

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE  
ENSENADA**

**DIVISIÓN DE OCEANOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA MARINA**

**INCIDENCIA DE LEPTOSPIROSIS EN CRIAS DE *Zalophus californianus*  
*californianus* EN SIETE COLONIAS REPRODUCTIVAS DEL GOLFO DE  
CALIFORNIA DURANTE LA TEMPORADA REPRODUCTIVA DEL 2000.**

**TESIS**

**que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
MAESTRA EN CIENCIAS presenta:**

**KARINA ALETHYA ACEVEDO WHITEHOUSE**

**Ensenada, Baja California, México. Mayo de 2001**

**RESUMEN** de la tesis de **KARINA ALETHYA ACEVEDO WHITEHOUSE**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de **MAESTRA EN CIENCIAS en ECOLOGÍA MARINA**. Ensenada, Baja California, México. Mayo de 2001.

**INCIDENCIA DE LEPTOSPIROSIS EN CRIAS DE *Zalophus californianus californianus* EN SIETE COLONIAS REPRODUCTIVAS DEL GOLFO DE CALIFORNIA DURANTE LA TEMPORADA REPRODUCTIVA DE 2000.**

Resumen aprobado por:

---

Dr. Horacio de la Cueva Salcedo  
Director de Tesis

Se determinó la incidencia de leptospirosis en crías de *Zalophus c. californianus* en siete colonias reproductivas del Golfo de California. Esta fue del 40% en San Pedro Mártir, 13.33% en San Esteban, 30% en Roca Blanca, 36.36% en Los Machos, 25% en Granito y 15% en Los Cantiles; no se detectó leptospirosis en Los Islotes. Durante la temporada reproductiva del año 2000 se obtuvieron 42 muestras de orina y 96 muestras de sangre y suero de crías de *Z. c. californianus*. Se determinó la seroprevalencia de anticuerpos contra 13 serovariedades de *Leptospira interrogans* mediante la prueba de microaglutinación (MAT) y se detectó la presencia de *L. interrogans* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las crías con títulos de anticuerpos  $\geq 1:50$  y aquellas que en orina, sangre o suero mostraron productos de PCR de 115 pb se consideraron positivas. La seroprevalencia de anticuerpos contra *L. interrogans* fue del 54.16%, con una mayor seroprevalencia contra la serovariedad cynopteri (50%). 66.66% de las crías positivas presentaron títulos de anticuerpos  $\geq 1:50$  contra cynopteri. Se observaron fragmentos de 115 pb en 2/42 muestras de orina, 6/96 muestras de sangre y 1/96 muestras de suero. Mediante pruebas de Kruskal-Wallis ( $\alpha=0.05$ ) se determinó que la incidencia de leptospirosis era significativamente diferente por colonia. Una prueba de  $\chi^2$  que consideró la incidencia de leptospirosis, la seroprevalencia de anticuerpos contra *L. interrogans*, el sexo y el peso de la cría como datos dicotómicos nominales no rechazó la independencia de estos factores. La alta seroprevalencia de anticuerpos (54.16%) encontrada durante este trabajo, así como la ausencia de crías con signos clínicos sugerentes de la enfermedad y la falta de reportes recientes de un incremento en las tasas de mortalidad son indicativas de eventos enzoóticos ocasionados por serovariedades de *L. interrogans* adaptadas a *Z. c. californianus*. El hacinamiento en las colonias, presencia de murciélagos y roedores y la posibilidad de presencia de leptospirosis patógenas en presas consumidas por *Z. c. californianus* pueden explicar la presencia de *L. interrogans* y algunas de las diferencias en la incidencia de leptospirosis y seroprevalencia de anticuerpos contra *L. interrogans* por colonia. Los resultados encontrados son representativos de la población de crías de *Z. c. californianus* de cada colonia e, indirectamente, de la prevalencia de leptospirosis en la población adulta de *Z. c. californianus* en el Golfo de California.

Palabras clave: Leptospirosis, *Zalophus californianus*, *Leptospira interrogans* cynopteri, ecología de enfermedades.

ABSTRACT of the thesis of Karina Alethya Acevedo Whitehouse, presented as partial requirement to obtain the MASTER of SCIENCE grade in MARINE ECOLOGY. Ensenada, Baja California, Mexico. May 2001.

**INCIDENCE OF LEPTOSPIROSIS IN *Zalophus californianus californianus* PUPS FROM SEVEN REPRODUCTIVE ROOKERIES OF THE GULF OF CALIFORNIA DURING THE 2000 REPRODUCTIVE SEASON.**

**ABSTRACT**

The incidence of leptospirosis in *Zalophus c. californianus* pups from seven reproductive rookeries from the Gulf of California was 40% in San Pedro Mártir, 13.33% in San Esteban, 30% in Roca Blanca, 36.36% in Los Machos, 25% in Granito and 15% in Los Cantiles; leptospirosis was not detected in Los Islotes. Forty-two urine and 96 blood and serum samples were obtained from sea lion pups during the 2000 reproductive season. Antibody seroprevalence to 13 serovars of *Leptospira interrogans* was determined by microagglutination assays (MAT); presence of *L. interrogans* was detected by polymerase chain reaction (PCR). Pups with serum titers  $\geq 1:50$  and samples that showed 115 bp bands on ethidium bromide-stained 1.5% agarose gels were considered positive. Antibody seroprevalence was 54.16% with a highest prevalence against serovar cynopteri (50%). 66.66% of the positive pups had titers  $\geq 1:50$  against serovar cynopteri. PCR products were observed in 2/42 urine samples, 6/96 blood samples and 1/96 serum samples. Leptospire presence in blood and serum was demonstrated in pups that were seronegative. Kruskal-Wallis tests and corresponding *a posteriori* tests ( $\alpha=0.05$ ) showed that the incidence of leptospirosis was significantly different in all rookeries. A  $\chi^2$  test that considered the incidence of leptospirosis, sex and weight of the pup as dichotomous nominal values did not reject the independence of these factors. The high prevalence of antibodies, 54.16%, as well as the absence of pups showing clinical signs indicative of the disease and the lack of recent reports on increased mortality rate of sea lions at the Gulf of California are suggestive of enzootic events caused by host-adapted serovars. Crowding in rookeries, presence of bats and rodents in some of the islands, and the possible presence of pathogenic leptospire in prey consumed by *Z. c. californianus* may explain the presence of *L. interrogans* and some of the differences in the incidence of leptospirosis and antibody prevalence against *L. interrogans* amongst reproductive rookeries. These results are representative of the incidence of leptospirosis of sea lion pups in each rookery and, indirectly, of the prevalence of leptospirosis in the adult population of *Z. c. californianus* in the Gulf of California.

Keywords: leptospirosis, *Zalophus californianus*, *Leptospira interrogans* cynopteri, disease ecology.

## DEDICATORIA

A Fausto, por encontrarme y dejarse encontrar en este camino de coincidencias y magia,  
*Por ser amor, cómplice y todo...mucho más que dos. Esto es para ti y para lo que somos juntos.*

A mis padres, por compartir conmigo sus vidas enseñándome tantas cosas y alentándome siempre a seguir adelante, *Ma: It was all a question of letting go. Thank you for trusting and believing in me, I love you; Tat, todo ha valido la pena, te quiero y admiro muchísimo.*

A la alquimia que ha nutrido mi vida de tantas formas...y a la suerte, que siempre es importante.

## AGRADECIMIENTOS

**Es mucha la gente que ha participado de alguna u otra manera en la realización de este proyecto. Con la certeza de omitir algún nombre por característica distracción, les agradezco a todos:**

- CONACyT, por su apoyo sin el cual no hubiera sido posible mi estancia en Ensenada ni la realización del posgrado.
- Dr. Horacio de la Cueva, por desafiar mis creencias y conocimientos y por aderezar la ciencia con humor, amistad y capuccinos: *voy a extrañarte mucho, incluso la música "peligrosa"*.
- Mis sinodales: Drs. Frances Gulland, Eric Mellink, Elizabeth Ponce y David Auriolos por sus valiosos comentarios y cuestionamientos.
- Dr. Jorge de la Rosa, por darme espacio en su laboratorio y por permitirme utilizar su equipo.
- ICMME, por prestarme material en momentos de angustia antes del crucero.
- El equipo de trabajo de la embarcación "El Amigo": David, Pancho, Dulce: *gracias por tu amistad y por creer en mi*, Gretel (*el queridísimo monstruo*), Osvaldo y Ciro.
- Fausto Arellano, por su paciencia y abrazos de fortaleza en momentos de desesperación, por su apoyo y por siempre saber hacerme sonreír...y por convencerme de utilizar técnicas moleculares en mi tesis.
- Mis amigos y hermanos por desafiar la distancia para siempre estar presentes y llenar mi vida de significados: Yleana, *sister-pigeon, we will always be close*; Lour, *por vivir de realidad y fantasía, por tu fuerza por tu llanto, gracias!*; Ray, Miten y Toño: *Tutti-titini!, son mis hermanos por siempre*; Mirta, *Sigue siempre adelante, amiga, realmente eres grande...todo mi apoyo y cariño*; Andina, *hasta siempre, comandante!...la espiral sigue andando y nosotras en ella*; Maf, *hermana beluga, te quiero mucho y lo sabes*; Tony, *después de un buen susto; muchos abrazos de oso y fortaleza*; Ita, *Un buen 8 de abril y tantas historias que nos faltan...gracias por todo*; Eri y Jorge: *los quiero, los admiro y los extraño*; Paco, *hermanito, todo mi amor y humor*.
- Mis amigos de Ensenada: Gaby, *gracias por esa complicidad y por tu amistad incondicional*; Sam and Debbie, *nothing is coincidental, I am glad you appeared in my life!*; Jamnia, *quizas estemos locas, pero es mucho mas divertido!*, Gerardo, Varinka, Julio, Dahren y Clarissa, *sean cartas, snorkleadas, idas a San Antonio de las minas, pláticas o cualquier cosa que se nos ocurra, siempre disfruto estar con ustedes*; Jessica y Toño, *tocayos de profesión: cuando quieran les cuido la clínica...con todo y gatos!*

## Contenido

I. Introducción	1
II. Antecedentes	4
II.1. Leptospirosis	4
II.1.1. Ecología de la leptospirosis	4
II.1.2. Transmisión y patogenia	6
II.1.3. Respuesta inmune del hospedero	7
II.1.4. Diagnóstico de leptospirosis	8
II.2. Leptospirosis en <i>Zalophus californianus californianus</i>	9
II.3. Generalidades de <i>Zalophus californianus californianus</i>	10
II.3.1. Taxonomía y distribución geográfica	10
II.3.2. Descripción de la especie	11
II.3.3. Biología reproductiva	12
II.4. Población de <i>Zalophus californianus californianus</i> en el Golfo de California	13
II.4.1. Distribución y abundancia	13
II.4.2. Parámetros poblacionales	13
II.4.3. Enfermedades infecciosas	14
III. Objetivos	15
III.1. Objetivo general	15
III.2. Objetivos particulares	15
IV. Materiales y métodos	16
IV.1. Área de estudio	16
IV.1.1. Colonias visitadas	16
IV.2. Colecta de las muestras	19
IV.3. Pozas de agua estancada	19
IV.4. Métodos de análisis	20
IV.4.1. Prueba de microaglutinación (MAT)	20
IV.4.2. Detección de <i>Leptospira interrogans</i> por PCR	21
IV.4.2.1. Extracción de ADN	21
IV.4.2.2. Amplificación de los segmentos de ADN	22
IV.4.2.3. Detección de los productos de la PCR por electroforesis	23
IV.4.3. Incidencia de leptospirosis	24
IV.4.4. Análisis estadísticos	24
V. Resultados	29
V.1. Incidencia de leptospirosis	29
V.2. Seroprevalencia de anticuerpos contra <i>L. interrogans</i>	31
V.3. Pozas de agua estancada	36
VI. Discusión	37
VII. Conclusiones	44
Literatura citada	46

## Lista de figuras

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Colonias reproductivas de <i>Zalophus c. californianus</i> en el Golfo de California.	17
2	Productos de la PCR de 115 pb en muestras de orina, sangre y suero (Carriles 4 a 13) utilizando oligonucleótidos específicos para <i>L. interrogans</i> .	28
3	Incidencia de leptospirosis (%) en las siete colonias reproductivas de <i>Zalophus c. californianus</i> del Golfo de California.	29
4	Porcentaje de reacciones de aglutinación contra las diferentes serovariedades de <i>L. interrogans</i> por colonia reproductiva de <i>Zalophus c. californianus</i> del Golfo de California durante la temporada reproductiva del 2000.	33
5	Seroprevalencia (%) de anticuerpos contra <i>L. interrogans</i> en las siete colonias reproductivas de <i>Zalophus c. californianus</i> del Golfo de California	34

## Lista de cuadros

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
I	Serovariedades de <i>L. interrogans</i> empleadas en las pruebas de MAT para determinación de anticuerpos en crías de <i>Zalophus c. californianus</i> .	20
II	Número de crías positivas a leptospirosis por colonia reproductiva de <i>Zalophus c. californianus</i> del Golfo de California mediante MAT y PCR.	29
III	Seroprevalencia y títulos máximos de anticuerpos contra <i>L. interrogans</i> por colonia reproductiva de <i>Zalophus c. californianus</i> del Golfo de California.	31
IV	Serovariedades de <i>L. interrogans</i> a las que se observaron reacciones de aglutinación por colonia reproductiva de <i>Zalophus c. californianus</i> del Golfo de California.	31
V	Seroprevalencia de anticuerpos contra <i>L. interrogans</i> por intervalos de peso de las crías de <i>Zalophus c. californianus</i> por colonia reproductiva del Golfo de California.	32
VI	Intervalos de temperatura, salinidad y pH del agua de las pozas en las siete colonias reproductivas de <i>Zalophus c. californianus</i> del Golfo de California.	34

## **I. Introducción**

Las enfermedades infecciosas juegan un papel importante en la supervivencia, abundancia y evolución de las especies. Sus efectos en la dinámica de las poblaciones dependen de las interacciones entre los mecanismos de patogenicidad y formas de transmisión del agente etiológico, el estado inmune del organismo hospedero, el grado de influencia de la enfermedad en la mortalidad y la capacidad reproductiva de la población afectada (Anderson y May, 1979; May, 1988).

A pesar de décadas de estudio intensivo sobre los agentes biológicos que conforman a las comunidades marinas, la dinámica de las enfermedades infecciosas y su impacto ecológico y evolutivo en el ecosistema marino no se conocen completamente, aún cuando afectan a especies de importancia económica y ecológica (Harvell *et al.*, 1999). Esta ignorancia es consecuencia de la poca información basal y epidemiológica que permitiría determinar niveles normales, no epidémicos, de infecciones patógenas en las poblaciones marinas susceptibles.

La mortalidad masiva de focas comunes (*Phoca vitulina*) y focas del lago Baikal (*Phoca sibirica*) en 1987 y 1988 atribuidas a una epizootia viral (Dietz *et al.*, 1989; Osterhaus *et al.*, 1989), la alta prevalencia de anticuerpos virales en las poblaciones de fócidos en el mundo (Visser *et al.*, 1993), así como los brotes epizooticos de leptospirosis en lobos marinos de California (*Zalophus californianus californianus*) en las costas de California y Oregon, EEUUA (Vedros *et al.*, 1971; Gulland *et al.*, 1996), han demostrado la vulnerabilidad potencial de estas especies a epidemias infecciosas que pueden ocasionar mortalidades masivas y afectar la abundancia y reproducción de sus poblaciones.

En 1971 se reportó una mortalidad elevada de *Z. c. californianus* en las costas de California y Oregon, EEUUA (Vedros *et al.*, 1971). El evento se atribuyó a un brote de leptospirosis, enfermedad bacteriana ocasionada por la espiroqueta *Leptospira interrogans* que afecta también al humano y a otras especies animales domésticas y silvestres (Faine, 1994; Heath y Johnson, 1994). Desde entonces se han observado en esa región brotes epizooticos con intervalos de presentación de 3 a 4 años de leptospirosis en *Z. c. californianus* durante los meses de otoño y con tasas de mortalidad altas, principalmente de machos juveniles (Gulland *et al.*, 1996).

A pesar de la frecuencia de los casos, aún se desconoce la fuente de infección y los medios de transmisión de la leptospirosis en esta especie (Gulland, 1999). Se ha sugerido, pero no comprobado, que la orina de animales infectados pudiera contaminar las pozas de agua estancada en las colonias (Gulland *et al.*, 1996).

A la fecha no se han reportado brotes de leptospirosis en *Z. c. californianus* en México, aunque algunos hallazgos histopatológicos y clínicos en colonias del Golfo de California sugieren la enfermedad (Acevedo-Whitehouse, 1999; Acevedo-Whitehouse *et al.*, sometido). Un estudio realizado entre 1994 y 1996 en ocho colonias reproductivas del Golfo de California reportó una seroprevalencia del 32% de anticuerpos contra *L. interrogans* en *Z. c. californianus* (Godínez *et al.*, 1999).

La seroprevalencia (proporción de individuos en una población con anticuerpos contra un agente infeccioso) es una medida de la exposición de la población a la enfermedad. Para determinar la presencia activa de leptospirosis es necesario observar un incremento en los títulos de anticuerpos en muestras seriadas o detectar *L. interrogans*,

según la etapa de la enfermedad, en la orina, sangre o suero de los individuos afectados (Heath y Johnson, 1994; Levett, 1999).

*Z. c. californianus* es la especie pinnípeda más abundante y de distribución más amplia en México y la única que habita permanentemente en el Golfo de California (Aurióles-Gamboa *et al.*, 1993). Debido a la importancia ecológica atribuida a esta especie, al impacto que los brotes de leptospirosis puedan tener en su población y al riesgo de transmisión de esta enfermedad a los pescadores locales y turistas que tienen contacto esporádico con los lobos marinos, es importante determinar la prevalencia de leptospirosis en las colonias del Golfo de California.

Para determinar la incidencia de leptospirosis en crías de *Z. c. californianus* en el Golfo de California durante la temporada reproductiva del 2000 como un indicador de la prevalencia en su población y esclarecer fuentes de infección, se colectaron muestras de orina y sangre de crías y agua estancada de siete colonias reproductivas. Se realizaron amplificaciones de ADN por medio del método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para determinar la presencia de *L. interrogans* y pruebas de microaglutinación (MAT) para determinar la seroprevalencia de anticuerpos.

## **II. Antecedentes**

### **II. 1. Leptospirosis**

La leptospirosis es una enfermedad bacteriana, de distribución mundial (Holt *et al.*, 1994) y de incidencia subestimada (Levett, 1999) producida por la espiroqueta *Leptospira interrogans*. Existen reportes de la enfermedad desde hace más de cien años (Levett, 1999) y recientemente ha suscitado interés debido a brotes en poblaciones humanas (Caldas y Sampaio, 1979; Corwin *et al.*, 1990; Meslin, 1997; Rathinam *et al.*, 1997; Chu *et al.*, 1998; Jayaraman, 1998) y de animales silvestres (Vedros *et al.*, 1971; Smith *et al.*, 1977; Dierauf *et al.*, 1985; Gulland *et al.*, 1996).

Las leptospiras son bacterias aerobias obligadas, con forma cilíndrica helicoidal (Carter, 1985) de 0.1  $\mu\text{m}$  de diámetro y 6 a 24  $\mu\text{m}$  de longitud (O' Leary, 1989). Su temperatura óptima de crecimiento y división celular se encuentra entre los 28 y los 30°C; en ambientes líquidos y de alta viscosidad son flexibles y móviles.

Según las características antigénicas de su membrana externa, las leptospiras se clasifican en más de 250 serovariedades (Heath y Johnson, 1994) que se agrupan en 23 serogrupos (Kmety y Dikken, 1993) basados en su grado de reactividad antigénica cruzada (Stallman, 1984).

#### **II.1.1. Ecología de la leptospirosis**

La incidencia de leptospirosis es mayor durante las épocas de lluvia, en ambientes con drenaje deficiente, sitios con suelos húmedos, durante inundaciones y cuando hay una alta densidad de animales portadores y susceptibles (Heath y Johnson, 1994). Las condiciones óptimas para la sobrevivencia de *Leptospira interrogans* son ambientes

cálidos, húmedos y con pH neutro a ligeramente alcalino (Farr, 1995). Son susceptibles a condiciones ambientales adversas como desecación, pH < a 6.8 y > a 7.8 (Alexander, 1982; Topley y Wilsons, 1983; Faine, 1994), así como salinidad mayor a 34.3 ‰ (Michna, 1970). Cuando se exponen a condiciones adversas como hipertonidad pueden generarse formas esféricas no viables (Holt *et al.*, 1994).

Aunque potencialmente todas las serovariedades de *L. interrogans* pueden infectar a todos los mamíferos (Heath y Johnson, 1994) y se han aislado en aves, peces, reptiles, anfibios, artrópodos y otros invertebrados (Babudieri, 1958; Hoeden *et al.*, 1961; Maestrone y Benjaminson, 1962; Kingscote, 1971; Glosser *et al.*, 1974; Maghami *et al.*, 1977; Minette, 1983; Thiermann, 1984; Luna-Alvarez *et al.*, 1996), generalmente cada serovariedad es específica y adaptada a una especie hospedera en la que ocasiona cuadros crónicos asintomáticos o infecciones persistentes de baja mortalidad, abortos o nacimientos de crías débiles, alta seroprevalencia de anticuerpos en la población y eliminación de leptospiras en la orina por largos períodos (Ellis, 1986). Sin embargo, cuando la infección es provocada por una serovariedad no adaptada al hospedero, ocasiona brotes epizooticos severos, baja seroprevalencia de anticuerpos en la población y generalmente las leptospiras son eliminadas en la orina durante períodos cortos agudos con alta mortalidad (Heath y Johnson, 1994).

Se cree que los roedores silvestres son reservorios o portadores asintomáticos que eliminan leptospiras en la orina e infectan a otros individuos de la misma especie lo que permite mantener la enfermedad en el ecosistema (Day *et al.*, 1997). Por este motivo las serovariedades que infectan reservorios se han convertido en las de mayor prevalencia en el mundo y ocasionan infecciones endémicas (Heath y Johnson, 1994).

### **II.1.2. Transmisión y patogenia**

En la mayoría de las especies la transmisión de leptospirosis se da por contacto con orina infectada por *L. interrogans* (Heath y Johnson, 1994). Los organismos infectados llegan a eliminar hasta  $10^5$  leptospiras/ml de orina durante las primeras semanas de infección, aunque se necesitan pocos microorganismos para desencadenar la enfermedad. Las leptospiras eliminadas por la orina pueden sobrevivir y permanecer viables e infecciosas en agua o suelo húmedo hasta por 74 días bajo condiciones de temperatura, pH y salinidad óptimas (Faine, 1994).

Otras formas de transmisión son el contacto sexual (Day *et al.*, 1997), infecciones durante la gestación (Thiermann, 1982), contacto con desechos uterinos o placentarios de animales infectados (Ellis, 1986) y la ingestión de carne contaminada (Babudieri, 1958; Reilly *et al.*, 1968; Reilly, 1970).

Las leptospiras son altamente infecciosas debido a su habilidad para penetrar membranas mucosas intactas (Michna, 1970; Heath y Johnson, 1994). La infección inicia cuando las leptospiras patógenas penetran mediante lesiones en la piel o a través de membranas mucosas. De cuatro a diez días después de la penetración epitelial se produce una diseminación hematológica, lo que propicia la localización y proliferación del microorganismo en órganos parenquimatosos (Carter, 1985). Esta fase leptospirémica dura aproximadamente doce días, dependiendo de la virulencia de la serovariedad infectante y la respuesta del hospedero. Después de la primera semana las leptospiras comienzan a ser eliminadas por la orina por un período que va de semanas a meses (Thiermann, 1984; Farr, 1995).

El grado de lesiones y la tasa de mortalidad dependen de la susceptibilidad del hospedero a las toxinas y enzimas producidas por la serovariedad infectante. Durante infecciones crónicas o subclínicas se presenta mastitis, disminución de la producción láctea, abortos después del tercer mes de gestación, mortinatos, nacimiento de crías débiles e infertilidad (Heath y Johnson, 1994). En las infecciones agudas los animales presentan depresión, fiebre, anorexia, hemorragias generalizadas, anemia hemolítica, insuficiencia hepática y renal, conjuntivitis, mialgia y, a menudo, meningitis (Carter, 1985).

### **II.1.3. Respuesta inmune del hospedero**

Durante la primera fase de la enfermedad se producen anticuerpos IgM contra la membrana externa de las leptospiras, lo cual retarda su crecimiento. Después de algunos días, se producen anticuerpos IgG que lisan a las leptospiras circulantes y permanecen en el torrente sanguíneo aproximadamente 12 meses después de la infección (Heath y Johnson, 1994). El nivel máximo de anticuerpos en los organismos infectados se presenta entre la 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> semana de la enfermedad. Posteriormente declinan estos niveles, pero pueden detectarse durante años (Michna, 1970; Alexander, 1982).

Las leptospiras pueden evadir las respuestas inmunes del hospedero por secuestro en los túbulos renales, lumen uterino o tejidos inmunológicamente protegidos como el cerebro y los ojos. Por este motivo, los organismos infectados por serovariedades adaptadas al hospedero pueden eliminar leptospiras en la orina durante toda su vida. Los hospederos que se restablecen de la infección por una serovariedad desarrollan inmunidad contra la misma serovariedad, pero son susceptibles a infecciones por otras serovariedades (Alexander, 1982).

#### **II.1.4. Diagnóstico de leptospirosis**

La identificación de la bacteria y el diagnóstico de la enfermedad se establece con base en características morfológicas, propiedades antigénicas y análisis moleculares (Carter, 1985; Levett, 1999). El aislamiento de *L. interrogans* en tejidos del huésped infectado no es confiable, ya que depende de la etapa de la enfermedad y la prueba tiene un nivel de éxito bajo (Somerville *et al.*, 1989). Tampoco son concluyentes la demostración del agente etiológico mediante tinciones de rutina para leptospiras ni su determinación por microscopía de campo oscuro, debido a que la concentración de leptospiras en tejidos de organismos infectados usualmente es baja y puede no ser evidenciada con el uso de esas técnicas diagnósticas (Alexander, 1982; Carter, 1985; Holt *et al.*, 1994).

El análisis serológico definitivo de leptospirosis es la microaglutinación (MAT), una prueba que detecta anticuerpos contra la serovariedad infectante. Los títulos de anticuerpos  $\geq 1:10$  indican una exposición previa a *L. interrogans*. Sin embargo, en la mayoría de las especies animales el diagnóstico serológico de leptospirosis se establece con títulos de anticuerpos  $\geq 1:100$  para evitar confundir las reacciones de aglutinación con respuestas vacunales (Faine, 1994; Heath y Johnson, 1994).

Durante las primeras etapas de la enfermedad, los resultados positivos pueden deberse a reacciones cruzadas con otras serovariedades, por lo que es importante corroborar el diagnóstico con técnicas moleculares (Levett, 1999). Cada especie hospedera puede reconocer diferentes epítopes específicos; por lo tanto las reacciones cruzadas pueden presentarse entre serovariedades del mismo serogrupo y entre serogrupos diferentes. Estas reacciones difieren tanto en naturaleza como en intensidad según la especie hospedera (Hanson, 1982; Kingscote, 1986).

El diagnóstico molecular mediante la PCR es útil para la detección de leptospiras, incluso desde el inicio de la enfermedad (Ball *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1995; Woo *et al.*, 1997; Chu *et al.*, 1998). Además, la prueba es más sensible y rápida que el aislamiento y cultivo del agente (Brown *et al.*, 1995).

## **II. 2. Leptospirosis en *Zalophus californianus californianus***

Se observó por primera vez leptospirosis en *Zalophus c. californianus* en otoño de 1970, durante un evento de mortalidad elevada en las costas de California y Oregon, EEUUA. Durante este evento se aisló *L. interrogans* serovariedad *pomona* de la orina y tejido renal de los lobos marinos varados (McIlhattan *et al.*, 1971; Vedros *et al.*, 1971). Como ya se mencionó, desde 1984 se han observado brotes epizooticos regulares de leptospirosis en esa región cada 3 a 4 años durante los meses de otoño, con una alta tasa de mortalidad centrada en los lobos marinos machos juveniles (Smith *et al.*, 1974; Dierauf *et al.*, 1985; Gulland *et al.*, 1996).

Se han reportado también eventos enzoóticos de leptospirosis en esta especie, sugeridos por los frecuentes hallazgos consistentes con insuficiencia renal, abortos y seroprevalencia de anticuerpos contra *L. interrogans* (Gerber *et al.*, 1993; Gulland *et al.*, 1996). En las colonias de lobos marinos de las Channel Islands, cerca de las costas de California, EEUUA, se aisló *L. interrogans pomona* en fetos abortados, placentas y crías prematuras (Smith *et al.*, 1974; Gilmartin *et al.*, 1976).

En *Z. c. californianus* se manifiesta la enfermedad comúnmente como un cuadro renal (Dierauf *et al.*, 1985). Los signos clínicos más frecuentes incluyen depresión, anorexia, polidipsia, deshidratación, renuencia a utilizar los miembros pélvicos, vómito,

dolor abdominal y temblores musculares (Gulland *et al.*, 1996). Los cambios hematológicos reportados son aumento del nitrógeno uréico, fósforo, globulina, sodio, creatinina, leucocitosis y, en ocasiones, neutrofilia (Dierauf *et al.*, 1985; Bossart y Dierauf, 1990).

Aunque no existen lesiones propias de leptospirosis, frecuentemente se observan cambios macroscópicos como nefromegalia, palidez de la corteza renal, pérdida de diferenciación entre la corteza y la médula renal, hemorragias subcapsulares y de la unión córticomedular. Se ha reportado también hepatomegalia con parénquima friable, bilis negra y espesa en la vesícula biliar y ulceraciones gástricas y orales (Smith *et al.*, 1974; Gulland, 1999).

Otras especies de pinnípedos también han presentado leptospirosis. En la península de Alaska se documentó una alta mortalidad en crías de *Callorhinus ursinus* (lobo fino del norte) asociada al complejo neonatal hemorrágico múltiple provocado por *L. interrogans pomona* (Smith *et al.*, 1977). Se cree que la leptospirosis puede ser endémica en *Eumetopias jubatus* (lobo marino de Steller) debido a la presencia de anticuerpos contra *L. interrogans* (Fay *et al.*, 1978). En 1996 se observaron signos clínicos y hematológicos de insuficiencia renal en tres organismos de la especie *Phoca vitulina richardsii* (foca común) que se encontraban en rehabilitación en Sausalito, California, EEUUA; presentaban anticuerpos contra *L. interrogans* serovariedad *grippotyphosa* (Stamper *et al.*, 1998).

## **II. 3. Generalidades de *Zalophus californianus californianus***

### **II.3.1. Taxonomía y distribución geográfica**

*Z. californianus* pertenece al Orden Carnívora, Suborden Pinnipedia, Familia Otariidae (King, 1983). Se han determinado tres subespecies: *Zalophus californianus*

*californianus* distribuida en el Golfo de California y en el Pacífico nororiental, *Z. californianus japonicus*, extinta, que habitaba las aguas de Japón y Corea en el Pacífico occidental y *Z. californianus wollebaeki* restringida a las aguas circundantes de las islas Galápagos (Reijnders *et al.*, 1993).

La distribución de *Z. c. californianus* se extiende desde Columbia Británica, Canadá (51 °N) hasta las Islas Marías, México (19 °N), incluyendo algunas islas y costas del Golfo de California (King, 1983; Zavala, 1990).

Con base en el último conteo general, se estima la población mundial entre 75,000 y 153,000 animales (Le Boeuf *et al.*, 1983).

### **II.3.2. Descripción de la especie**

El cuerpo del lobo marino de California es alargado, cubierto por una capa de pelaje denso. Presenta un cuello grueso y miembros anteriores y posteriores largos, en forma de aleta, que le permiten desplazamientos terrestres y acuáticos (King, 1983).

Los animales adultos exhiben marcado dimorfismo sexual en tamaño, peso y características sexuales secundarias. Los machos pesan aproximadamente 300 kg y llegan a medir hasta 240 cm. Las hembras alcanzan un peso de 150 kg con una longitud de hasta 180 cm. Al nacer, las crías pesan entre 5.5 y 6.5 kg y miden alrededor de 70 cm (Peterson y Bartholomew, 1967; Odell, 1981). Su pelaje es de color café oscuro, ligeramente más claro en las hembras y juveniles. La cresta sagital externa de los machos adultos es prominente y muy desarrollada, al igual que los músculos del cuello (Odell, 1981).

### **II.3.3. Biología reproductiva**

Su estrategia de reproducción es la poliginia territorial. En el Golfo de California las hembras llegan a las zonas de reproducción uno o días antes del parto, que ocurren desde mediados del mes de mayo e inicios de junio. Durante todo el mes de julio y parte de agosto las hembras se dedican exclusivamente a la crianza, hacia mediados de agosto se presentan las cópulas (Zavala, 1990; Reindjers *et al.*, 1993).

Los machos adultos establecen sus territorios en las zonas de reproducción y los defienden de otros machos hasta el término de la temporada reproductiva, cuando copulan con el mayor número de hembras posible. Las características del territorio que un macho ocupa son las que determinan en gran medida su éxito reproductivo. Los machos que controlen los mejores territorios tendrán mayor acceso a las hembras reproductivas. Por este motivo la competencia es intensa, especialmente hacia finales de la temporada cuando las hembras entran en estro (Odell, 1981).

Los machos no cuidan a las crías, por lo que la alimentación y la supervivencia de los cachorros depende completamente de la madre durante el año de lactancia (King, 1983). Durante ese tiempo las hembras hacen viajes de alimentación al mar, con una duración promedio de dos días, y regresan a tierra para amamantar a sus crías. Después del destete, las crías se convierten en animales juveniles que se alimentan de manera independiente (Gisiner y Schustman, 1991). En esta etapa permanecen hasta la madurez sexual: las hembras la alcanzan a los cuatro años de vida y los machos a los cinco años (Caldwell y Caldwell, 1972). Sin embargo, a pesar de ser sexualmente maduros, los machos de esta edad no pueden reproducirse por ser animales socialmente inmaduros, condición en la que permanecen hasta aproximadamente los nueve años, cuando son capaces de defender un

territorio. La longevidad reportada es de 22 años para las hembras y 18 años para los machos (Odell, 1981).

## **II. 4. Población de *Zalophus californianus californianus* en el Golfo de California**

### **II.4.1. Distribución y abundancia**

*Z. c. californianus* es el pinnípedo más abundante y de distribución más amplia en México. Se distribuye en el Pacífico nororiental, a lo largo de toda la costa occidental de la Península de Baja California y en el Golfo de California (Zavala, 1993).

Se conocen 40 colonias en el Golfo de California, principalmente en la Región de las Grandes Islas (Le Boeuf *et al.*, 1983; Aurióles y Zavala, 1994). Trece colonias son reproductivas y albergan al 93% de la población de *Z. c. californianus* del Golfo de California durante la época reproductiva (mayo a julio); 18 colonias son no reproductivas y se han reportado nueve sitios utilizados como paraderos temporales (Zavala, 1990).

Con base en el último conteo, la población en el Golfo de California se estima en 30,000 individuos, aproximadamente el 14% de la población mundial de *Z. c. californianus* (Le Boeuf *et al.*, 1983).

### **II.4.2. Parámetros poblacionales**

La tasa de fecundidad de *Z. c. californianus* en el Golfo de California se ha estimado en 55.8%, excepto en la colonia de Los Islotes, B.C.S., donde se estimó en 71.03%  $\pm$  14.8 (Hernández, 1996). La tasa de natalidad durante el período 1979-1985 para el Golfo de California se estimó en 22.7% (Aurióles-Gamboa y Zavala, 1994). La tasa de

mortalidad es diferencial entre las categorías de edad y sexo: para las crías macho se estima en  $38.44\% \pm 14.5$ , para las hembras de  $20.59\% \pm 11.24$ ; en la etapa juvenil, para los machos es de  $13.32\% \pm 5.8$  y para las hembras de  $11.42\% \pm 4.04$ ; los machos subadultos tienen una tasa de  $8.6\% \pm 2.38$ ; los machos adultos tienen una tasa de  $14.9\% \pm 8.3$  y las hembras adultas de  $2.65\% \pm 2.45$ . (Peterson y Bartholomew, 1967; Hernández, 1996).

La estructura de la población reportada, se compone por un 6.9% de machos adultos, 5% de machos subadultos, 40.7% de hembras adultas, 23.9% de animales juveniles, 22.7% de crías y 0.8% de animales que no pudieron ser clasificados. La proporción sexual al nacimiento es de 1:1 (Auriolos y Zavala, 1994; Hernández, 1996).

#### **II.4.3. Enfermedades infecciosas**

Se sabe poco sobre las enfermedades y causas de mortalidad de *Z. c. californianus* en el Golfo de California, aunque se cree que las parasitosis influyen en la mortalidad de las crías durante su primer año de vida (Auriolos-Gamboa y Sinsel, 1983). Otras posibles causas de muerte en crías de lobo marino son inmunosupresión crónica por desnutrición y neumonía bacteriana (Auriolos-Gamboa y Sinsel, 1983; Acevedo-Whitehouse, 1999). Se reportó la presencia de anticuerpos contra serovariedades de *L. interrogans* en crías de lobo marino de California (Godínez *et al.*, 1999) y se han observado lesiones que sugieren leptospirosis en crías encontradas muertas en las colonias reproductivas de esta región (Acevedo-Whitehouse, 1999).

### **III. Objetivos**

#### **III.1. Objetivo general**

Determinar la incidencia de leptospirosis en crías de *Zalophus californianus californianus* en siete colonias reproductivas del Golfo de California durante la temporada reproductiva del 2000 como indicador de la prevalencia de esta enfermedad en la población de *Z. c. californianus* del Golfo de California.

#### **III.2. Objetivos particulares**

- 1) Determinar si existen diferencias significativas en la incidencia de leptospirosis en crías de *Z. c. californianus* entre colonias.
- 2) Determinar si la incidencia de leptospirosis es independiente del sexo y peso de las crías.
- 3) Determinar si la seroprevalencia de anticuerpos contra *L. interrogans* es independiente de la colonia de procedencia, sexo y peso, como medida aproximada de la condición de las crías.
- 4) Determinar la presencia de *L. interrogans* en las pozas de agua estancada de las colonias.

## **IV. Materiales y métodos**

### **IV. 1. Área de estudio**

El Golfo de California se encuentra al noroeste de la República Mexicana, entre los 20 y 30° N y los 112 y 118° W. Está delimitado por los estados de Baja California y Baja California Sur hacia el oeste; Sonora, Sinaloa, Nayarit y parte de Jalisco hacia el este (Bourillón *et al.*, 1988). Su longitud aproximada es de 1500 km. y en su parte más ancha es de 150 km. Se divide en cuatro áreas oceanográficas; Alto Golfo, Región Central, Boca del Golfo y Región de las Grandes Islas (Maluf, 1983).

El clima del Golfo de California es predominantemente árido, con baja humedad e intensa radiación solar, alcanzando en ocasiones una temperatura ambiental superior a los 50°C en verano y menor a los 15°C en invierno. La temperatura promedio del agua se mantiene entre 10-16°C en invierno y 27-38°C en verano (Zavala, 1990). Representa un área subtropical con altas tasas de productividad primaria debida a surgencias y mezcla de mareas (Álvarez-Borrego y Lara Lara, 1991) y en el se encuentran muchas especies endémicas de flora y fauna marinas y terrestres (Bourillón *et al.*, 1988).

Existen 900 islas en el Golfo de California, distribuidas de manera irregular (Bourillón *et al.*, 1988), con formas irregulares y de diferentes dimensiones. Sus playas son rocosas y áridas con algunas zonas de canto rodado y grava (Zavala, 1990).

#### **IV.1.1. Colonias visitadas**

Durante la temporada reproductiva del año 2000 se visitaron siete colonias reproductivas de *Z. c. californianus* en el Golfo de California, ubicadas en Los Islotes (24° 35.3' N, 110° 23' W), Isla San Pedro Mártir (28° 22.5' N, 112° 21' W), Isla San Esteban

(28° 43' N, 112° 36' W), Isla Angel de la Guarda (29° 34' N, 113° 33' W; Los Machos y Granito), Isla Granito (29° 33' N, 113° 32' W) y Roca Blanca (28° 54' N, 113° 26' W) (Fig. 1). El crucero se realizó a bordo de la embarcación "Amigo" de la Cd. de La Paz, Baja California Sur, del 15 al 31 de julio, como parte del proyecto del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, IPN "Estudios biológicos para medir el estado de salud de las colonias reproductoras de lobo marino (*Zalophus californianus*) en el Golfo de California" (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 26430-N); todos los muestreos se realizaron bajo los permisos DOO.02.-3345 y DOO.02.-3270 del Instituto Nacional de Ecología, Dirección General de Vida Silvestre.

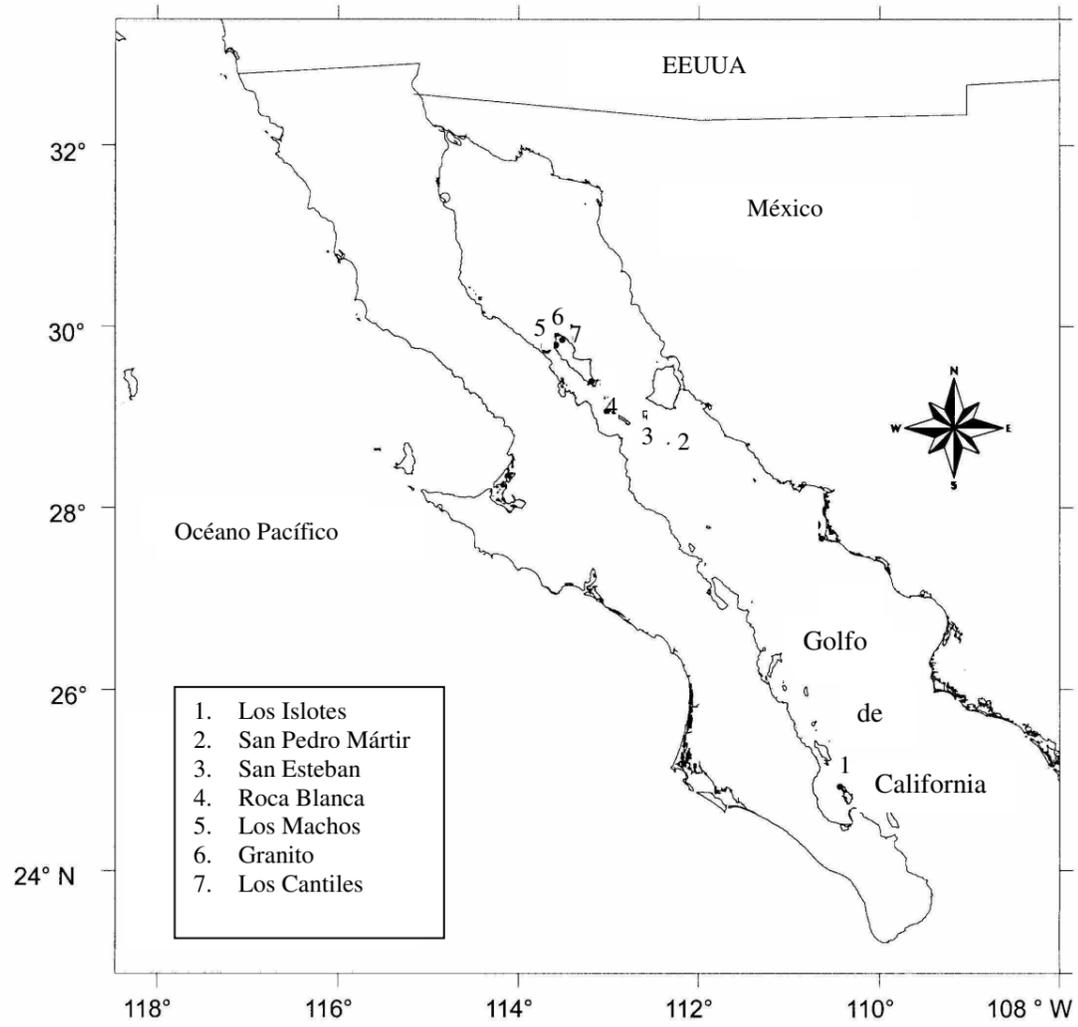


Fig. 1. Colonias reproductivas de *Z. c. californianus* en el Golfo de California

#### **IV.2. Colecta de las muestras**

En cada colonia se capturaron de 10 a 20 crías de *Z. c. californianus* de 1 a 50 días de edad. Los animales se pesaron en una bolsa de peso conocido que colgaba de una báscula ( $\pm 0.5$  kg); se anestesiaron con Isoflurano (Laboratorios Abbott, EEUUA) y se midieron para determinar la longitud total (cm) y perímetro axilar (cm).

De cada cría se obtuvieron 10 ml de sangre por venopunción en la región yugular utilizando una aguja calibre 18" x 34 mm y equipo estéril Vacutainer® (Becton Dickinson, Rutherford, EEUUA). Se colectaron 1.5 a 2 ml de sangre en tubos con EDTA como anticoagulante y 7.5 a 8 ml de sangre en tubos sin anticoagulante. El suero se obtuvo de estos tubos por centrifugación a 3500 rpm por 15 min.

Se colectaron de 2 a 20 ml de orina de las crías mediante compresión manual de la vejiga (Acevedo-Whitehouse *et al.*, sometido). Con la cría en decúbito dorsal, se palpaba la región abdominal pelvica para localizar la vejiga. De encontrarse plétora, se comprimía bilateralmente, después de haber hecho asepsia de la zona con alcohol. La muestra de orina se colectaba en recipientes estériles de boca ancha.

Todas las muestras se congelaron a bordo de la embarcación y se almacenaron a  $-20$  °C.

#### **IV.3. Pozas de agua estancada**

Se registró la presencia o ausencia de pozas de agua estancada en las playas de las 7 colonias. En las colonias en las que se encontraron pozas, se determinó la temperatura, salinidad y pH del agua con un termómetro ambiental digital Banrnant100® (Davis Instruments, Texas, EEUUA), un refractómetro para salinidad A366ATC (VeeGee Inc,

EEUU) y un potenciómetro Markson 90 (Markson Science Inc, Japón). Se eligieron al azar 5 pozas de agua estancada en cada colonia, de donde se colectaron tres réplicas de cada muestra de agua en recipientes estériles de 250 ml.

#### **IV.4. Métodos de análisis**

##### **IV.4.1. Prueba de microaglutinación (MAT)**

Las pruebas de microaglutinación fueron realizadas por el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Se utilizaron cepas vivas de 13 serovariedades representativas de 11 serogrupos de *L. interrogans* como antígenos (Cuadro I). Los serogrupos son representativos de la región geográfica (Cantú y Banda, 1995; Luna-Alvarez *et al.*, 1996) y estas serovariedades se describieron previamente en *Z. c. californianus* del Golfo de California (Godínez *et al.*, 1999). Todas las cepas se obtuvieron del Centro Panamericano de Zoonosis (OPS/OMS; Buenos Aires, Argentina).

La microaglutinación se realizó según Myers (1985). Las cepas se cultivaron en medio líquido polisorbato 80-BSA a 29 °C, durante 7 días. Los antígenos presentaban 25 unidades de turbidez nefelométrica (UTN).

Las muestras de suero se diluyeron a 1:25 con solución amortiguadora de fosfatos, pH 7.2. Se colocaron 50 µl de este suero en placas de microtitulación de 96 pozos (Nunc, Inc. Gaithersburg, Maryland, EEUU) y se añadieron 50 µl de antígeno vivo para obtener una dilución final del suero de 1:50. Las placas de microtitulación se incubaron durante 120 min a 30 °C y se observó la aglutinación en el microscopio de campo oscuro

(0.7/0.85, Carl Zeiss, Alemania). Las muestras se titularon por medio de diluciones dobles seriadas.

Cuadro I. Serovariedades de *L. interrogans* empleadas en las pruebas de MAT para determinación de anticuerpos en las crías de *Z. c. californianus*.

Serogrupo	Serovariedad
autumnalis	autumnalis
bataviae	bataviae
canicola	canicola
castellonis	castellonis
cynopteri	cynopteri
grippotyphosa	grippotyphosa
icterohaemorrhagiae	icterohaemorrhagiae
pomona	pomona
pyogenes	pyogenes
sejroe	hardjo sejroe wolffi
tarrasovi	tarassovi

#### **IV.4.2. Detección de *Leptospira interrogans* por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

##### **IV.4.2.1. Extracción de ADN**

Antes de comenzar el proceso de extracción de ADN las muestras se descongelaron en hielo y se homogeneizaron. Para extraer ADN de las muestras de orina, suero y agua, se depositó una alícuota de 500 µl de cada muestra en tubos estériles de 1.5 ml y se centrifugaron durante 20 minutos a 14,000 rpm. Después de desechar el sobrenadante de las muestras se lavó cada tubo con 50 µl de agua destilada estéril, se centrifugó durante 5 min a 14,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Después de un segundo lavado con 50 µl de

solución amortiguadora TE, se añadieron 20 µl de GeneReleaser<sup>®</sup> (BioVentures, Inc., EEUUA) a cada tubo, estos se sellaron con parafilm y se agitaron por vórtex durante 30 seg. Se calentaron en el horno de microondas durante 1 min y se centrifugaron durante 30 seg a 14,000 rpm. El sobrenadante (ADN extraído) se colectó en tubos estériles de 1.5 ml y se congeló a -20°C.

Las muestras de sangre se procesaron de acuerdo al protocolo sugerido por BioVentures, Inc. EEUUA: en tubos estériles de reacción GeneAmp<sup>®</sup> (BioSystems, Inc. EEUUA): a 1 µl de muestra se añadieron 20 µl de GeneReleaser<sup>®</sup>, se agitó cada tubo por vórtex durante 30 seg y se le añadieron 50 µl de aceite mineral. Inmediatamente se procedió a amplificar los segmentos de ADN de estas muestras mediante la PCR.

#### **IV.4.2.2. Amplificación de los segmentos de ADN**

La amplificación de los segmentos de ADN se realizó según Maniatis *et al.* (1982). Se utilizaron los oligonucleótidos F1 (5'-GAACTGAAACATCTAAGTA-3') y Ri (5'-CAGCGAATTAGATCTG-3') descritos por Woo *et al.* (1997) para amplificar la región que codifica para el ARN ribosomal 23S, con una longitud de 19 y 16 nucleótidos respectivamente y una concentración de 200 ng/µl. Los oligonucleótidos fueron sintetizados en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca, Morelos.

La amplificación por la PCR se realizó en un termociclador DNA ThermalCycler 480 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Nueva Jersey, EEUUA) y se utilizaron tubos estériles de reacción GeneAmp<sup>®</sup> (BioSystems, Inc., EEUUA). Cada mezcla de reacción (50 µl) contenía 5 µl de ADN de las muestras, 200 ng/µl de cada oligonucleótido, 1U de Taq polimerasa, 0.05 mM de dNTP's (mezcla de deoxinucleótidos dATP, dCTP, dGtP y

dTTP) y amortiguador (0.5 mM Tris-HCl, 0.075 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM KCl; pH 7.5) y 50 µl de aceite mineral. Todos los reactivos se manejaron como indica el fabricante (PCR Core Kit ®. Roche, Molecular Biochemistry, Manheim, Alemania).

Se procesaron de 10 a 15 muestras a la vez. En cada ocasión se prepararon reacciones para la PCR con 1 µl de ADN de *L. interrogans* serovariedad icterohaemorrhagiae y 1 µl de ADN de *L. biflexa* patoc1 (proporcionadas por la Unidad de Bacteriología Molecular y Médica del Instituto Pasteur, Francia) como controles positivo y negativo, respectivamente.

Después de tratar la mezcla a 94 °C durante 5 min, la reacción se llevó a cabo con un total de 25 ciclos formados por: desnaturalización a 94 °C durante 1 min, alineamiento de los oligonucleótidos a 44 °C durante 1 min y extensión a 72 °C durante 2 min. Después de un ciclo final la reacción se mantuvo a 72 °C durante 10 min (Woo *et al.*, 1997).

#### **IV.4.2.3. Detección de los productos de la PCR por electroforesis**

Se homogeneizaron 4 µl de los productos amplificados con 1 µl de una solución de azul de bromofenol y xilencianol. Se realizó un corrimiento electroforético de las muestras en un gel de agarosa al 1.5% (p/vol) con 2.5 µl de bromuro de etidio a 150 volts y 500 mA durante 50 min junto con el marcador de peso molecular (50-2000 pb, Sigma-Aldrich Corp., EEUUA). El gel se analizó bajo iluminación ultravioleta.

#### **IV.4.3. Incidencia de leptospirosis**

Se tomaron como positivas las crías que presentaban títulos de anticuerpos  $\geq 1:50$  en las pruebas de MAT y aquellas que mostraron fragmentos de 115 pb a la PCR en orina,

sangre o suero. La incidencia se determinó dividiendo el número de crías positivas entre el total de crías analizadas por colonia.

Para determinar la seroprevalencia de anticuerpos contra *L. interrogans* se dividió el número de sueros con títulos  $\geq 1:25$  entre el total de muestras analizadas por colonia.

#### IV.4.4. Análisis estadísticos

Para determinar correlaciones, interacciones y causas entre la incidencia de leptospirosis, seroprevalencia de anticuerpos contra *L. interrogans*, sexo, peso y colonia de nacimiento de las crías se realizaron las siguientes pruebas estadísticas:

Análisis de  $\chi^2$  en tabla tridimensional de contingencia (Zar, 1999) para determinar independencia entre la incidencia de leptospirosis y la seroprevalencia de anticuerpos contra *L. interrogans*, el sexo de las crías y la colonia de procedencia.

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c \sum_{l=1}^t \frac{(f_{ijl} - \hat{f}_{ijl})^2}{\hat{f}_{ijl}} \quad (1)$$

$$\hat{f}_{ijl} = \frac{R_i C_j T_l}{n^2} \quad (2)$$

$$v = (r - 1)(c - 1)(t - 1) - r - c - t + 2 \quad (3)$$

Donde:

$r$  = número de renglones.

$c$  = número de columnas.

$t$  = número de estratos.

$f_{ijl}$  = valores observados.

$\hat{f}_{ijl}$  = valores esperados.

$\hat{f}$

Tabla de contingencia de  $\chi^2$  para datos dicotómicos de escala nominal (Zar, 1999) para determinar independencia entre la incidencia de leptospirosis y la seroprevalencia de anticuerpos contra *L. interrogans* y el peso de las crías.

$$\chi^2 = \sum \sum \frac{(f_i - \hat{f}_i)^2}{\hat{f}_i} \quad (4)$$

$$v = (r - 1) (c - 1) \quad (5)$$

Donde:

$f_i$  = valores observados.

$\hat{f}_i$  = valores esperados.

$r$  = número de renglones.

$c$  = número de columnas.

$v$  = grados de libertad.

Prueba de Kruskal-Wallis para buscar diferencias en la incidencia de leptospirosis y la seroprevalencia de anticuerpos contra *L. interrogans* por colonias.

$$H_c = \frac{H}{C} \quad (6)$$

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \left( \sum_{i=1}^k \frac{R_i^2}{n_i} - 3(N+1) \right) \quad (7)$$

$$C = 1 - \frac{\sum t}{N^3 - N} \quad (8)$$

$$\sum t = \sum_{i=1}^m (t_i^3 - t_i) \quad (9)$$

$$v = k - 1 \quad (10)$$

Donde:

$C$  = Factor de corrección por valores empatados.

$N$  = Número total de observaciones en todos los grupos  $k$ .

$R_i$  = Suma de los rangos de las observaciones  $n_i$  en el grupo  $i$ .

$n_i$  = Número de observaciones en el grupo  $i$ .

$m$  = número de grupos de empate.

$t_i$  = número de empates.

$v$  = grados de libertad.

El estadístico  $H_c$  tiene una distribución  $\chi^2$ .

*A posteriori* se buscó independencia parcial entre la incidencia de leptospirosis, sexo de las crías y colonia de nacimiento y la seroprevalencia de anticuerpos contra *L*.

*interrogans*, sexo de las crías y colonia de procedencia mediante pruebas de  $\chi^2$  de dos variables (Zar, 1999).

$$\chi^2 = \frac{n \left( |f_{11}f_{22} - f_{12}f_{21}| - \frac{n}{2} \right)^2}{R_1 R_2 C_1 C_2} \quad (11)$$

con  $v =$  (eq. 5).

Para detectar diferencias en la incidencia de leptospirosis y en la seroprevalencia de anticuerpos contra *L. interrogans* entre las colonias, se realizaron pruebas Tukey no paramétricas de comparaciones múltiples (Zar, 1999).

$$SE = \sqrt{\left( \frac{N(N+1)}{12} - \frac{\sum t}{12(N-1)} \right) \left( \frac{1}{n_A} + \frac{1}{n_B} \right)} \quad (12)$$

$$Q = \frac{\bar{R}_B - \bar{R}_A}{SE} \quad (13)$$

$$\bar{R}_A = \frac{R_A}{n_A} \quad (14)$$

$$\bar{R}_B = \frac{R_B}{n_B} \quad (15)$$

Donde:

$N$  = sumatoria total de observaciones.

$n_A$  = número de observaciones del grupo A.

$n_B$  = número de observaciones del grupo B.

Se buscó establecer correlaciones para determinar que la variación observada por colonia de la incidencia de leptospirosis, seroprevalencia de anticuerpos contra *L. interrogans* y número de serovariedades a las que hubo reacción de aglutinación no fueran consecuencia del tamaño de muestra de cada colonia.

En todas las pruebas se usó un  $\alpha=0.05$  para probar las hipótesis nulas correspondientes.

## **V. Resultados**

### V.1. Incidencia de leptospirosis

De las 96 crías analizadas en este estudio, 21 (21.87%) fueron positivas a leptospirosis (Cuadro II). Se encontraron títulos de anticuerpos  $\geq 1:50$  contra *L. interrogans* serovariedades cynopteri en 14/96 muestras (14.58%) y pomona en 1/96 muestras (1.04%). No se encontraron títulos positivos contra las otras serovariedades empleadas en las pruebas de MAT. Con lo que respecta a los productos de la PCR se observaron fragmentos de ADN de 115 pb en 2/42 muestras de orina, 6/96 muestras de sangre y 1/96 muestras de suero (Fig. 2).

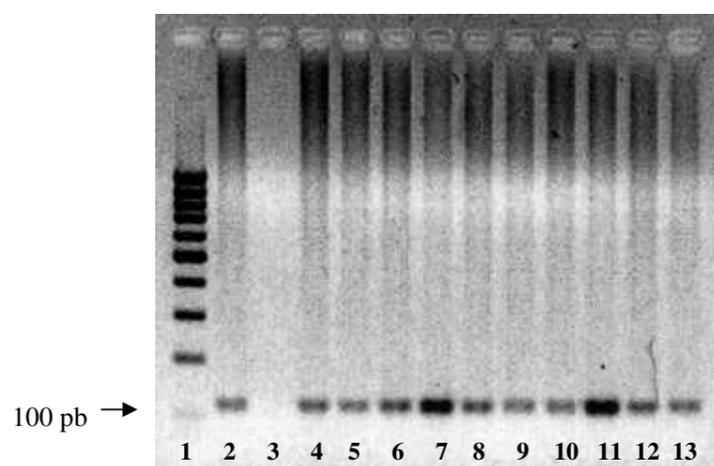


Fig. 2. Productos de la PCR de 115 pb en muestras de orina, sangre y suero (Carriles 4 a 13) utilizando oligonucleótidos específicos para *L. interrogans*, Carril 3: ADN de *L. biflexa*, Carril 2: ADN de *L. interrogans*, Carril 1: Marcador de peso molecular de 50 a 2000 pb, Sigma-Aldrich Corp., EEUUA.

Cuadro II. Número de crías positivas a leptospirosis por colonia reproductiva de *Zalophus c. californianus* del Golfo de California mediante MAT y PCR.

Colonia	No. positivos	Id. cría	MAT	Serovariedad	PCR		
					Sangre	Suero	Orina
Los Islotes	0	–	–	–	–	–	–
San P. Mártir	4	1	+	cynopteri	–	–	–
		2	+	cynopteri	–	–	–
		3	–	–	+	–	–
		9	+	cynopteri	–	–	ND
San Esteban	2	12	+	cynopteri	–	–	ND
		13	+	cynopteri	–	–	ND
Roca Blanca	3	6	+	cynopteri	–	–	–
		7	+	cynopteri	–	–	–
		9	+	cynopteri	–	–	ND
Los Machos	4	3	+	cynopteri	–	–	+
		5	–	–	+	+	–
		9	–	–	+	–	–
		11	+	cynopteri	–	–	+
Granito	5	8	–	–	+	–	ND
		9	–	–	+	–	ND
		12	–	–	+	–	–
		17	+	cynopteri	–	–	ND
		18	+	cynopteri	–	–	ND
Los Cantiles	3	2	+	cynopteri	–	–	–
		14	+	pomona	–	–	–
		17	+	cynopteri	–	–	ND

+

Positivos

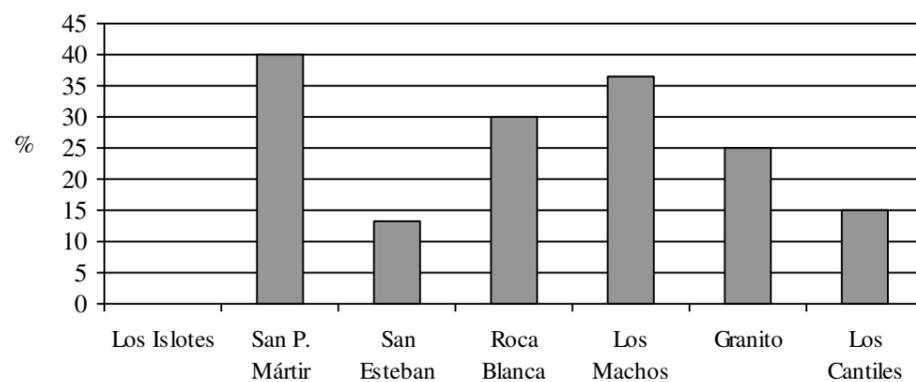
–

Negativos

ND: Muestra no disponible

La incidencia de leptospirosis fue significativamente diferente en las siete colonias ( $H_c=14.4045$ ,  $v=6$ ,  $p<0.05$ ): 40% en San Pedro Mártir, 36.36% en Los Machos, 30% en Roca Blanca, 25% en Granito, 15% en Los Cantiles y 13.33% en San Esteban; no se detectó leptospirosis en Los Islotes (Fig. 3). En todas las colonias las reacciones de aglutinación positivas a la prueba de MAT fueron a la serovariedad cynopteri, a excepción de la colonia Los Cantiles, en donde una cría presentó títulos de anticuerpos de 1:50 contra la serovariedad pomona.

La incidencia de leptospirosis y el sexo de las crías parecen ser independientes ( $\chi^2 = 20.479$ ,  $v=19$ ,  $p>0.05$ ). La presencia de anticuerpos parece ser independiente del peso de las crías ( $\chi^2 = 2.498$ ,  $v=8$ ,  $p>0.05$ ).



**Fig. 3. Incidencia de leptospirosis (%) en las siete colonias reproductivas de *Zalophus c. californianus* del Golfo de California. La colonia de Los Islotes no presentó incidencia de**

## V.2. Seroprevalencia de anticuerpos contra *L. interrogans*

El 54.16% de las 96 muestras de suero examinadas ( $n=52$ ) presentaron títulos de anticuerpos  $\geq 1:25$  contra una o más serovariedades de *L. interrogans* (Cuadro III). De las crías seropositivas, 23 mostraron anticuerpos a más de una serovariedad; siete, cuatro, cinco y siete muestras tuvieron anticuerpos contra dos, tres, cuatro y más de cinco serovariedades, respectivamente. El 50% de las crías presentaron anticuerpos contra la serovariedad cynopteri, el 23.07% contra la serovariedad pomona y el 23.07% contra la serovariedad hardjo.

**Cuadro III. Seroprevalencia y títulos máximos de anticuerpos contra *L. interrogans* por colonia reproductiva de *Zalophus c. californianus* del Golfo de California..**

Colonia	n	seroprevalencia de anticuerpos (%)	título máximo
Los Islotes	10	20	1:25
San Pedro Mártir	10	30	1:50
San Esteban	15	33.33	1:50
Roca Blanca	10	70	1:50
Los Machos	11	72.73	1:50
Granito	20	90	1:50
Los Cantiles	20	45	1:50
Total	96	54.16	1:50

El cuadro IV presenta el número de serovariedades a las que se observaron reacciones de aglutinación por colonia.

**Cuadro IV. Serovariedades de *L. interrogans* a las que se observaron reacciones de aglutinación por colonia reproductiva de *Zalophus c. californianus* del Golfo de California.**

Serovariedad	Los Islotes	San Pedro Mártir	San Esteban	Roca Blanca	Los Machos	Granito	Los Cantiles
autumnalis	+	-	-	-	-	+	+
bataviae	+	-	-	-	+	+	+
canicola	+	-	-	-	-	-	+
castellonis	-	-	-	+	-	+	+
cynopteri	-	+	+	+	+	+	+
grippotyphosa	-	-	-	+	+	+	+
hardjo	+	-	+	-	+	+	+
icterohaemorrhagiae	-	-	-	-	-	+	+
pomona	+	-	-	-	+	+	+
pyrogenes	-	-	-	-	-	+	+
sejroe	-	-	-	-	-	+	-
tarrasovi	-	-	-	-	-	+	+
wolffi	-	-	-	-	-	+	+

+	Reacción de aglutinación
-	Sin reacción de aglutinación

Debido a que algunas muestras fueron positivas a más de una serovariedad, el número de reacciones positivas se consideró como 117. En la figura 4 se presenta la frecuencia de las reacciones de aglutinación a las serovariedades empleadas. La serovariedad a la que se observaron más reacciones de aglutinación fue cynopteri (22.2%). Las serovariedades a las que se observaron menos reacciones de aglutinación fueron canicola (1.71%), pyrogenes (4.27%) y wolffi (4.27%).

Las reacciones de aglutinación contra las serovariedades canicola y bataviae sucedieron en conjunción a las reacciones contra pomona. Lo mismo se observó para grippotyphosa con cynopteri así como para icterohaemorrhagiae y pyrogenes con hardjo.

La seroprevalencia de anticuerpos en la colonia Granito (90%) fue significativamente mayor que en las otras colonias ( $\chi^2 = 23.065$ ,  $v=6$ ,  $p<0.05$ ) (Fig. 5). Las otras colonias no presentaron diferencias significativas entre si y por lo tanto se unieron las muestras para los análisis estadísticos subsecuentes.

La seroprevalencia de anticuerpos por sexos fue significativamente diferente entre colonias ( $H_c=13.617$ ,  $p<0.05$ ). En la colonia Granito la seroprevalencia en machos fue del 48.42% y en hembras del 63.15%. En las otras colonias la seroprevalencia en machos fue del 37.5% y en hembras del 57.14%.

El cuadro V presenta las reacciones positivas de anticuerpos contra *L. interrogans* por intervalos de peso de las crías. La presencia de anticuerpos parece ser independiente del peso de las crías ( $\chi^2 = 2.256$ ,  $v=8$ ,  $p>0.05$ ).

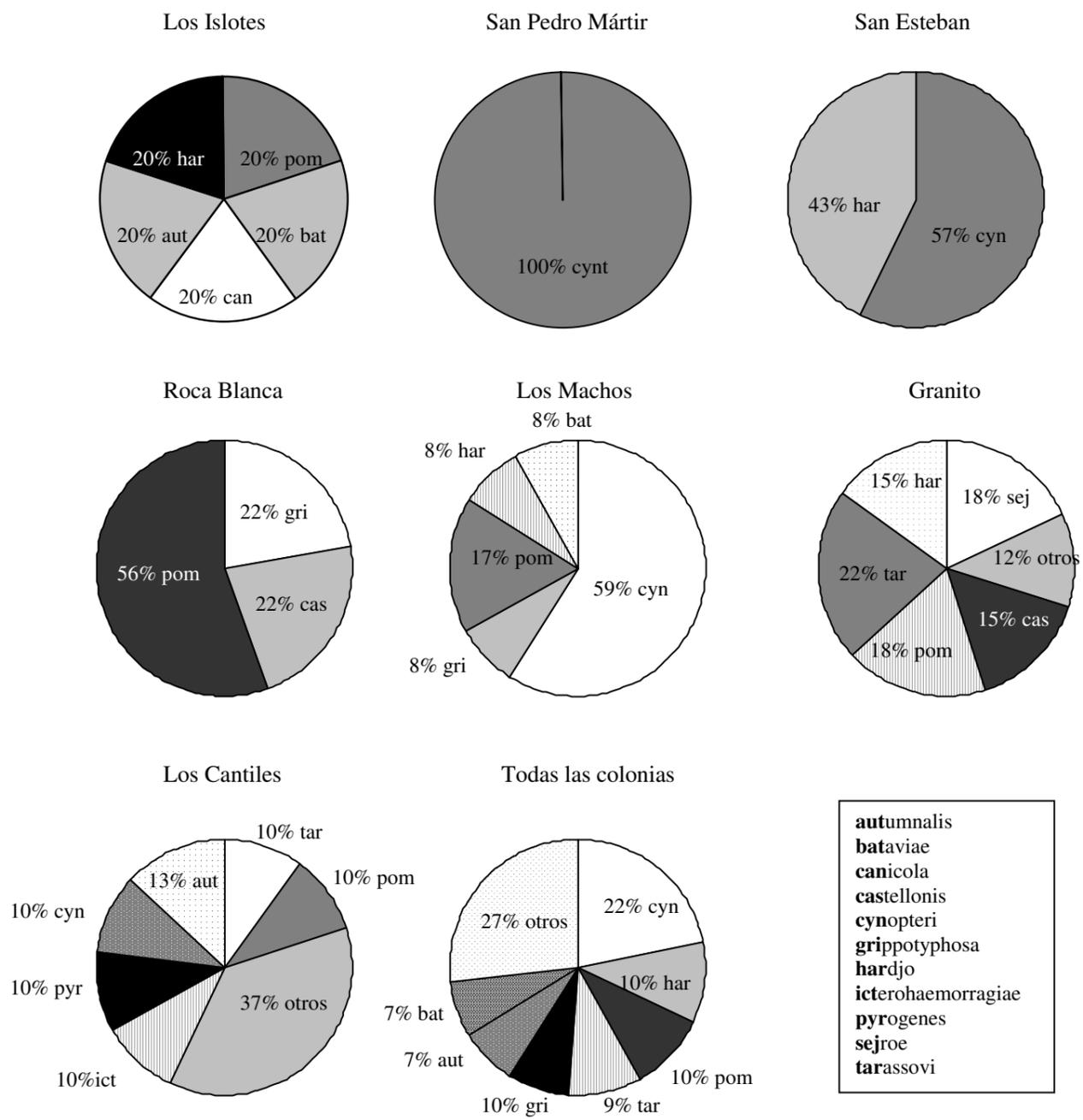


Fig. 4. Porcentaje de reacciones de aglutinación contra las diferentes serovariedades de *L. interrogans* por colonia reproductiva de *Zalophus c. californianus* del Golfo de California durante la temporada reproductiva de 2000.

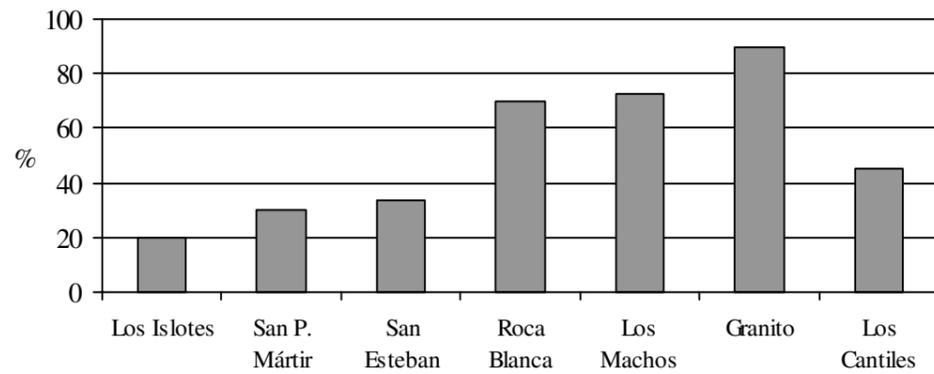


Fig. 5. Seroprevalencia (%) de anticuerpos contra *L. interrogans* en las siete colonias reproductivas de *Zalophus c. californianus* del Golfo de California.

Cuadro V. Seroprevalencia de anticuerpos contra *L. interrogans* por intervalos de peso de las crías de *Zalophus c. californianus* por colonia reproductiva del Golfo de California.

peso (kg)	n	Seroprevalencia de anticuerpos (%)
5-6.5	2	50
6.5-8	7	57.14
8-9.5	14	64.28
9.5-11	16	43.75
11-12.5	27	55.56
12.5-14	29	34.48
14-15.5	20	25
15.5-17	0	0
17-18.5	1	100

### V.3. Pozas de agua estancada en las colonias

Se encontraron pozas de agua estancada en Los Islotes, San Esteban, Roca Blanca, Granito y Los Cantiles. No se obtuvo amplificación del gen ribosomal 23S de *L. interrogans* en ninguna de las muestras de agua colectadas (n=35). El cuadro VI presenta los intervalos de temperatura, salinidad y pH del agua de las pozas.

Cuadro VI. Intervalos de la temperatura, salinidad y pH del agua de las pozas en las siete colonias reproductivas de *Zalophus c. californianus* del Golfo de California.

Temperatura °C	Salinidad ‰	pH
23.2-36.8	35-44	7.3-7.8

## VI. Discusión

En este trabajo se tomaron como positivas aquellas crías que presentaban ADN de *L. interrogans* en las muestras analizadas y títulos de anticuerpos  $\geq 1:50$  ya que la demostración del agente etiológico en sangre, suero u orina es indicativa de una infección (Van Eys, 1989; Merrien *et al.*, 1992). Al ser especies en vida libre, el origen de los anticuerpos no puede ser vacunal, como se considera para las especies domésticas. Sin embargo, no puede discriminarse si los anticuerpos son indicativos de leptospirosis o si fueron transmitidos por vía mamaria de madres enfermas o que en algún momento fueron expuestas a *L. interrogans* (Michna, 1970; Gulland, 1997).

Las crías en las que se detectó leptospiuria presentaban títulos de anticuerpos de 1:50 contra *L. interrogans* y las crías en las que se detectó leptospiremia no presentaban títulos de anticuerpos  $\geq 1:25$ . Esto concuerda con lo descrito acerca de la patogenia de leptospirosis ya que durante la fase leptospirémica aún no ha comenzado la producción de anticuerpos (Michna, 1970). Es hasta que comienzan a eliminarse las leptospiras por la orina que son detectables los anticuerpos por pruebas serológicas (Thiermann, 1984; Farr, 1995).

Contrario a lo reportado por otros autores, la detección de *L. interrogans* mediante PCR en sangre fue más sensible que en suero. De las 5 crías en las que se detectó leptospiremia en todas se observaron amplificaciones del gen 23S de *L. interrogans* en sangre pero solamente en una se detectó ADN en suero. Gravekamp *et al.* (1993) reportan que los eritrocitos inhiben la amplificación de los segmentos de ADN de *L. interrogans*

durante la PCR y sugieren utilizar suero en lugar de sangre para el diagnóstico de leptospirosis. El método de extracción de ADN utilizado en este trabajo permite utilizar hasta 200 µl de sangre entera sin que los compuestos inhibitorios puedan interferir durante la amplificación (Vivek *et al.*, 1993; Dawson y Harris, 1995). Es probable que la menor sensibilidad de detección del ADN de *L. interrogans* en las muestras de suero se debiera a la pérdida de leptospiras atrapadas en el coágulo de sangre (Gravekamp *et al.*, 1993).

La producción de anticuerpos depende de la habilidad del hospedero para desarrollar una respuesta inmune y la duración de ésta; la edad, genética y estado nutricional del organismo influyen en la respuesta inmune (Gulland, 1997). Ya que a la fecha no se ha descrito la respuesta inmune de *Z. c. californianus* a *L. interrogans*, no es posible determinar si los títulos de 1:50 son el reflejo de una infección (presencia del parásito en el hospedero o población susceptible) o de la enfermedad (condición clínica que puede ser observada o medida) (Scott, 1988).

La seroprevalencia de anticuerpos más alta en las hembras puede deberse a que generen una mayor respuesta inmune a *L. interrogans* que la que presentan los machos. En otras especies se ha reportado que las hembras generan una respuesta inmune más activa y más favorable a diversos agentes infecciosos que los machos (Chao *et al.*, 2000).

La transmisión de leptopiras patógenas por vía mamaria es poco probable debido a la presencia de lípidos de acción lítica en la leche materna (Stalheim, 1965) por lo que las crías pudieron haberse infectado durante la gestación (Thiermann, 1982; Ellis, 1986) o durante los primeros días de vida en la colonia por contacto con orina infectada de otro individuo de la especie o de reservorios (Heath y Johnson, 1994; Gulland *et al.*, 1996).

No se encontró ADN de *L. interrogans* en las muestras de agua colectadas de las pozas. Aunque no se puede descartar que pudieran haber estado presentes en números por debajo del nivel de detección de la prueba empleada, los intervalos de temperatura y salinidad registradas en las pozas seguramente comprometerían la viabilidad e infectividad de las leptospiras patógenas (Michna, 1970; Ellinghausen, 1973), reduciendo la posibilidad de que este fuera la fuente de infección y el medio de transmisión de la leptospirosis en las colonias de *Z. c. californianus*.

La incapacidad para demostrar la presencia de *L. interrogans* en la orina no descarta la posibilidad de que el animal sea un portador crónico, simplemente indica que no estaba eliminando números detectables de leptospiras al momento de la toma de la muestra (Michna, 1970; Heath y Johnson, 1994). Se ha reportado que la PCR puede detectar hasta 50 leptospiras por ml de orina (Wagenaar *et al.*, 2000). Por esto se consideró que por lo menos dos crías se encontraban eliminando activamente a las leptospiras en la orina y aquellas que presentaban títulos positivos de anticuerpos pudieron haber estado eliminando al agente patógeno en la orina en niveles no detectables por la PCR.

Un animal infectado puede eliminar hasta  $10^5$  leptospiras/ml de orina durante las primeras semanas de la enfermedad (Heath y Johnson, 1994) y la eliminación de leptospiras en la orina de *Z. c. californianus* dura hasta 154 días (Dierauf *et al.*, 1985). Los animales se encuentran hacinados en las colonias y llegan a orinar unos encima de otros (Peterson y Bartholomew, 1967) lo que puede favorecer el mantenimiento de leptospirosis en las colonias.

La prevalencia de serovariedades en una población susceptible es el reflejo de la prevalencia en las poblaciones de reservorios con los que han tenido contacto (Heath y

Johnson, 1994). Hay murciélago pescador (*Myotis vivesi*) y roedores, endémicos e introducidos (*Peromyscus* spp., *Mus musculus*, *Rattus rattus* y *Rattus norvegicus*) en muchas de las islas (Maya, 1968; Villa, 1979; Hall, 1981; Mellink, 2002). Aunque se desconoce si el territorio utilizado por *Z. c. californianus* en las islas se traslapa con el territorio utilizado por estas especies, la presencia de estas especies en las islas pudiera tener un papel significativo en la transmisión, incidencia y prevalencia de la leptospirosis en las colonias del Golfo de California.

Ambas crías en las que se detectó leptospiuria presentaban títulos positivos de anticuerpos contra la serovariedad cynopteri y el 50% de las crías presentó anticuerpos con títulos  $\geq 1:25$  contra esta serovariedad. Este es un resultado inesperado ya que en un estudio anterior realizado en colonias reproductivas de *Z. c. californianus* del Golfo de California, se reportó la más alta prevalencia de anticuerpos contra la serovariedad hardjo, con títulos de anticuerpos de hasta 1:320 (Godínez *et al.*, 1999).

Es probable que las diferentes serovarietades sean transmitidas por reservorios diferentes. *L. interrogans* cynopteri ha sido aislada en la sangre y orina de murciélagos (Michna, 1970; McCoy, 1974). Existen reportes sobre la presencia de *Myotis vivesi*, el murciélago pescador, en las islas incluidas en este estudio (Maya, 1968). Se sugiere que *Myotis vivesi* tenga un papel significativo en la transmisión, incidencia y prevalencia de leptospirosis en las colonias de *Z. c. californianus* en el Golfo de California.

El título de anticuerpos de 1:50 contra la serovariedad pomona que presentó una cría de la colonia Los Cantiles pudiera deberse a una reacción cruzada con la serovariedad cynopteri. Sin embargo, esa cría no presentaba leptospiuria ni signos clínicos aparentes de leptospirosis por lo que no se puede descartar que los anticuerpos sean de origen materno.

La seroprevalencia de anticuerpos contra la serovariedad grippotyphosa se observó únicamente en las colonias de Los Cantiles, Los Machos (ambos localizados en la isla Angel de la Guarda), Granito y Roca Blanca. Las colonias Granito y Los Cantiles fueron las únicas en presentar seroprevalencia de anticuerpos contra icterohaemorrhagiae. Los roedores silvestres son reservorios de la serovariedad grippotyphosa (Maghami *et al.*, 1977; Hanson, 1982) y *Rattus norvegicus* es uno de los reservorios más importantes de la serovariedad icterohaemorrhagiae (Thiermann, 1981). *Mus musculus* y *Rattus norvegicus* se encuentran en las islas de San Pedro Mártir y Angel de la Guarda; *Peromyscus boylii glasseilii* en San Pedro Martir; *Peromyscus stephani* en San Esteban; *Rattus rattus* en Granito; *Peromyscus guardia* en Granito y Angel de la Guarda; *Chaetodipus spinatus guardia* y *Neotoma lepida insularis* en Angel de la Guarda (Hall, 1981; Mellink, 2002). No existen reportes de leptospirosis patógenas en estas especies de roedores, pero es probable que los roedores estén involucrados en la epidemiología de leptospirosis en estas colonias.

Las serovariedades autumnalis, bataviae y pomona han sido aislados en ratones domésticos y ratas (Baude, 1982). Las reacciones de aglutinación a estas serovariedades en las colonias de Los Machos, Granito y Los Cantiles pudieran deberse a presencia de roedores en estas islas. Sin embargo, no puede descartarse que se deban a reacciones cruzadas con las otras serovariedades empleadas en las pruebas de MAT.

La colonia de Los Islotes fue la única en la que no se detectó leptospirosis. Esto puede explicarse por la ausencia de reservorios mamíferos o por las presas consumidas. En esta colonia los patrones de alimentación de *Z. c. californianus* son diferentes que en las otras colonias: las principales presas consumidas son bentónicas de los géneros *Aulopus*, *Neobythites*, *Pontinus* y *Hemanthias* (Aurioles *et al.*, 1984; García-Rodríguez y

Auriolles-Gamboa, 1997). En la región de las grandes islas, debido a la cercanía de las colonias y la abundancia y amplia distribución de los recursos, se distinguen presas comunes. En San Pedro Mártir y San Esteban la alimentación está representada principalmente por mictófidios; en Los Machos por *Sardinops sagax* y en menor grado por *Scomber japonicus*; en Los Cantiles, Los Machos y Granito se ha reportado consumo de *Trichiurus lepturus* (García-Rodríguez, 1999). Aunque no existen reportes de estas especies como reservorios de *L. interrogans*, se han aislado leptospiras patógenas de algunas especies de peces e invertebrados (Babudieri, 1958; Hoeden *et al.*, 1961; Maestrone y Benjaminson, 1962; Michna, 1970; Kingscote, 1971; Glosser *et al.*, 1974; Maghami *et al.*, 1977; Minette, 1983; Thiermann, 1984; Luna-Alvarez *et al.*, 1996) por lo que no puede descartarse el que la leptospirosis sea transmitida por algunas de las presas consumidas por *Z. c. californianus* en la región de las grandes islas.

Las reacciones de aglutinación que se observaron a las serovariedades canicola, castellanis, hardjo, pyrogenes, sejroe, tarassovi y wolffi pueden deberse a reacciones cruzadas con las otras serovariedades empleadas en las pruebas de MAT, aunque no puede descartarse que sean el resultado de la exposición a otras leptospiras (Myers y Coltorti, 1978; Hanson, 1982; Kingscote, 1986; Gulland *et al.*, 1996).

A excepción de las pozas de agua estancada, todos los demás factores: hacinamiento en las colonias reproductivas, presencia de reservorios vertebrados conocidos y la posibilidad de presencia de leptospiras patógenas en presas consumidas por *Z. c. californianus* pueden explicar la presencia de *L. interrogans* y algunas de las diferencias en la incidencia de leptospirosis y seroprevalencia de anticuerpos contra *L. interrogans* por colonia.

A diferencia de los eventos epizooticos de leptospirosis observados en las costas de California y Oregon, EEUUA, caracterizados por una elevada mortalidad de *Z. c. californianus*, que fueron ocasionados por la serovariedad pomona (McIlhattan *et al.*, 1971; Vedros *et al.*, 1971; Smith *et al.*, 1974; Dierauf *et al.*, 1985; Gulland *et al.*, 1996), en el Golfo de California no se han reportado eventos de mortalidad sugerentes de leptospirosis epizootica. Es probable que la poblaci3n del Golfo de California no haya tenido contacto con individuos de colonias del Pacífico que cursen con la enfermedad ni que hayan tenido exposici3n a las mismas serovariedades no adaptadas a *Z. c. californianus* debido al aislamiento relativo entre las colonias del Golfo y del Pacífico norte (Maldonado *et al.*, 1995) donde el movimiento de la especie entre ambas regiones parece estar restringido a la parte sur de Baja California (Aurioles *et al.*, 1983). A la fecha no se han realizado estudios sobre la epidemiología de leptospirosis en las colonias de *Z. c. californianus* de la costa oeste de la Península de Baja California.

La alta seroprevalencia de anticuerpos (54.16%) encontrada durante este trabajo, así como la ausencia de crías con signos clínicos indicativos de la enfermedad y la falta de reportes recientes de un incremento en las tasas de mortalidad sugieren leptospirosis enzoótica ocasionada por serovariedades adaptadas a *Z. c. californianus*. Ya que en este trabajo se obtuvieron muestras del 7-15% del total de crías de cada colonia (Aurioles-Gamboa, censo poblacional 2000. Datos no publicados), los resultados son representativos de la poblaci3n de crías de *Z. c. californianus* de cada colonia e, indirectamente, de la prevalencia de leptospirosis en la poblaci3n adulta de *Z. c. californianus* en el Golfo de California.

## VII. Conclusiones

1. Las crías de *Zalophus c. californianus* de las colonias reproductivas del Golfo de California exhibieron evidencias de infección por *Leptospira interrogans* durante la temporada reproductiva del 2000.
2. La incidencia de leptospirosis y prevalencia de anticuerpos contra *L. interrogans* presentaron diferencias por colonia, causados posiblemente por diferencias en la presencia de reservorios vertebrados en las islas y en las presas consumidas por *Z. c. californianus*.
3. La infección por *L. interrogans* probablemente se estableció durante la gestación o durante los primeros días de vida en la colonia por contacto con orina infectada de otro individuo de la especie o de reservorios.
4. Las crías de *Z. c. californianus* infectadas por *L. interrogans* eliminan al agente infeccioso en la orina. Debido al hacinamiento de los animales en las colonias, este puede ser la forma de mantenimiento de leptospirosis en las colonias.
5. Los intervalos de temperatura y salinidad de las pozas de agua estancada seguramente afectarían la viabilidad e infectividad de *L. interrogans*, por lo que no parecen jugar un papel significativo en la transmisión y mantenimiento de la leptospirosis en las colonias de *Z. c. californianus* del Golfo de California.

6. La serovariedad de *L. interrogans* de mayor prevalencia fue cynopteri. Es probable que *Myotis vivesi*, el murciélago pescador, esté involucrado en la epidemiología de esta serovariedad en algunas de las colonias.
7. Los roedores nativos e introducidos que habitan algunas de las islas pueden jugar un papel importante en la transmisión de las serovariedades icterohaemorrhagiae y grippotyphosa en las colonias de Los Cantiles, Los Machos, Granito y San Pedro Mártir.
8. La alta seroprevalencia de anticuerpos (54.16%) encontrada durante este trabajo, así como la ausencia de crías con signos clínicos indicativos de la enfermedad ni reportes recientes de un incremento en las tasas de mortalidad, sugieren leptospirosis enzoótica ocasionada por serovariedades adaptadas a *Z. c. californianus*.

### **Literatura citada**

- Acevedo Whitehouse, K. 1999. El lobo marino de California (*Zalophus californianus californianus*) en el Golfo de California: Hallazgos Patológicos. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 65 pp.
- Acevedo Whitehouse, K., de la Cueva, H. Brousset y D. Aurióles Gamboa. 2001. Selected physical and biochemical urine parameters from California sea lion pups of the Gulf of California. *Mar. Mamm. Sci.* (sometido)
- Anderson, R.M. y R.M. May. 1979. Population biology of infectious diseases: Part I. *Nature* 280: 361-367.
- Alexander, A.D. 1982. Spirochetes. En: Braude, A.I. (ed.). *Microbiology. Basic Science and Medical Applications*. Saunders, Inc. Philadelphia, p 437-442.
- Alvarez Borrego, S. y J.R. Lara Lara. 1991. The physical environment and primary production of the Gulf of California. En: Dauphin, J.P. y B. Simone (eds.). *The gulf and penninsular province of the Californias. Memoirs Amer. Assoc. of Petrol. Geol.* 47: 555-567.
- Aurióles Gamboa, D. 1993. Biodiversidad y estado actual de los mamíferos marinos en México. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* 397-412.

- Aurioles Gamboa, D., C. Fox, F. Sinsel y G. Tanos. 1984. Prey of the California sea lion (*Zalophus californianus*) in the bay of La Paz, Baja California Sur, Mexico. *J. Mammal.* 65(3): 519-521.
- Aurioles Gamboa, D., B.J. LeBoeuf y L.T. Findley. 1993. Registro de pinnípedos poco comunes del Golfo de California. *Rev. Inv. Cient. UABCS.*
- Aurioles Gamboa, D., y F. Sinsel. 1983. Mortality of California sea lion pups at Los Islotes, Baja California Sur, Mexico. *J. Mammal.* 69: 180-183.
- Aurioles Gamboa, D., F. Sinsel., C. Fox, E. Alvarado y O. Maravilla. 1983. Winter migration of subadult male California sea lions (*Zalophus californianus*) in the Southern part of Baja California. *J. Mammal.* 64: 513-518.
- Aurioles Gamboa, D. y G.A. Zavala. 1994. Algunos factores ecológicos que determinan la distribución y abundancia del lobo marino, *Zalophus californianus*, en el Golfo de California. *Ciencias Marinas* 20: 535-553.
- Babudieri, B. 1958. Animal reservoirs of leptospirosis. *Am. NY Acad. Sci.*, 70:303-413.
- Ball, A.E., C. Gravekamp, R.A. Hartskeel, J. de Meza-Brewster, H. Karver y W.J. Terpstra. 1994. Detection of leptospire in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1984-1898.
- Bossart, G.D. y L.A. Dierauf. 1990. Marine mammal clinical laboratory medicine. En: Handbook of marine mammal medicine: Health, disease and rehabilitation. L.A. Dierauf (ed.) CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, p 1-52.
- Bourillón, M.L., A. Cantú, A.F. Eccardi, F.E. Lira, R.J. Ramírez, E. Velarde y A. Zavala. 1988. Islas del Golfo de California. Coedición Secretaría de Gobernación/UNAM. 1ª edición. México. 292 pp.
- Brown, P.D., C. Gravekamp, D.G. Carrington, H. Van de Keemp, R.A. Hartskeel, C.N. Edwards, C.O.R. Everard, W.J. Terpstra y P.N. Levett. 1995. Evaluation of the

- polymerase chain reaction of early diagnosis of leptospirosis. *J. Med. Microbiol.* 43: 110-114.
- Caldas, F.M. y M.B. Sampaio. 1979. Leptospirosis in the city of Salvador. *Int. J. Zoon.* 6:85-96.
- Caldwell, M.C., y D.K. Caldwell. 1972. Behavior of marine mammals. En: Mammals of the sea, Biology and medicine (Ridgway, S.H. Ed). Charles C. Thomas Publisher, USA.
- Cantu, A.F. y V.A. Banda. 1995. Seroprevalencia de leptospirosis bovina en 3 municipios del sur de Tamaulipas. *Tec. Pec. Mex.* 33: 121-124.
- Carter, G.R. 1985. Bacteriología y Micología Veterinarias. Aspectos esenciales. Manual Moderno. México, D.F. 355 pp.
- Corwin, A., A. Ryan, W. Bloys, R. Thomas, B. Deniega y D. Watts. 1990. A waterborne outbreak of leptospirosis among U.S. military personnel in Okinawa, Japan. *Int. J. Epidemiol.* 19:143-148.
- Chao, T.C., H.H. Chao, M.T. Chen, J.A. Greager y R.J. Walter. 2000. Female sex hormones modulate the functions of LPS-treated macrophages. *Am. J. Repr. Immunol.* 44: 310-318.
- Chu, K.M., R. Rathinam, P. Namperumalsamy y D. Dean. 1998. Identification of *Leptospira* species in the pathogenesis of uveitis and determination of clinical ocular characteristics in South India. *J. Inf. Dis.* 178: 1457-1463.
- Dawson, E.P. y J.R. Harris. 1995. Rapid PCR sample preparation for multiple amplifications. *J NIH Res.* 7: 64.

- Day, T.D., J.R. Wass, C.E. O'Connor, P.W. Carey, L.R. Matthews y A.J. Pearson. 1997. Leptospirosis in bushtail possums: Is *Leptospira interrogans* serovar balcanica environmentally transmitted?. *J. Wild. Dis.* 33: 254-260.
- Dierauf, L.A., D.J. Vandenbroek, J. Roletto, M. Koski, L. Amaya y L.J. Gage. 1985. An epizootic of leptospirosis in California sea lions. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 187: 1145-1148.
- Dietz, R., C.T. Ansen, P. Have y M.P. Heide-Jorgensen. 1989. Clue to seal epizootic?. *Nature* 338:627.
- Dobson, A.P. y E.R.Carter. 1996. Infectious diseases and human population history. *Bioscience* 92: 115-125.
- Ellinghausen, H.C. 1973. Growth temperatures, virulence, survival and nutrition of leptospire. *J. Med. Microbiol.* 6: 487-497.
- Ellis, W.A. 1986. Leptospirosis. *J. Small Animal Pract.* 27: 683-692.
- Faine, S. 1994. *Leptospira and leptospirosis*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 334 pp.
- Farr, R.W. 1995. Leptospirosis. *Clinical Infectious Diseases* 21: 1-8.
- Fay, F.H., R.A. Dietrich, L.M. Schultz. 1968. Morbidity and mortality of marine mammals. En: Environmental assessment of the Alaskan Continental Shelf. Annual Reports of principal investigators for the year ending March 1978. Vol I. Mammals-Birds. Seattle. National Oceanic and Atmospheric Administration. 34-79 p.
- García Rodríguez, F.J.1999. Cambios espaciales y estacionales en la estructura trófica y consumo del lobo marino de California, *Zalophus californianus*, en la región de las grandes islas, Golfo de California. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-IPN. Tesis de Maestría. 72 pp.

- García Rodríguez, F.J. y D. Aurióles Gamboa. 1997. Contribución al conocimiento de la diversidad íctica en la Bahía de La Paz por medio del análisis coprológico en el lobo marino de California *Zalophus californianus californianus*. En: Urbán Ramírez, J. y M. Ramírez Ramírez (eds.). La Bahía de La Paz. Investigación y conservación. Universidad Autónoma de Baja California Sur – Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas – Scripps Institution of Oceanography. La Paz, BCS. 202 pp.
- Gerber, J.A., J. Roletto, L.E. Morgan, D.M. Smith y L.J. Gage. 1993. Findings in pinnipeds stranded along the central and northern California coast, 1984-1990. *J. Wild. Dis.* 29: 423-433.
- Gilmartin, W.G., R.L. DeLong, A.W. Smith, J.C. Sweeney, B.W. De Lappe, R.W. Risebrough, Griner L.A., M.D. Dailey, y D.B. Peakall. 1976. Premature parturition in the California sea lion. *J. Wild. Dis.* 12: 104-115.
- Gisiner, R. y R.J. Schusterman. 1991. California sea lion pups play an active role in reunions with their mothers. *Anim. Behav.* 41: 364-366.
- Glosser, J.W., C.R. Sulzer, M. Eberhardt y W. G. Winkler. 1974. Cultural and serologic evidence of *Leptospira interrogans* serotype tarrasovi infection in turtles. *J. Wild. Dis.* 10: 429-435.
- Godínez, C.R., B.Z de Romillo, D. Aurióles Gamboa, A. Verdugo Rodríguez, E.A. Rodríguez Reyes y A. de la Peña Moctezuma. 1999. Antibodies against *Leptospira interrogans* in California sea lion pups from Gulf of California. *J. Wild. Dis.* 35: 108-111.
- Gravekamp, C., H. Van de Kemp, M. Franzen, D. Carrington, G.J. Schoane, G.J.J.M. Van Eys, C.O.R. Everard, R.A. Hartskeel y W.J. Terpstra. 1993. Detection of severn

- pathogenic leptospire by PCR using two sets of primers. *J. Gen. Microbiol.* 139:1691-1700.
- Grenfell, B., y A. Dobson. 1995. Ecology of infectious diseases in natural populations. Cambridge University Press, Cambridge. 521 pp.
- Gulland, F.M.D.1999. Leptospirosis in marine mammals. En: Fowler, M.C. y R.E. Miller (eds.). Zoo and wild animal medicine. Current therapy 4. W.B. Saunders, Pennsylvania. p 469-471.
- Gulland F.M.D. 1997. The impact of parasites on wild animal populations. *Parassitologia* 39: 287-291.
- Gulland F.M.D., L.J. Lowenstine, A. Colagross, L. Morgan, y T. Spraker. 1996. Leptospirosis in California sea lions stranded along the central California coast, 1981-1994. *J. Wild. Dis.* 33: 372-380.
- Hall, E.R. 1981. The Mammals of North America. John Wiley and Sons, Inc. 2ª edición. New York. 1181 pp.
- Hanson, L.E. 1982. Leptospirosis in domestic animals: The public health perspective. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 181: 1505-1509.
- Harvell, C.D., K. Kim, J.M. Burkholder, R.R. Colwell, P.R. Epstein, D.J. Crimes, E.E. Hofmann, E.K. Lipp, A.D.M.E. Osterhaus, R.M. Overstreet, J.E. Porter, G.W. Smith y G. R. Vasta. 1999. Emerging infectious diseases. Climate links and anthropogenic factors. *Science* 285: 1505-1509.
- Heath, S.E. y R. Johnson. 1994. Leptospirosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 205: 1518-1523.

- Hernández, C.J.C. 1996. Dinámica poblacional del lobo marino de California, *Zalophus californianus*, en la lobera de Los Islotes, Golfo de California, México. Facultad de Ciencias, UNAM. México. Tesis de licenciatura. 100 pp.
- Hoeden van der, J., E. Szenberg, y Z. Evenhik. 1961. Leptospira-agglutinating factors in turtle sera. *Nature* 190: 95-96.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley y S.T. Williams. 1994. The Spirochetes. En: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9<sup>th</sup> ed. Williams and Wilkins. p 28-34.
- Jayaraman, K.S. 1998. India urged to act against leptospirosis. *Nature* 392: 4.
- King, J.E. 1983. Seals of the world. British Museum (Natural History). Comstock Publ. Assoc., Cornell Univ. Press 240 pp.
- Kingscote, B.F. 1971. Leptospirosis in fingernail clams. *J. Wild. Dis.* 7: 178-185.
- Kingscote, B.F. 1986. Leptospirosis in red foxes in Ontario. *J. Wild. Dis.* 24: 475-478.
- Kmety, E.R. y H. Dikken. 1993. Classification of the species of *Leptospira* and history of its serovars. Groningen University Press. 104 pp.
- LeBoeuf, B.J., D. Auriolles Gamboa, R. Condit, C. Fox, R. Gisiner, R. Romero y F. Sinsel. 1983. Size and distribution of the California sea lion population in Mexico. *Proc. Calif. Acad. Sci.* 43: 77-85.
- Levett, P.N. 1999. Leptospirosis: re-emerging or re-discovered disease?. *J. Med. Microbiol.* 48: 417-418.
- Luna Alvarez, M.A., L.P. Moles Cervantes, J.I. Torres Barranca y F. Gual Sill. 1996. Investigación serológica de leptospirosis en fauna silvestre mantenida en cautiverio en el zoológico de Chapultepec de la ciudad de México. *Vet. Mex.* 27: 229-234.

- Maestrone, G. y M.A. Benjaminson. 1962. *Leptospira* infection in the gold fish (*Carassius auratus*). *Nature* 195: 719-720.
- Maghami, G.H., P. Hooshmand y A. Farhang-Azad. 1977. Leptospirosis in small mammals of Iran: Isolation of *Leptospira grippotyphosa* from *Mus musculus*. *J. Wild. Dis.* 13: 286-289.
- Maldonado, J.E., F. Orta Dávila, B.S. Stewart, E. Geffen y R.K. Wayne. 1995. Intraspecific genetic differentiation in California sea lions (*Zalophus californianus*) from Southern California and the Gulf of California. *Mar. Mamm. Sci.* 11:46-52.
- Maluf, L.Y. The Physical Oceanography. En: T.J. Cassey y M.L. Cody (eds.). Island Biography of the Sea of Cortez. Univ. Calif. Press. 1983. p 26-48.**
- Maniatis, T., E.F. Fritsch y J. Sambrook. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 179 pp.**
- May, R.M. 1988. Conservation and disease. *Cons. Biol.* 2: 28-30.**
- Maya, J.A. 1968. The natural history of the fish-eating bat. Tesis de doctorado. Universidad de Arizona, Tucson. 196 pp.**
- Mayer, G.D. 2000. Geography, ecology and emerging infectious diseases. *Social Science and Medicine* 50: 937-952.**
- McCoy, R.H. 1974. Bacterial diseases of bats: A Review. *Lab. Anim. Sci.* 24:530-534.**
- McIlhattan, T.J., J.W. Martin, R.J. Wagner y J.O. Iversen. 1971. Isolation of *Leptospira pomona* from a naturally infected California sea lion, Sonoma County, California. *J. Wild. Dis.* 7: 195-197.
- Mellink, E. 2002. Invasive vertebrates on the islands of the Sea of Cortés. En: Tellman, B. (ed.). Invasive species in the Sonoran Region. University of California. En prensa.

- Merrien, F., D. Amouriaux, P. Perolat, G. Baranton y I. Saint Girons. 1992. Polymerase chain reaction of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 30:2219-2224.
- Meslin, F.X. 1997 Global aspects of emerging and potential zoonoses: a WHO perspective. *Emerg. Infect. Dis.* 3: 223-228 p.
- Michna, S.W.1970. Leptospirosis. *Vet. Rec.* 86:484-496 p.
- Minette, H.P.1983. Leptospirosis in poikilothermic vertebrates. A review. *Int J Zoon* 10: 111-121.
- Myers, D.M. 1985. Manual de métodos para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis. Nota técnica No. 30. Centro Panamericano de Zoonosis, OPS/OMS, Martínez, Argentina. 4 pp.
- Myers, D.M., y E.A. Coltorti. 1978. Broadly reacting precipitating and agglutinating antigens of *Leptospira*. *J. Clin. Microbiol.* 8:580-590.
- Odell, D.K. 1981. California sea lion, *Zalophus californianus* (Lesson, 1828). En: Ridgway, S.H. y R.J. Harrison (eds.). Handbook of Marine Mammals: The walrus, sea lions, fur seals and sea otter. Acad. Press. London. p 67-97.
- O' Leary, W. 1989. Practical Handbook of Microbiology. CRC Press Handbook. 681 pp.
- Osterhaus, AD, H.W. Broeders, J. Groen, F.G. UytdeHaag, I.K. Visser, M.W. van de Bildt, C. Orvell, V.P. Kumarev y V.L. Zorin. 1989. Different morbilliviruses in European and Siberian seals. *Vet. Rec.* 125: 647-648.
- Peterson, R.S. y G.A. Bartholomew. 1987. The natural history and behavior of the California sea lion. *Spec. Publ. Am. Soc. Mammal.* 79 pp.

- Rathinam, S.R., S. Selvarj, D. Dean, R.A. Nozik y P. Namperumalsamy. 1997. Uveitis associated with an epidemic outbreak of leptospirosis. *Am. J. Ophthalmol.* 124:71-79.
- Reilly, J.R. 1970. The susceptibility of five species of wild animals to experimental infection with *Leptospira grippotyphosa*. *J. Wild. Dis.* 6: 289-294.
- Reilly, J.,R., D.H. Ferris y L.E. Hanson. 1968. Experimental demonstration of the enteric route of infection with *Leptospira grippotyphosa* in wild carnivores. *Am. J. Vet. Res.* 29: 1849-1854.
- Reindjers, P., S. Brasseur, J. Van der Toorn, P. Van der Wolf, I. Boyd, J. Harwood, D. Lavigne y L. Lowry. 1993. Seals, fur seals and walrus. Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN Seal Specialist Group. 89 pp.
- Scott, M.E. 1988. The impact of infection and disease on animal populations: implications for conservation biology. *Cons. Biol.* 2: 40-55.
- Smith, A.W., R.J. Brown, D.E. Skilling, R.L. y R. DeLong. 1974. *Leptospira pomona* and reproductive failure in California sea lions. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 165: 996- 998.
- Smith, A.W., R.J. Brown, D.E. Skilling, H.L. Bray y M.C. Keyes. 1977. Naturally-occurring leptospirosis in northern fur seals (*Callorhinus ursinus*). *J. Wild. Dis.* 13: 144-148.
- Sommerville, C.C., I.T. Knight, W.L. Straube y R.R. Colwell. 1989. Simple, rapid method for direct isolation of nucleic acids from aquatic environments. *App. Environ. Microbiol.* 55: 548-554.
- Stalheim, O.V.H. 1965. Leptospiral lysis by lipids of renal tissue and milk. *J. bacteriol.* 89: 545.

- Stallman, N. 1984. International Committee on Systematic Bacteriology. Subcommittee on the taxonomy of *Leptospira*. Minutes of the meeting 6 to 10 August, 1983, Boston, Massachussets. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34:258-259.
- Stamper, M.A., F.M.D. Gulland y T. Spraker. 1998. Leptospirosis in rehabilitated Pacific Harbor seals from California. *J. Wild. Dis.* 34: 407-410.
- Thiermann, A.B. 1981. The Norway rat as a selective chronic carrier of *Leptospira interrogans*. *J. Wild. Dis.* 17:39-43.
- Thiermann, A.B. 1982. Experimental leptospiral infection in pregnant cattle with organisms of the Hebdomadis serogroup. *Am. J. Vet. Res.* 43:780-784.
- Thiermann, A.B. 1984. Leptospirosis: Current developments and trends. *J. Am. vet. Med. Assoc.* 184: 722-725.
- Topley, D. y G.A.Wilsons, 1983. Principles of bacteriology, virology and immunity. En: Wilsons, G. A. Miles y M.T. Parker (eds.). Systematic Bacteriology 7<sup>th</sup> ed. G. Edward Arnold, New York. 537 pp.
- Van Eys, G.J.J.M., C. Gravekamp, M.J. Gerritsen, W. Quint, M.T.E. Cornelissen, J. Terscheget y W.J. Terspstra. 1989. Detection of leptospires in urine by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27: 2258-2262.
- Vedros, N.A., A.W. Smith, J. Schonewald, G. Migaki y R. Hubbard. 1971. Leptospirosis epizootic among California sea lions. *Science* 172: 1250-1251.
- Visser, I.K., E.J. Vedder, H.W. Vos, M.W. van de Bildt y A.D. Osterhaus. 1993. Continued presence of phocine distemper virus in the Dutch Wadden Sea seal population. *Vet. Rec.* 133(13): 320-322.

- Villa, R.B. 1979. Algunas aves y la rata noruega *Rattus norvegicus* vs el murciélago insulano *Pizonyx vivese* en las islas del Mar de Cortés, México. *Anales del Instituto de Biología, UNAM. Zoología* 50: 729-739.
- Vivek, N.R., P.G. Babu, K. Song, R.R. Melland, C. Gnanamuthu, N.K. Saraswathi, M. Chandy, M.S. Godec, T. J. John y R. Yanagihara. 1993. Sequence analysis of human T cell lymphotropic virus type 1 strains from Southern India: gene amplification and direct sequencing from whole blood blotted on filter paper. *J. Gen. Virol.* 74: 2799-2805.
- Wagenaar, J., R.L. Zuerner, D. Alt y C.A. Bolin. 2000. Comparison of polymerase chain reaction assays with bacteriology, culturing, immunofluorescence, and nucleic acid hybridization for detection of *leptospira borgpetersenii* serovar *hardjo* in urine of cattle. *Am. J. Vet. Res.* 61: 316-320.
- Woo, T.H.S., L.D. Smythe, M.L.Symonds, M.A. Norris, M.T. Dohnt y B.K.C. Patel. 1997. Rapid distinction between *Leptospira interrogans* by PCR amplification of 23s ribosomal DNA. *FEMS Microbiol. letters* 150:9-18.
- Zar, J.H. 1999. Biostatistical Analysis. Prentice Hall. Cuarta edición. New Jersey. 663 pp.
- Zavala, G.A.1990. La población del lobo marino común (*Zalophus californianus californianus*) en las Islas del Golfo de California. Facultad de Ciencias. UNAM. Tesis de licenciatura. México, D.F. 253 pp.
- Zavala, G.A.1993. Biología poblacional del lobo marino de California, *Zalophus californianus californianus* (Lesson, 1828) en la región de las Grandes Islas del Golfo de California, México. Facultad de Ciencias. UNAM. Tesis de maestría. México, D.F. 171 pp.

