 38% de isopropanol. Se filtró (filtros 0.2 μm) y se guardó en tubos Falcon y frascos estériles debidamente etiquetados.

Preparación de GHE (Guanidina-HCl-EDTA)

Se prepararon tres versiones de GHE, la diferencia radicó en la concentración de guanidina. La fórmula de GHE 1 se preparó con concentración de 1M de guanidina-HCl y 0.01M de EDTA usando las siguientes cantidades de los reactivos:

- 0.9306 g de EDTA disódico
- 23.8825 g de guanidina-HCl

Para preparar 250mL de GHE2 con una molaridad final de guanidina-HCl de 2.5M y de EDTA de 0.02M, se pesa lo siguiente:

- 59.71 g de guanidina-HCl
- 1.86 g de EDTA disódico

Para preparar 250mL de GHE3 con una molaridad final de guanidina-HCl de 5M y de EDTA de 0.04M, se pesa lo siguiente:

- 119.41 g de guanidina-HCl
- 3.72 g de EDTA disódico

Los reactivos se mezcla homogenizan en un termoplato a temperatura media con 200mL de agua destilada. Una vez q es homogénea la solución se afora a 250mL y se ajusta el pH a 4.2 se hace pasar por filtros de 0.2 μ m y se esteriliza en autoclave.

Preparación de GLS (Solución lisis de guanidina)

Se prepararon dos concentraciones diferentes de GLS (GLS1 y GLS2), la fórmula GLS1 presentaba una concentración de tiocianato de guanidina de 4M, de Tris-HCl de 50mM (pH7.5) y de EDTA de 25mM, se prepararon 250mL con las cantidades que se describen a continuación:

- 12.5mL de Tris-HCl 1M

- 118.16 g de tiocianato de guanidina
- 2.33 g de EDTA

La fórmula GLS2 presentaba una concentración de tiocianato de guanidina de 4M, de Tris-HCl de 10mM (pH 8), EDTA de 5mM, se prepararon 250 mL con las cantidades que se describen a continuación:

- 2.5mL de Tris-HCl 1M
- 118.16 g de tiocianato de guanidina
- 0.4653 g de EDTA
- 0.625 g SDS
- 1.25 g de citrato de sodio
- 1.33 mL de Triton X-100

En ambas fórmulas se aforaron las soluciones a 250mL, el pH se ajustó a 6 y se filtraron usando filtros de 0.2 μ m, a una fracción de GHE1 y GHE2 se les agregó 1% de β -mercaptoetanol. Los buffers con β -mercaptoetanol se envolvieron en aluminio y se guardaron a 4° C.

10.2 Laboratorio de Microbiología

10.2.1 Preparación de medios de cultivo

Medio EMJH. (1L)

Para preparar este medio toda el agua (reactivos y medio) deberá estar esterilizada por autoclave. Se usan guantes y se trabaja en campana con todo el material estéril. Primero se prepara una base pesando lo siguiente:

- 0.1 g de acetato de sodio anhidro
- 0.2 g de piruvato de sodio
- 1.0 g de fosfato de sodio dibásico anhidro
- 0.1 g de cloruro de sodio
- 0.3 g de fosfato de potasio monobásico

Se agregaron los reactivos a 600 mL de agua destilada estéril con agitación y mientras se agita se le debe de agregar lo siguiente a la base:

- 0.7 mL de cloruro de calcio (0.15g/10mL)
- 1.0mL de sulfato Zinc (0.04g/10mL)
- 1.0mL de sulfato manganeso (0.01 g/10mL)
- 1.0mL tiamina (0.05g/10mL)
- 0.7mL cloruro de magnesio (0.15g/10mL)
- 0.5mL de gliserol 20% (2mL/10mL)
- 0.2mL de vitamina B12 (0.02g/10mL)
- 0.1mL de sulfato cobre (0.03g/10mL)
- 1.0mL de cloruro de amonio (2.5g/10mL)
- 1.0mL de piruvato de sodio (1.0g/10mL)
- 1.0mL de gliserina 10% (1mL/10mL)

Una vez agregado esto se agregan 10.0 g de fracción V de albúmina y se deja agitando hasta que la mezcla sea homogénea. Posteriormente se prepara la solución Tween 80 agregando a 100mL de agua destilada estéril en agitación lo siguiente:

- 0.1 g de sulfato ferroso
- 1.25 mL de Tween 80

Ya que se disuelve completamente se agrega a la base con la solución de albúmina. Toda la mezcla de reactivos debe de estar en agitación cuando se le agregue el Tween 80, al mezclarse se forma una espuma por lo que se debe de hacer lentamente y dejar agitando de una a dos horas. Una vez transcurrido ese tiempo se ajustó el pH dentro del rango de 7.2 a 7.4.

Para esterilizar el medio se hizo pasar por un filtro de 0.65 micras con ayuda de una bomba de vacío, cada vez que se tapó el filtro se que cambió. El mismo medio se pasó por un filtro de 0.45 micras y al finalizar con un filtro de 0.22 micras. El filtrado se repitió dentro de una campana y con un equipo de filtrado estéril, con usan guantes radiados por luz UV. Dentro de la campana se llenaron los viales con 5mL del medio ayudándonos con una jeringa de presión conectada al equipo estéril de filtrado para llenar los viales de 15 mL de vidrio con rosca.

Los viales con medio se incuban a 35°C durante un día para corroborar su esterilidad, si no hay crecimiento se pueden usar para sembrar *Leptospiras spp.* (Zuerner, 2005).

Medio Fletcher. (1L)

Todo el material debe de estar limpio y estéril, para preparar este medio semisólido primeramente se pesó lo siguiente:

- 0.3 g de peptona
- 0.5 g de cloruro de sodio
- 2.0 g de agar
- 0.2 g de extracto de carne
- 3 % de suero de conejo

Excepto el suero de conejo se agregaron a un matraz los reactivos y se adicionaron 900 mL de agua destilada, se esterilizó y cuando la mezcla llegó a 45° o 50° C se le agregó el suero de conejo. Posteriormente se homogenizó y se vació a los tubos estériles con rosca en una campana usando las pipetas estériles. Se hizo una prueba de esterilidad del medio en una estufa a 37°C por 24 horas y posteriormente se refrigeró.

Medio Stuart. (1L)

Este medio de transporte se preparó pesando lo siguiente:

- 0.1 g de cloruro de calcio
- 1.0 g de tioglicolato de Sodio
- 10.0 g de glicerofosfato de Sodio
- 0.002 g azul de Metileno
- 3.0 g agar Bacteriológico

Se colocaron en un matraz de un litro todos los reactivos y se aforó a un litro con agua destilada. Se agitó con un agitador magnético hasta que se homogeneizó y se esterilizó en un autoclave por 15 min. Se dejó enfriar y se vació a frascos estériles con rosca en un ambiente estéril, posteriormente se dejó en refrigeración listo para su uso.

10.2.2 Microaglutinación

Para llevar a cabo las pruebas de microaglutinación se necesita el suero de una muestra sanguínea, solución salina, cultivos de *Leptospira spp.* de diferentes serovaredades y el siguiente material:

- Placa para Elisa
- Micropipeta 100 μ L
- Puntas para micropipeta
- 1 vaso con Cloruro de benzalcohol al 3% (para desinfectar y colocar las puntas sucias)

Centrifugamos el suero a 14,000rpm durante 5min y se pipeteó el sobrenadante a un nuevo Eppendorf, en la placa Elisa se agregaron 50 μ L de solución salina de la fila B a la H y sólo en la fila A se pipeteó 100 μ L suero diluido 1:25. De la fila A se pipetearon 50 μ L a la fila B y de la fila B se pipetean 50 μ L a la fila C para ir diluyendo la concentración del suero hasta la fila G. La fila H funcionó como control por lo que no se le pipeteó suero.

A cada columna de la placa se agregó una serovariedad de bacteria diferente en cultivos de EMJH y se incubó la placa por 1.5hrs a 30°C. Posteriormente se observó al microscopio de campo oscuro a 5X para descartar aglutinaciones en la superficie de la solución.

Tabla XI. Resultados del análisis MAT. Aut: Autumnalis; Bal: Ballum; Bat: Batavie; Bra: Bratislava; Can: Canicola; Cel: Celledoni; Gri: Grippotyphosa; Har: Hardjo; Ict: Icterohaemorrhagiae; Pom: Pomona; Wol: Wolfi; Tar; Tarassovi

No.	Serovariedades y títulos de aglutinación 2010										
	Aut	Bat	Bra	Can	Cel	Gri	Har	Ict	Pom	Wol	Tar
1	-	-	1:20	-	-	-	-	1:40	1:20	1:20	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	1:20	-	-
3	-	-	-	-	-	-	1:20	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	1:80	-	-
5	-	-	1:40	-	-	-	-	-	1:20	1:20	-
6	-	-	-	-	-	-	-	1:20	-	-	-
7	-	-	-	-	-	1:20	-	-	-	1:40	-
8	-	-	-	-	-	1:20	1:20	-	1:20	1:20	-
No.	Serovariedades y títulos de aglutinación 2011										
	Aut	Bat	Bra	Can	Cel	Gri	Har	Ict	Pom	Wol	Tar
9	-	-	1:200	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:400
11	-	-	1:400	-	-	-	-	-	1:50	-	-
12	-	-	1:3200	-	-	-	-	-	-	-	1:3200
13	-	-	1:200	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:3200
15	-	1:200	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	1:400	-	-	1:50	-	-	-	-	-	1:400
17	1:50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	1:50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:200
20	1:50	-	-	-	-	-	1:100	-	-	-	-
21	-	-	1:50	-	-	1:200	-	-	-	-	-
22	-	-	-	1:100	-	-	-	-	-	-	-
23	-	1:50	-	-	1:100	-	-	-	-	-	-
24	-	-	1:100	-	-	-	-	1:200	-	-	-
25	1:50	1:50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	1:200	-	1:50	-	-	-	-	-	-	-
27	-	1:100	1:200	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	1:50	-	-	-	-	-	-	-

10.2.3 Extracción DNA: Tiocianato de guanidina

Esta extracción se usó para extraer ADN a partir de cultivos de *Leptospira spp.* en medio EMJH Para iniciar se prepararon las siguientes soluciones:

Lisis 30 mL: Tiocianato de guanidina/EDTA/Sarcosil solution (5M,0.1M y 0.5%P/V):

- 8.86 g de Tiocianato de Guanidina en 20 mL de agua destilada
- 1.17 g de EDTA
- 0.15 g de Sarcosil y aforar a 30 mL con agua destilada

Acetato de amonio 20mL: se agregó lo siguiente y se aforó a 20 mL con agua destilada.

- 11.41 g de acetato de amonio

Cloroformo : alcohol isoamílico 24:1

- 144 mL de cloroformo
- 6 mL de alcohol isoamílico

Se centrifugaron 100 mL de cultivo EMJH a 16,000 G (mínimo) durante 30 minutos y se lavaron los botones (pastillas) con PBS pH 7.2-7.4, tres veces. El sobrenadante se decantó y se agregó 1,100 µl de solución de lisis. Se mezcló du-

rante 5 minutos invirtiendo continuamente y se agregó 500 µl de acetato de amonio, posteriormente se mezcló invirtiendo 10 veces y se incubó en hielo durante diez minutos.

De la mezcla se transfirieron 600 µl de la mezcla a tubos nuevos de plástico (3 o 4 tubos Eppendorf de 1.5 o 2 mL) y se agregó a cada uno 250 µl de cloroformo:alcohol isoamilico (24:1), se mezcló con un agitador durante cinco minutos, se centrifugó a 10,000 G durante 5 minutos y se transfirió la fase acuosa (sobrenadante) a un tubo nuevo. A cada uno de éstos tubos se le agregó 250 µl de cloroformo:alcohol isoamilico y se homogeneizó durante 5 minutos, se repitió la centrifugación y el pipeteo del sobrenadante, al que se le agregaron 750 µl de etanol absoluto. La nueva mezcla se homogenizó invirtiendo suavemente de cinco a diez veces hasta que se observó la precipitación del ADN, se centrifugó 10,000 G durante 10 minutos y se decantó el líquido dejando el botón de ADN en los tubos.

El ADN se lavó con 1 mL de etanol al 70% y se centrifugó a 10,000 G durante 10 minutos, el etanol se decantó y se dejó secar el ADN (aproximadamente de dos a tres horas) a temperatura ambiente. Para finalizar se resuspendió el ADN de cada tubo en 1 mL de buffer AE de Qiagen y se calentó a 50°C durante 30 min.

10.2.4 Extracción DNA de cultivo de bacterias: Kit Qiagen®

La extracción se hizo usando el protocolo para cultivo de bacterias del kit, a partir de 100 mL de medio EMJH. Lo único que fue necesario preparar es un vaso con cloruro de benzalcohol al 3%. Primeramente se centrifugaron a 11700rpm durante 30min en tubos Nalgene, aproximadamente 30 mL por cada tubo, se decantó el medio cuidando siempre que el botón no se moviera y se agregaron 360 μ L de buffer ATL y 40 de proteasa se homogenizó y se agregó 200 μ L de buffer AL y se incubó a 70°C durante 10min.

Pasado ese tiempo se agregaron 200 μ L de etanol y se dió vortex 15seg, se hizo pasar la mitad del volumen final por dos columnas del kit (una para cada mitad) y se centrifugaron a 8000rpm durante 1min. Se lavó cada columna con 500 μ L de AW1 y se centrifugó a 8000rpm durante 1min, se repitió lo anterior con AW2 y centrifugó 14,000rpm durante 3min. Se hicieron al menos 2 eluciones por columna, la primera de 200 μ L y la segunda de 100 μ L incubando a temperatura ambiente 2min para posteriormente centrifugar a 8000rpm durante 1min.

10.3 Laboratorio de Histología

10.3.1 Técnica de deshidratación para riñón

Para deshidratar las muestras de riñón, solo se cortaron trozos de 1 cm² y medio cm de espesor, se colocaron dentro de un cassette debidamente marcado y se agregaron a una jarra de histoquinet que contenía las siguientes soluciones:

- Alcohol al 70%.....1 hr
- Alcohol al 96%.....1 hr
- Alcohol al 96%.....1 hr
- Alcohol al 96%.....2 hr
- Alcohol al 100%.....1 hr
- Alcohol al 100%.....1 hr
- Alcohol al 100%.....2 hrs
- Alcohol-Benceno3 hrs
- Benceno.....2 hrs
- Benceno.....2 hrs
- Parafina- Benceno.....3 hrs
- Benceno.....4 hrs (55-57° C)

Una vez concluido el tiempo en cada solución se incorporó la muestra de tejido en un cubo de parafina usando un incluidor y se etiquetó el cubo con la clave que indicaba que tejido tenía.

10.3.2 Técnica de corte y desparafinación

Una vez incluida la muestra, se prosiguió a cortar y desparafinar, se trabajó con un micrótopo y un baño maría a 45° C. Se hicieron cortes de cinco y tres micras y se extendieron con alcohol al 96% sobre un portaobjetos, los cortes se colocaron sobre el baño maría con gelatina unos segundos y se retomaron con el portaobjetos. Se dejaron secar los portaobjetos sobre una plancha de secado a temperatura media y posteriormente se desparafinaron con el siguiente tren de reactivos y tiempos:

- Xileno 100%.....20 min.
- Xileno 100%.....20 min.
- Alcohol al 96%.....10 min.
- Alcohol al 80%.....10 min.
- Alcohol al 70%.....10 min.
- Alcohol al 40%.....10 min.
- Alcohol al 25%.....10 min.
- Agua formolada.....el tiempo que sea necesario

10.3.3 Técnicas de tinción Histológica

Tinción de Warthing Starry

Las tinciones se hicieron en cajas copplin por cada cinco portaobjetos, fue necesario preparar las siguientes soluciones:

5M ácido acético (stock)	Walpole´s buffer
Ácido acético glacial.....11.8mL	5M ácido acético.....17.6mL
Agua desionizada.....1000.0mL	5M acetato de sodio.....2.4mL
	Agua desionizada.....280mL
5M acetato de sodio (stock)	Nitrato de plata 2%
Acetato de sodio.....16.4mg	Nitrato de plata.....2g
Agua desionizada.....1000.0mL	Walpole´s buffer.....100mL
Nitrato de plata 1%	Hidroquinona 3%
Nitrato de plata.....1g	Hidroquinona.....3g
Walpole´s buffer.....100mL	Walpole´s buffer.....100mL
Gelatina 5%	Promotor
Gelatina5g	2% Nitrato de plata.....1.5mL
Walpole´s buffer.....100mL	Gelatina.....7.5mL
	3% hidroquinona.....0.5mL

Se tomaron las muestras del agua formolada y se hidrataron con agua desionizada, se enjuagaron con buffer Walpone. En una caja copplin se llenó a $\frac{3}{4}$ con con nitrato de plata al 1% y se calentó un minuto y medio a temperatura media.(microondas 600Wats Sharp Carrusel II), inmediatamente se colocaron las los portaobjetos con los cortes en la caja durante 5 min. Pasado ese tiempo se enjuagó con buffer Walpone cada portaobjetos y se inundaron en el promotor, preparado 5 min. antes de usarse. Se lavaron con agua destilada y se deshidrataron en dos cambios de alcohol al 95% y dos de alcohol absoluto, se pasaron por xileno y se montaron con resina.

Tinción Tricrómica de Gallego

Las tinciones se hicieron en cajas copplin por cada cinco portaobjetos, fue necesario preparar las siguientes soluciones:

Fucsina acética	Formol acético
Agua destilada.....10 mL	Agua destilada.....10mL
Fucsina fenicada.....10 gotas	Formol 100%.....2 gotas
Ácido acético..... 1 gota	Ácido acético.....1 gota

Pícro índigo carmín

Carmín índigo al 1%.....1 parte

Ácido acético.....2 partes

Las muestras se toman del agua formolada por lo menos dos horas antes de efectuar la coloración, se pasaron a fucsina básica durante dos minutos, se lavaron con agua destilada y se colocaron en formol acético durante cinco minutos. Se lavaron perfectamente en agua destilada y se dejaron durante un minuto en pícro índigo carmín, éste colorante se lavó con alcohol pícrico dos veces durante un minuto cada vez. y se hizo un cambio rápido a alcohol absoluto, posteriormente se dejó tres minutos en alcohol absoluto-xileno durante dos ocasiones y en xileno tres veces, por tres minutos cada vez. Para finalizar evitando que la muestra se seque, rápidamente se monta con resina sintética.

Tinción de Wright

Las tinciones se hicieron en cajas copplin por cada cinco portaobjetos, fue necesario preparar las siguientes soluciones:

Sol. A	Sol. B
Agua destilada.....500 mL	Agua destilada.....500 mL
Sulfato de sodio monobásico...4.49 g	Sulfato de sodio dibásico.....4.75

Primero se mezcla la solución buffer con 497.07 mL de sol. A y 489.18 mL de sol. B, se inunda el portaobjetos con las muestras con 10 gotas de colorante Wright durante 6 minutos. Pasado ese tiempo se agregaron 10 gotas de solución buffer sobre el colorante y se esperaron 6 minutos más, las muestras se lavaron varias veces con agua destilada y se dejaron secar en un lugar sin polvo.

Tinción de Hematoxilina - Eosina

Las tinciones se hicieron en cajas copplin por cada cinco portaobjetos, fue necesario preparar las siguientes soluciones:

Soluciones

Hematoxilina	Eosina
Hematoxilina cristalizada.....1 g	Eosina.....1 g
Alcohol etílico absoluto.....10 mL	Agua destilada.....100 mL
Alumbre de potasio.....20 g	Orange G.....0.5 g
Óxido rojo de mercurio.....0.5 g	
Agua destilada.....200 mL	

Las muestras del tejido se dejaron en una caja con hematoxilina durante 1 min. y se lavaron con agua hasta eliminar el exceso de colorante. Se diferenció en alcohol ácido rápidamente hasta obtener una coloración rosa y se lavaron tres veces en agua agitando. Las muestras se viraron en hasta que cambiaron a una coloración azul y se lavaron en agua corriente de la llave durante 1 min. y posteriormente en agua destilada tres veces. Las muestras se cambiaron a una caja con eosina durante 1 min. y se les hicieron tres cambios de alcohol etílico, cada uno de tres min., dos de alcohol absoluto xileno de tres minutos cada uno y tres de xileno de cinco minutos cada vez, o hasta que se dejó de observar agua. Se montaron igualmente con resina sintética.