

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias en Ciencias de la Vida
con orientación en Biología Ambiental**

**Detección de patógenos de importancia en pardela mexicana
(*Puffinus opisthomelas*) anidante en Isla Natividad**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Maressa Arely Polito Zamarron

Ensenada, Baja California, México
2018

Tesis defendida por

Maressa Arely Polito Zamarron

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Cecilia Soldatini
Directora de tesis

Dra. Aines Del Carmen Castro Prieto
Co-directora de tesis

Miembros del comité

Dr. Yuri Vladimir Albores Barajas

Dr. Axayácatl Rocha Olivares

Dr. Horacio Jesús De La Cueva Salcedo.



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Maressa Arely Polito Zamarron** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la vida con orientación en Biología ambiental.

Detección de patógenos de importancia en pardela mexicana (*Puffinus opisthomelas*) anidante en Isla Natividad

Resumen aprobado por:

Dra. Cecilia Soldatini
Directora de tesis

Dra. Aines Del Carmen Castro Prieto
Co-directora de tesis

Utilizando herramientas genéticas moleculares se determinó la exposición de Pardela mexicana (*Puffinus opisthomelas*) anidante en Isla Natividad, Baja California Sur a patógenos zoonóticos. Estos incrementan el riesgo de extinción por enfermedades infecciosas. Debido a la presencia de aves migratorias y otras especies introducidas en la isla, las cuales actúan como dispersoras y fuentes de patógenos, existe una alta probabilidad de exposición de esta pardela a los patógenos zoonóticos. Se seleccionaron cinco patógenos: *Chlamydophila psittaci*, *Mycobacterium avium*, *Salmonella* spp., *Toxoplasma gondii* y *Avipoxvirus* sp. Su prevalencia fue analizada en una muestra de 31 individuos de Pardela mexicana. Además, se determinó la prevalencia de los patógenos en una muestra de siete individuos de Gaviota (*Larus occidentalis*) para identificar los posibles de vectores de transmisión. La presencia de patógenos en ambas especies se determinó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en muestras de sangre y cloacales. En Pardela mexicana, se observó una prevalencia del 90% en sangre y 77% en muestras cloacales para *M. avium*; no se observaron lesiones proliferativas que hicieran sospechar de la existencia de viruela aviar en la población; no se observó la presencia de salmonella; debido a dificultades técnicas los resultados para *C. Pistacci* y *T. gondii* no fueron concluyentes para descartar su presencia. Los resultados muestran que hay una baja exposición de la Pardela mexicana a patógenos zoonóticos considerando la presencia de aves migratorias y especies introducidas que co-habitan en la isla. Los resultados sugieren que uno de los principales dispersores de enfermedades dentro de la población de Pardela es la Gaviota pero los mecanismos de transmisión no son del todo claros. Los análisis estadísticos evidenciaron un efecto de la infección por *M. avium* sobre la condición corporal de los individuos; que el sexo de los individuos tiene un efecto sobre el tamaño estructural y que las hembras de mayor tamaño estructural son infectadas más fácilmente.

Palabras clave: ave marina, infección, prevalencia.

Abstract of the thesis presented by **Maressa Arely Polito Zamarron** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree with orientation in Environmental Biology.

Pathogen surveillance in Black-vented shearwater nesting on Natividad Island

Abstract approved by:

Dra. Cecilia Soldatini
Thesis Director

Dra. Aines Del Carmen Castro Prieto
Thesis co-director

Using molecular genetic tools, the exposure of Mexican Shearwater (*Puffinus opisthomelas*) nesting on Isla Natividad, Baja California Sur to zoonotic pathogens was determined. Pathogens increase the risk of extinction due to infectious diseases. There is a high probability of exposure of Black vented shearwater to zoonotic pathogens due the presence of migratory birds and some other introduced species in the island, which act as dispersers and pathogen sources. A total of five pathogens, including *Chlamydophila psittaci*, *Mycobacterium avium*, *salmonella spp*, *Toxoplasma gondii* y *Avipoxvirus* were chosen for this study. The prevalence of each pathogen was analyzed in 31 Black vented shearwater individuals. Additionally, the prevalence of the pathogens previously mentioned was determined in 7 Western Gull (*Larus occidentalis*) individuals to identify possible sources of transmission vectors. The presence of each pathogen was determined by the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique in blood and cloacal samples of both species. A 90% prevalence of *M. avium* was observed in Black vented shearwater blood samples and 77% for cloacal samples; no proliferative lesions that would suggest the presence of Avian pox in the population were observed; the presence of salmonella in the population was not observed; as for *C. Pistacci* and *T. gondii* the results were not conclusive to rule out the presence within the population, due to technical difficulties. Generally, the results show there is a low exposure of the Black vented shearwater to zoonotic pathogens, considering the presence of migratory birds and introduced species that co-inhabit the island. The results also suggest that one of the primary diseases vector within the population of Black vented shearwater at Natividad Island are the Western Gulls (*Larus occidentalis*), however, the transmission mechanisms are not clear. Finally, the statistical analyzes made evident an effect of the infection by *M. avium* on the body condition of the individuals; they also show that females with larger structural sizes are more easily infected and that the sex of individuals has an effect on structural size.

Key words: seabird, infection, prevalence.

Dedicatoria

A mi amado esposo, Omar Bojórquez.

Quiero dedicarte este trabajo, porque tú más que nadie sabe todo lo que costó llegar hasta el final. No hay palabras que alcancen a expresar lo que tú has significado y todo lo que has aportado durante la realización del proyecto. Primero, gracias por creer en mí, por animarme a entrar a la maestría. Gracias por soportar la distancia, los días difíciles y hacerme ver que todo sacrificio tiene su recompensa. Gracias por que cuando pase una de las situaciones más difíciles a las que me he enfrentado, tuviste el amor, la paciencia y el valor de quedarte a mí lado y apoyarme hasta que de nuevo pude encontrar estabilidad.

Gracias por tu amor incondicional.

Te amo.

Agradecimientos

Al CONACyT por la beca otorgado bajo el número 613299.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, que me dio la oportunidad de desarrollar mi tema de tesis.

A The Next Generation Sonoran Desert Researchers (N-Gen) por la beca estudiantil otorgada para el financiamiento del proyecto.

A Cecilia Soldatini, directora del proyecto, por guiarme y asesorarme en el trayecto.

A Aines Castro, co- directora del proyecto, por su apoyo y enseñanzas en el área molecular de la tesis.

Al Dr. Yuri Albores, Dr. Horacio De la Cueva y Dr Axayacatl Rocha por sus comentarios, sugerencias y observaciones en el escrito.

Al Dr. Francisco Vazquez, Dr. David Reyes, M en C Guillermo Bojórquez y Al Biol. Oscar Zavala, gracias por darme un espacio en sus laboratorios y apoyarme en todo momento.

A Martha por su ayuda con los estadísticos.

A Miriam García y Blanca Trevizo por su ayuda en el laboratorio.

A Lucero por la ayuda brindada cuando lo necesitaba.

Al Dr. Oscar Esparza por tomarse el tiempo de explicarme los fundamentos de los estadísticos utilizados.

A Wiliam y a Yair por darme hospedaje, escucharme, cuidarme y alentarme. Los amo.

A Sandra, Jamvier y Alberto, gracias por su Amistad incondicional. Los amo.

A mí tía Rebeca y Glenda, por sus palabras de aliento, sus cuidados y por estar al pendiente de mí.

A mis suegros, cuñadas y sobrina, por siempre creer en mí. Gracias.

A todos aquellos que de alguna manera contribuyeron a hacer este sueño realidad.

Tabla de contenido

Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	x
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	2
1.1.1 Enfermedades emergentes.....	2
1.1.2 Viruela aviar:.....	3
1.1.3 Enfermedades zoonóticas:.....	3
1.1.4 Clamidiosis aviar:.....	3
1.1.5 Tuberculosis aviar:.....	4
1.1.6 Toxoplasmosis:.....	4
1.1.7 Salmonelosis:.....	5
1.1.8 Gatos ferales en Isla Natividad.....	6
1.2 Justificación.....	6
1.3 Hipótesis.....	6
1.4 Objetivos.....	7
1.4.1 Objetivo general.....	7
1.4.2. Objetivos específicos.....	7
Capítulo 2. Metodología.....	8
2.1 Especies de interés y área de estudio.....	8
2.1.1 Especies de interés.....	8
2.1.2 Área de estudio.....	8
2.2 Colecta de muestras de Pardela mexicana.....	9
2.3 Colecta de muestras de Gaviota occidental.....	10
2.4 Análisis de muestras en laboratorio.....	10
2.4.1 Sexado.....	10
2.4.2 Extracción de ADN de los controles positivos:.....	10

2.4.3 Extracción de ADN de tejido sanguíneo	12
2.4.4 Extracción de ADN de muestras cloacales:.....	12
2.4.5 Cuantificación de ADN:.....	13
2.4.6 Ensayo de PCR.....	13
2.4.7 Secuenciación Sanger	16
2.4.8 Análisis estadísticos.....	16
Capítulo 3. Resultados.....	18
3.1 Sexado.....	18
3.2 Viruela aviar (inspección visual de lesiones).....	18
3.3 Ensayo de PCR en Pardela mexicana	18
3.3.2 <i>Clamidiosis aviar</i>	18
3.3.2 <i>Salmonelosis</i>	20
3.3.3 Tuberculosis aviar	21
3.3.4 Toxoplasmosis	24
3.4 Ensayo de PCR en Gaviota occidental.....	25
3.4.1 Clamidiosis aviar.....	25
3.4.2 Salmonelosis	25
3.4.3 Tuberculosis aviar.....	26
3.4.4 Toxoplasmosis	27
3.5 Secuenciación Sanger	27
3.6 Análisis estadísticos	27
Capítulo 4. Discusión	32
Capítulo 5. Conclusiones	36
Literatura citada	37

Lista de figuras

- Figura 1** Amplificación de un fragmento (76 pb) del gen ompA en muestras de sangre de la Pardela mexicana. Carriles 1-15 (muestras 1-15) y 19-25 (muestras 16-22); Carril 16, marcador de peso molecular de 50 pb; carril 17, control positivo; carril 18, control negativo. 19
- Figura 2** Amplificación de un fragmento (76 pb) del gen ompA en muestras cloacales de Pardela mexicana. Carriles 1-15(muestras 1-15) y 19-30 (muestras 16-27); Carril 16, marcador de peso molecular de 50 pb; carril 17, control positivo; carril 18, control negativo 19
- Figura 3** Amplificación de un fragmento (85 pb) del gen fimA en muestras de sangre de la Pardela mexicana. Carriles 1-15 (muestras 1-15), 19-25 (muestras 16-22); Carril 16, marcador de 50 pb; carril 17, control positivo; carril 18, control negativo. 20
- Figura 4** Amplificación de un fragmento (85 pb) del gen fimA en muestras cloacales de la Pardela mexicana. Carriles 1-15 (muestras 1-15) y 19-30 (muestras 16-27); Carril 16, marcador de peso molecular de 50 pb: carril 17, control positivo; carril 18, control negativo. 20
- Figura 5** Amplificación de un fragmento (219 pb) de la región espaciadora entre 16S-23S del ARN en muestras de sangre de la Pardela mexicana. Carriles 1-5 (muestras 1-5) y 9-13 (muestras 6-10); Carril 6, marcador de peso molecular de 50 pb; carril 7, control positivo; carril 8, control negativo. 21
- Figura 6** Amplificación de un fragmento (219 pb) de la región espaciadora entre 16S-23S del ARN en muestras de sangre de la Pardela mexicana. Carriles 1-5 (muestras 11-15) y 9-13 (muestras 16-20); carril 6, marcador de peso molecular, carril 7, control positivo; carril 8, control negativo. 21
- Figura 7** Amplificación de un fragmento (219 pb) de la región espaciadora entre 16S-23S del ARN en muestras de sangre de la Pardela mexicana. Carriles 4 y 5 (Muestras 21 y 22); Carril 1, marcador de peso molecular de 50 pb; carril 2, control positivo; carril 3, control negativo. 22
- Figura 8** Amplificación de un fragmento (219 pb) de la región espaciadora entre 16S-23S del ARN en muestras cloacales de la Pardela mexicana. Carriles 1-5(muestras 1-5) y 9-13 (muestras 6-10); Carril 6, marcador de peso molecular de 50 pb; carril 7, control positivo; carril 8, control negativo. 22
- Figura 9** Amplificación de un fragmento de 219 pb de la región espaciadora entre 16S-23S del ARN en muestras cloacales de la Pardela mexicana. Carriles 1-5(muestras 1-5) y 9-13 (muestras 16-20); Carril 6, marcador de peso molecular de 50 pb; carril 7, control positivo; carril 8, control negativo. 23
- Figura 10** Amplificación de un fragmento (219 pb) de la región espaciadora entre 16S-23S del ARN en muestras cloacales de la Pardela mexicana. Carriles 1-5(muestras 21-25) y 9-10 (muestras 21-27); Carril 6, marcador de peso molecular; carril 7, control positivo; carril 8, control negativo. 23

- Figura 11** Amplificación de un fragmento (469 pb) del gen B1 en muestras de sangre de la Paredela mexicana. Carriles 1-10 (muestras 1-10) y 13-24 (muestras 11-22); Carril 11, marcador de peso molecular; carril 12, control negativo. 24
- Figura 12** Amplificación de un fragmento (469 pb) del gen B1 en muestras cloacales de la Paredela mexicana. Carriles 1-15(muestras 1-15) y 18-29 (muestras 16-27); Carril 11, marcador de peso molecular; carril 12, control negativo. 24
- Figura 13** Amplificación de un fragmento (76 pb) del gen ompA en muestras de sangre y cloacales de gaviota occidental; Carriles 1-7(muestras de sangre) y 11-17 (muestras cloacales). Carril 8, marcador de peso molecular de 50 pb; carril 9, control positivo; carril 10, control negativo. 25
- Figura 14** Amplificación de un fragmento (85 pb) del gen fimA en muestras de sangre y cloacales de gaviota occidental; Carriles 1-7(muestras de sangre) y 11-17 (muestras cloacales). Carril 8, marcador de peso molecular de 50 pb; carril 9, control positivo; carril 10, control negativo. 26
- Figura 15** Amplificación de un fragmento (219 pb) de la región espaciadora entre 16S-23S del ARN en muestras de sangre y cloacales de gaviota occidental; Carriles 1-7(muestras de sangre) y 11-17 (muestras cloacales). Carril 8, marcador de peso molecular; carril9, control positivo; carril 10, control negativo..... 26
- Figura 16** Amplificación de un fragmento (469 pb) del gen B1 en muestras de sangre y cloacales de gaviota occidental (*Larus occidentalis*); Carriles 1-7(muestras de sangre) y 11-17 (muestras cloacales). Carril 8, marcador de peso molecular; carril 9, control negativo..... 27
- Figura 17** Prueba de normalidad del conjunto de datos. Se muestra la distribución normal 28
- Figura 18** Valores de PCA1 en relación con medidas del pico de hembra y macho. Los valores altos de PCA1 se adjudican a individuos con tamaño estructural más pequeño..... 28
- Figura 19** Valores de PCA1 en relación con medidas de cabeza y pico de hembra y macho. Los valores altos de PCA1 se adjudican a individuos con tamaño estructural más pequeño.....29
- Figura 20** Valores de PCA1 en relación con medidas del ala de hembra y macho. Los valores altos de PCA1 se adjudican a individuos con tamaño estructural más pequeño.....29
- Figura 21** Comparación de los valores de PCA e infección por *M. avium* respecto al sexo. Se observan hembras de mayor tamaño estructural infectadas.. 30
- Figura 22** Comparación de los valores de condición corporal e infección por *M. avium* respecto al sexo. Se observa que los individuos sanos son aquellos con mejor condición corporal..... 31

Lista de tablas

Tabla 1 Condiciones de PCR para la detección de <i>Chlamydomphila psittaci</i>	14
Tabla 2 Condiciones de PCR para la detección de <i>Mycobacterium avium</i>	15
Tabla 3 Condiciones de PCR para la detección de <i>Toxoplasma gondii</i>	15
Tabla 4 Condiciones de PCR para la detección de <i>Salmonella</i> spp.	16

Capítulo 1. Introducción

Las evaluaciones de salud proporcionan información de línea base sobre una especie de interés y pueden ser útiles para establecer parámetros de referencia, reconocer amenazas, hacer análisis de viabilidad de la población, determinar el estado de salud y hacer comparaciones futuras después de algún disturbio o exposición a enfermedades (Deem *et al.*, 2001; Padilla *et al.*, 2003; Padilla *et al.*, 2006).

En los últimos años se han elevado los casos de mortalidad en la fauna silvestre por epizootias, causando declive en las poblaciones y pérdida de la diversidad (Newman *et al.*, 2007). La exposición a fuentes de estrés ambiental como cambio de hábitat, clima, escasez de recursos y actividades humanas, puede disminuir la inmunocompetencia individual, es decir, la capacidad de contrarrestar y limitar una infección y así, facilitar la aparición de síntomas clínicos (Beldomenico y Begon, 2009; Sebastiano *et al.*, 2017). Esto vincula el estrés ambiental con la aparición de alteraciones fisiológicas (enfermedad), ya que el aumento de las especies de oxígeno reactivo (ROS) pueden conducir a un estado de desequilibrio en favor de las moléculas oxidantes produciendo un daño oxidativo a las células y favorecer la ocurrencia de enfermedad (Sebastiano *et al.*, 2017). El riesgo de extinción por enfermedades infecciosas y emergentes se incrementa en especies de poblaciones amenazadas o en peligro de extinción caracterizadas en su mayoría por tamaños de población bajos (históricos o contemporáneos), diversidad genética reducida y distribución geográfica limitada (Azipri *et al.*, 2000). A diferencia de las poblaciones de aves continentales, las aves marinas que habitan en islas pueden ser particularmente susceptibles a nuevas enfermedades debido a que, por su distribución geográfica limitada, han estado expuestas a menos patógenos (v.g. microorganismos capaces de producir enfermedad) (Padilla *et al.*, 2006). La prevalencia (v.g. casos positivos para una enfermedad) y la incidencia (v.g. número de casos nuevos de enfermedad) son medidas de frecuencia de una enfermedad y deben tomarse en cuenta debido a que las aves son vulnerables a adquirir infecciones por patógenos en todas las etapas del ciclo de vida, pero la exposición a estos aumenta por sexo, edad, época del año, hábitos gregarios y la capacidad del microorganismo de dañar al hospedero (v.g. virulencia) (Benskin *et al.*, 2009). Uno de los principales mecanismos de dispersión de estos agentes son las migraciones anuales de algunas aves. Además de esto, se sabe que las especies invasoras son fuentes de patógenos, así como impulsores de la disminución y extinción de formas de vida silvestre nativas de las islas (Hubálek, 2004; Jourdain *et al.*, 2007; Deem *et al.*, 2010; De Wit, 2017). Una herramienta que beneficia la conservación de la biodiversidad de islas es la erradicación de las especies invasoras, esto reduce o elimina las enfermedades transmitidas por estos individuos (De Wit, 2017).

La Pardela mexicana (*Puffinus opisthomelas*) es un ave marina endémica de México, su población se encuentra en el Pacífico adyacente a Norte América. Más del 95% de la población anida en Isla Natividad (Keitt *et al.*, 2003; Keitt *et al.* 2004). La presencia en la isla de algunas especies de aves migratorias, tales como zarapito trinador (*Numenius phaeopus*), vuelvepedras negro (*Arenaria melanocephala*), playero Pihuiuí (*Tringa semipalmata*), ostrero (*Haematopus palliatus*), charrán elegante (*Thalasseus elegans*) y pavito migratorio (*Setophaga ruticilla*), así como la presencia de mamíferos tales como la ardilla antílope (*Ammospermophilus leucurus*), ratón ciervo (*Peromyscus maniculatus*) y gatos ferales (*Felis catus*) (Berlanga *et al.*, 2015), estos últimos erradicados a finales de los 90, aumentan la probabilidad de que la pardela mexicana contraiga enfermedades infecciosas que pueden afectarle negativamente (Keitt *et al.*, 2002; Keitt y Tershy, 2003).

El objetivo de este trabajo fue monitorear la presencia de patógenos comúnmente encontrados en aves marinas a los que podría haber sido expuesta potencialmente la Pardela mexicana por el contacto con otras aves marinas migratorias y la presencia histórica de especies invasoras en la isla. Para la identificación de patógenos específicos en la pardela mexicana en Isla Natividad se utilizaron herramientas genéticas moleculares en muestras de sangre y cloacales colectadas durante la temporada de anidación 2017. Adicionalmente, se investigó la presencia de los patógenos seleccionados en la Gaviota occidental (*Larus occidentalis*), un ave marina que cohabita con la Pardela mexicana en la Isla, con el objetivo de identificar potenciales vectores de transmisión de los patógenos seleccionados. Se ha sugerido que las gaviotas pueden ser una fuente de infección al adquirir patógenos de desechos humanos e infectar el ambiente con sus heces o al entrar en contacto con otras aves.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Enfermedades emergentes

Las enfermedades emergentes son aquellas que han aparecido por primera vez en una población o que existieron con anterioridad pero que han aumentado su incidencia; son una amenaza para la fauna silvestre, particularmente para poblaciones geográficamente aisladas o en peligro crítico de extinción (Robinson, 2010; Miller *et al.*, 2014). La viruela aviar es un ejemplo de este tipo de enfermedades por lo que fue seleccionada en este estudio para investigar la presencia del virus en la población de Pardela mexicana de Isla Natividad.

1.1.2 Viruela aviar:

La viruela aviar es causada por virus del género *Avipoxvirus* de la familia Poxviridae. La partícula del virus es grande y ovalada, aproximadamente 150 a 250 nm por 265 a 350 nm (Thomas *et al.*, 2008). Existen dos formas de viruela aviar: cutánea (proliferación discreta de lesiones en la piel) y húmeda (involucra membranas mucosas del sistema respiratorio). La forma cutánea es más comúnmente reportada en aves silvestres y se caracteriza por debilitamiento, alteraciones en la vista y respiración, nódulos en las regiones sin plumas e infecciones secundarias bacterianas o fúngicas de las lesiones. La transmisión del Avipoxvirus puede ocurrir de diferentes maneras que incluyen pequeñas abrasiones en la piel, infección por medio de aparato bucal de artrópodos como mosquitos y ácaros o por contacto entre aves infectadas durante vuelos migratorios o con objetos contaminados (Thomas *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2014).

Estudios anteriores han reportado infecciones por poxvirus en 287 especies de aves pertenecientes a 70 familias y 20 órdenes, donde se incluyen miembros del género *Puffinus* (Nuttall *et al.*, 1985 Thomas *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2014). Además, Van Riper *et al.*, (2002) señalan que las poblaciones que están aisladas en islas se ven más afectadas puesto que las aves en continentes han tenido una mayor coevolución con los virus.

1.1.3 Enfermedades zoonóticas:

Las enfermedades zoonóticas son aquellas que pueden ser transmitidas de animales a seres humanos mediante contacto, consumo o inhalación (Miller *et al.*, 2014). Clamidiosis aviar, tuberculosis aviar, toxoplasmosis y salmonelosis son ejemplos de enfermedades zoonóticas comunes en aves por lo que fueron seleccionadas en este estudio para investigar la presencia de los patógenos correspondientes que ocasionan cada una de estas enfermedades en la población de Pardela mexicana de Isla Natividad.

1.1.4 Clamidiosis aviar:

La clamidiosis aviar es una enfermedad infecciosa causada por *Chlamydochlamydia psittaci*, que se clasifica como una bacteria intracelular Gram-negativa. *C. psittaci* posee dos formas morfológicas: cuerpo elemental (EB) y cuerpo reticular (RB). El cuerpo elemental es la forma infecciosa del organismo, es esférico y mide de 0.2-0.3 µm de diámetro. Durante esta fase se adhiere a la célula huésped y finalmente entra en ella para convertirse en un cuerpo reticular, este es alargado, con un diámetro de 0.5-2.0 µm, se divide por fisión binaria y al madurar se convertirá nuevamente en un cuerpo elemental, comenzando de nuevo el ciclo infeccioso (Harkinezhad *et al.*, 2009).

Chlamydophila psittaci puede infectar cerca de 465 especies de aves (Harkinezhad *et al.*, 2009) (entre aves silvestres y de granjas). La transmisión entre aves puede ocurrir por la cercanía de un individuo infectado a otro; normalmente el agente patógeno es evacuado en excretas o en descargas nasales y esto es un foco de infección para humanos y otras aves. Dependiendo de la cepa y del hospedero, *C. psittaci* puede causar pericarditis, aerosaculitis, neumonía, adenitis nasal, peritonitis, hepatitis y esplenitis. La infección generalizada resulta en fiebre, anorexia, letargo, diarrea, shock o muerte (Harkinezhad *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2011).

C. psittaci es un patógeno zoonótico y es un tema importante en salud pública puesto que los humanos pueden ser contagiados por diferentes vías: mordidas, manejo de plumaje o tejidos infectados del ave, inhalación del patógeno de secreciones respiratorias, orina y heces secas que se dispersan en el aire como aerosol o partículas de polvo (Harkinezhad *et al.*, 2009).

1.1.5 Tuberculosis aviar:

La tuberculosis aviar es una enfermedad causada por un bacilo Gram-positivo del género *Mycobacterium*. La especie patógena que causa la enfermedad en aves es *Mycobacterium avium*. Todas las especies de aves son susceptibles a contraer la bacteria. En las aves silvestres la tuberculosis aviar se encuentra más frecuentemente en las especies que viven en estrecha relación con el ganado doméstico y carroñeros. Puede ser transmitida por contacto directo con aves infectadas, ingesta de agua y comida contaminada o por contacto con un ambiente contaminado. Además, la inhalación de la bacteria puede producir infecciones del tracto respiratorio (Friend, 2001; Thomas *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2014).

Las aves infectadas estarán débiles y tendrán desgaste muscular, además pueden presentar diarrea, anorexia, letargo, disnea, adelgazamiento, cojera y nódulos alrededor de ojos y en articulaciones de las alas; algunas aves mueren sin presentar signos o lesiones externas (Thomas *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2014).

1.1.6 Toxoplasmosis:

La toxoplasmosis es una enfermedad ocasionada por *Toxoplasma gondii*, un protozoo parásito distribuido mundialmente. Los miembros de la familia Felidae actúan como su hospedero definitivo, sin embargo, puede infectar a humanos y animales homeotermos, incluidas las aves. Al ser infectadas, los signos clínicos que presentan las aves no son específicos, pero destacan algunos tales como: diarrea, anorexia y dificultad respiratoria que pueden llevar a la muerte (Tenter *et al.*, 2000; Work *et al.*, 2002; Deem *et al.*, 2010; Elmore *et al.*, 2010). Los gatos ingieren quistes de *T. gondii* contenidos en los tejidos de

huéspedes intermedios. Los quistes se desintegran dentro del estómago y del intestino delgado. Después de la multiplicación y reproducción dentro de las paredes de los intestinos, los ooquistes se traspasan en las heces y pueden sobrevivir en el medio ambiente durante varios meses. Son resistentes a desinfectantes, congelamiento y desecación. En el ambiente externo, los ooquistes se vuelven infecciosos y pueden ser ingeridos. Los quistes se forman en los tejidos de los huéspedes intermedios, principalmente en el tejido muscular y nervioso y pueden persistir durante años (Miller *et al.*, 2014). Los humanos pueden ser infectados por ingestión de quistes en carne o por inhalación de ooquistes en el ambiente (Dubey, 2010).

Algunos estudios demuestran que, en islas del Pacífico, donde los gatos domésticos fueron introducidos, las aves presentan infección por *T. gondii* (Deem *et al.*, 2010).

1.1.7 Salmonelosis:

La salmonelosis es causada por un bacilo Gram-negativo del género *Salmonella*, el cual se distribuye mundialmente. En aves de vida silvestre, es la causa más común de muerte esporádica, particularmente entre los juveniles (Thomas *et al.*, 2008).

La localización de la infección hace que las manifestaciones clínicas varíen, pero los síntomas generales que presentan las aves enfermas son: inestabilidad, temblores, escalofrío, convulsiones, falta de coordinación, pérdida de apetito, aumento o disminución de la sed, pérdida rápida de peso, respiración acelerada, heces acuosas amarillas, verdes o teñidas de sangre (Friend, 1999; Thomas *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2014)

Las aves infectadas pueden arrojar la bacteria *Salmonella* en sus heces, contaminando pastos y aguas superficiales, las largas distancias que recorren en sus movimientos anuales las hace dispersores eficaces de la enfermedad (Thomas *et al.*, 2008; Ramos *et al.*, 2010)

Todas las especies de aves son susceptibles a la infección por salmonelosis, pero los brotes se informan con mayor frecuencia en asociación con aves paseriformes y aves acuáticas coloniales (Miller *et al.*, 2014). Ramos *et al.* (2010) enfatizan que estudios previos sobre aves marinas han encontrado resultados negativos para salmonella, sugiriendo que éstas, adquieren la bacteria después de la exposición a entornos alterados por el ser humano, particularmente basura.

1.1.8 Gatos ferales en Isla Natividad

En Isla Natividad los gatos ferales cubrían gran parte de su dieta alimentándose de Pardela mexicana, esto representaba un gran riesgo para la población de Pardela mexicana puesto que causaba efectos negativos en la viabilidad de la población, por esta razón y gracias a un programa de restauración, fueron erradicados en el 2000 (Keitt *et al.*, 2002; Keitt y Tershy, 2003; Ramírez *et al.*, 2009).

1.2 Justificación

La concentración de la población anidante de Pardela mexicana en isla Natividad, la categoriza como altamente vulnerable a perturbaciones ambientales y como tal, como especie en peligro de extinción según la NOM-059 (SEMARNAT, 2010). Al estar en contacto con aves migratorias y especies introducidas en la isla, el riesgo de exposición a nuevos agentes infecciosos de la Pardela mexicana es elevado, por tal motivo, es importante realizar monitoreos que descarten o confirmen la presencia de patógenos relevantes para la salud de la población que puedan potencialmente incrementar el riesgo de extinción por enfermedades infecciosas de la especie.

1.3 Hipótesis

Debido a la presencia de aves migratorias y otras especies introducidas en la Isla Natividad, las cuales actúan como dispersoras y fuentes de patógenos, existe una alta exposición de la población endémica de Pardela mexicana a patógenos que pueden causar enfermedades epizooticas, por lo tanto, la probabilidad de detectar los patógenos que pueden causar cada una de las enfermedades descritas previamente en las muestras de sangre y cloacales de la Pardela mexicana es muy alta.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Determinar la exposición a patógenos que puedan incrementar el riesgo de extinción por enfermedad en la población de Pardela mexicana anidante en Isla Natividad así como investigar el papel de la Gaviota occidental como fuente de dispersión de patógenos zoonóticos en la Isla Natividad.

1.4.2. Objetivos específicos

Detectar la presencia de *Chlamydothlyla psittaci* en Pardela mexicana mediante la técnica de genética molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Detectar la presencia de *Mycobacterium avium* en Pardela mexicana mediante la técnica de genética molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Detectar la presencia de *Toxoplasma gondii* en Pardela mexicana mediante la técnica de genética molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Detectar la presencia de *Salmonella* spp. en Pardela mexicana mediante la técnica de genética molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Detectar la presencia de *Chlamydothlyla psittaci* en Gaviota occidental mediante la técnica de genética molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Detectar la presencia de *Mycobacterium avium* en Gaviota occidental *L. occidentalis* mediante la técnica de genética molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Detectar la presencia de *Toxoplasma gondii* en Gaviota occidental *L. occidentalis* mediante la técnica de genética molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Detectar la presencia de *Salmonella* spp. en Gaviota occidental *L. occidentalis* mediante la técnica de genética molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Capítulo 2. Metodología

2.1 Especies de interés y área de estudio

2.1.1 Especies de interés

La Pardela mexicana, *Puffinus opisthomelas*, Coues, 1864, es una especie endémica de México, es un ave marina nocturna y de talla mediana que anida en madrigueras. Se alimenta de peces pelágicos y es gregaria en las zonas de anidación y alimentación (Keitt *et al.*, 2003; Velarde, 2008). Comúnmente es depredada por Gaviota occidental, *Larus occidentalis*, Cuervo, *Corvus corax*, y Halcón peregrino, *Falco peregrinus*. (Keitt *et al.* 1998; Keitt *et al.*, 2003). Actualmente se reconoce como especie “En peligro de extinción” en la NOM-059 y como “casi amenazada” en el listado de la IUCN (SEMARNAT, 2010; BirdLife International, 2016). En Isla Natividad se reproduce el 95% de la población mundial, el tamaño de la población fue estimado en 37,858 ($\pm 8,510$ SD) en 2016, y 46,322 (± 4931 SD) en 2017 (Albores-Barajas *et al.*, 2018).

La Gaviota occidental, *Larus occidentalis*, es un ave de talla grande ya que puede llegar a medir 64 cm de longitud y pesar 1 kg. Es la única gaviota que anida a lo largo de la mayor parte de la costa del Pacífico y es común en todas las estaciones del año. Es un ave oportunista que roba huevos o crías de otras aves marinas pues sitúa sus nidos alrededor de esas colonias. Su dieta consiste en peces, otras formas de vida marina, huevos, carroña y desechos de vertederos y muelles (Kaufman, 1996; Sibley, 2000).

2.1.2 Área de estudio

La Isla Natividad (27.5°N, 115.25° O) está situada a 5 km al noroeste de Punta Eugenia, Baja California Sur, México. Es una isla árida y con poca vegetación. Tiene 6 km de largo, 2.5 km de ancho, un área de 8.65 km² y una elevación máxima de 300 m. El área de la isla es una zona núcleo de la Reserva de la Biosfera El Vizcaíno y es habitada por una sociedad cooperativa de producción pesquera con concesiones desde hace varias décadas. La población total se conforma por 80 familias (SEMARNAP, 2000; Keitt *et al.*, 2003; Albores-Barajas *et al.*, 2016). Gracias a un programa de restauración, los gatos ferales, que representaban un gran riesgo para la población de Pardela mexicana, fueron erradicados del lugar en el año 2000 (Keitt *et al.*, 2002; Keitt y Tershy, 2003). Después de documentar y comprobar el aumento de mortalidad en la población debido a infraestructura construida en la zona de la colonia, se actuó para removerla (Albores-Barajas *et al.*, 2016). En la isla se está tratando de encontrar una solución para manejar los desechos

sólidos, en 2017 iniciaron la colecta de plásticos y metales para reciclaje (SEMARNAP, 2000, Coop. Buzos y Pescadores com. pers.).

2.2 Colecta de muestras de Pardela mexicana

- a) Captura de individuos: se capturaron 31 individuos adultos durante la fecha comprendida del 26 de marzo al 5 de abril de 2017, fueron extraídos de sus madrigueras de forma manual. Se anillaron con anillo con código individual alfanumérico para el reconocimiento posterior. Las actividades de captura para anillamiento están respaldadas por el permiso SGPA/DGVS/00321/16, 21 de enero de 2016 y su extensión SGPA/DGVS/003843/16, 22 abril 2016 y renovación SGPA/DGVS/00404/17 del 20 de enero del 2017.
- b) Medidas biométricas: se tomaron medidas de tarso (mm), longitud del culmen (mm), longitud craneal (mm) (v.g. distancia del occipucio a la punta del pico) y profundidad de pico (mm) (v.g. espesor vertical de las fosas nasales) utilizando un vernier, para la medida del ala (cm) se usó una regla y se pesó utilizando una báscula de resorte. Los instrumentos utilizados para las mediciones son marca Pesola, con una precisión de $\pm 0.3\%$ de la carga.
- c) Inspección visual de lesiones: se realizó de manera individual y se observaron las áreas sin plumas (párpados, tarso, pico) buscando lesiones proliferativas en la piel (nódulos).
- d) Muestras cloacales y de excretas: se tomaron de la cloaca con un hisopo de algodón estéril, fueron preservadas dentro de un microtubo con etanol al 70% y refrigeradas a una temperatura de -20°C .
- e) Muestras de sangre: se tomaron 100 μl de sangre, extraídas de la vena del tarso y en ocasiones de la vena braquial. Para evitar la coagulación, las agujas y puntas usadas para este proceso fueron impregnadas con 1 ml de heparina, proveniente de Inhepar-PiSA, Guadalajara, México. Las muestras se centrifugaron en un modelo LW Scientific ZipCombo durante 3 minutos a 12000 rpm en un periodo no mayor a 1 hora después de la extracción y sucesivamente fueron congeladas y almacenadas a -20°C en CICESE, Unidad La Paz durante 5 meses.

- f) Las muestras sanguíneas fueron enviadas al laboratorio del Dr. Adrián Munguía Vega, ubicado en La Paz, Baja California para el sexado de los individuos.

2.3 Colecta de muestras de Gaviota occidental

- a) Captura de individuos: Se capturaron siete individuos de gaviota occidental durante las fechas comprendidas del 4 al 11 de abril de 2018.
- b) Se tomaron muestras sanguíneas y cloacales de los individuos de Gaviota siguiendo el mismo procedimiento de los pasos c y d descritos anteriormente en los métodos. No se determinó el sexo de estas muestras.

2.4 Análisis de muestras en laboratorio

2.4.1 Sexado

La determinación del sexo de los individuos de Pardela mexicana se realizó en el laboratorio del Dr. Adrián Munguía Vega, ubicado en La Paz, Baja California y se llevó a cabo mediante análisis de ADN de las muestras de tejido sanguíneo.

2.4.2 Extracción de ADN de los controles positivos:

2.4.2.1 *Salmonella*

Un cultivo de *Salmonella* fue proporcionado por el departamento de Microbiología de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (UACJ). La extracción de ADN de *Salmonella* se realizó siguiendo el protocolo indicado en el kit comercial DNeasy Blood & Tissue, provisto por Gene Technology, ubicado en la ciudad de Celaya, Guanajuato, México y con una fecha de expiración en noviembre de 2019. Una asada de la colonia fue tomada del agar y se trasladó a un tubo con caldo nutritivo, compuesto por sales biliares (citrato y desoxicolato de sodio) y tetratoato sódico. Se incubó a 37 °C por 24 horas. Posteriormente el

caldo nutritivo se vertió a un microtubo, el cual fue centrifugado en un modelo Eppendorf 5417 R a 7500 rpm durante 10 minutos. El pellet se resuspendió en 180 μ L del buffer ATL y se añadieron 20 μ L de proteinasa K. Se incubó a 56 °C durante 2 horas con agitación vórtex ocasional. Después, se añadieron 200 μ L del buffer AL, se aplicó vórtex. Se adicionaron 200 μ L de etanol y se mezcló por vórtex. El contenido del microtubo se colocó en una columna y se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto. Se descartó el filtrado y la columna se dispuso en un nuevo tubo. Se añadieron 500 μ L de buffer AW1 y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto. Se desechó el filtrado y la columna nuevamente se transportó a otra columna. Se adicionaron 500 μ L del buffer AW2 y se centrifugó a 13200 rpm por 3 minutos. La columna finalmente se colocó en un nuevo microtubo, se añadieron 50 μ L del buffer AE, se incubó a temperatura ambiente durante un minuto, se centrifugó a 8000 rpm y la elución final se refrigeró a -20°C.

2.4.2.2 *Mycobacterium*

Una muestra de esputo con baciloscopia positiva fue proporcionada por el centro de Salud Hidalgo, ubicado en Ciudad Juárez, Chihuahua. Para poder realizar la extracción de ADN fue necesario el rompimiento del moco. El proceso se realizó en una campana de bioseguridad tipo II. Al recipiente con la muestra se le añadieron 50 ml de enacetil-cisteína (NALC). La mezcla se dejó reposar 15 minutos y posteriormente se trasladó a un tubo falcón para centrifugar a 3500 rpm durante 15 minutos. Después de centrifugar la muestra se tomó 400 μ L del pellet del tubo y se resuspendió en 180 μ L del buffer de lisis enzimático. Se incubó por 40 minutos a 37 °C. Se añadieron 25 μ L de proteinasa k y 200 μ L del buffer AL. Se mezcló por vórtex y se incubó a 56 °C por 30 minutos. Se agregaron 200 μ L de etanol (96-100%) y se mezcló por vórtex. El contenido del tubo se vertió dentro de una columna y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto. Se descartó el filtrado del tubo y la columna se colocó dentro de un nuevo tubo, se añadieron 500 μ L del buffer AW1 y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto. Se descartó el filtrado del tubo. La columna nuevamente fue colocada dentro de un tubo nuevo y se agregaron 500 μ L del buffer AW2. Se centrifugó a 13200 rpm durante 3 minutos. Se descartó el filtrado del tubo y la columna fue colocada dentro de un microtubo. Se añadieron 50 μ L del buffer AE. Se incubó 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 8000 rpm por un minuto. Se refrigeró a -20 °C.

2.4.2.3 *Familia Chlamydiaceae*

Una muestra de ADN de la familia Chlamydiaceae fue proporcionada por el departamento de microbiología de la UACJ y fue utilizada como control positivo para la realización del experimento.

2.4.3 Extracción de ADN de tejido sanguíneo

Para la extracción de ADN de tejido sanguíneo se utilizó el kit comercial DNeasy Blood & Tissue. Para el proceso de extracción se utilizaron de 20-40 μL de sangre de Pardela mexicana, esto según la cantidad de muestra tomada de cada individuo. Posteriormente se colocaron 20 μL de proteinasa K dentro de un microtubo y el volumen fue ajustado a 220 μL con PBS. Se agregaron 200 μL del buffer AL y se mezcló por vórtex para ser incubado a 56°C por 10 minutos. Se añadieron 200 μL de etanol (96-100%) en la muestra y se mezcló por vórtex. Después, la mezcla se colocó dentro de una columna que a su vez fue colocada en un tubo de 2 ml y se centrifugó a 8000 rpm por un minuto y se desechó el filtrado. La columna fue colocada dentro de un nuevo tubo de 2 ml y se procedió a añadir 500 μL del buffer AW1 para centrifugar a 8000 rpm por un minuto, nuevamente se descartó el filtrado. Por tercera vez la columna se colocó dentro de un nuevo tubo de 2 ml y se añadieron 500 μL del buffer AW2, posteriormente fue centrifugado a 14000 rpm por 3 minutos y se desechó el filtrado. La columna fue colocada en un microtubo y se agregaron 50 μL del buffer AE directamente en la membrana. Se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto y después se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto. El producto final fue preservado a -20°C.

2.4.4 Extracción de ADN de muestras cloacales:

Las muestras de heces se homogenizaron con el líquido de preservación, por lo que fue necesario colocar la muestra en baño maría a una temperatura de 79°C para evaporar el etanol y poder mantener la mayor cantidad de excreta en un menor volumen. Posterior a este manejo, se prosiguió con el protocolo descrito en el QIamp Fast DNA Stool mini kit provisto por Gene Technology, ubicado en la ciudad de Celaya, Guanajuato, México y con una fecha de expiración de noviembre de 2019.

Se toman 200 μL de la muestra y se vertieron dentro de un microtubo que se colocó en hielo. A la muestra se le añadieron 1.4 ml del buffer ASL y se aplicó vórtex continuamente por 1 minuto hasta que se homogenizó. Posteriormente la suspensión se calentó a 70 °C por 5 minutos y se aplicó vórtex por 15 segundos. La muestra se centrifugó a 13200 rpm durante 1 minuto para sedimentar las partículas y 1.2 ml del sobrenadante fue colocado en un nuevo microtubo de 2 ml. El pellet fue descartado. Una tableta de Inhibit EX fue añadida a cada muestra y se aplicó vórtex hasta que la tableta fue totalmente suspendida. El siguiente paso fue incubar la suspensión por 1 minuto a temperatura ambiente para permitir que los inhibidores fueran absorbidos en la matriz de Inhibit EX. La muestra fue centrifugada a 13200 rpm durante

3 minutos y el sobrenadante fue trasladado a un microtubo. Se descartó el pellet y se centrifugó nuevamente a 13200 rpm por 3 minutos. Posteriormente 15 μL de proteinasa K fueron vertidos en un nuevo microtubo. El sobrenadante, producto de la última centrifugación, fue dispuesto en el tubo con proteinasa K y se agregaron 200 μL del buffer AL, se aplicó vórtex por 15 segundos. Se incubó a 70 °C por 10 minutos y después se añadieron 200 μL de etanol (96-100) y se mezcló por vórtex. La mezcla del paso anterior fue trasladada a una columna y se centrifugó a 13200 rpm por 1 minuto. El filtrado fue descartado y la columna se colocó en un nuevo microtubo. 500 μL del buffer AW1 fueron agregados a la columna y se centrifugó a 13200 rpm. Nuevamente se desechó el filtrado y la columna se cambió a un nuevo microtubo. Se vertieron 500 μL del buffer AW2 y se centrifugó a 13200 rpm por 1 minuto. Se descartó el filtrado. La columna se colocó en un nuevo microtubo, se añadieron 50 μL del buffer AE y se incubó a temperatura ambiente. Finalmente fue centrifugado a 13200 rpm por un minuto. El producto final se preservó a -20°C.

2.4.5 Cuantificación de ADN:

La cuantificación de ADN se realizó en un espectrofotómetro UV de micro volumen Quawell Q3000. En la superficie inferior del aparato se colocaron 2 μL de la solución blanco, se efectuó el cálculo de concentración y se limpió la superficie para posteriormente disponer 2 μL de las muestras de sangre y excretas para hacer las mediciones correspondientes. Los rangos de medición de ADN fueron presentados en la ventana de datos y copiados a un documento de Excel.

2.4.6 Ensayo de PCR

Para el aislamiento de los fragmentos de ADN de interés, se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) preparando una mezcla maestra con los siguientes reactivos y condiciones de incubación: 12.5 μL de una mezcla de Taq DNA polimerasa (50units/ml), dNTP's (400 μM) y MgCl₂ (3mM), 3 μL de oligonucleótidos específicos para cada patógeno de interés (0.1–1.0 μM), 3 μL de templado de ADN (<250ng) y 3.5 μL de agua libre de nucleasas para alcanzar un volumen final de 25 μL . Para llevar a cabo los ciclos de temperatura para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se utilizó un termociclador MultiGene Optimax. Los oligonucleótidos específicos para cada patógeno de interés se describen a continuación.

2.4.6.1 Clamidiosis aviar

La detección de *C. psittaci* se dio por la secuencia del gen ompA. Los oligonucleótidos usados fueron

CppsOMP1– F (5'- CACTAGTGGGAAGGTGCTTCA -3') y CppsOMP1 – R (5'- CTG-CGC-GGA-TGC-TAA-TGG - 3') previamente descritos por Pantchev *et al.* (2009). El tamaño del amplicon esperado es de 76 pb. Las condiciones de PCR se indican en la Tabla 1. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.8 % por 60 minutos a 70 volts.

Tabla 1 Condiciones de PCR para la detección de *Chlamydomphila psittaci*

Programa PCR			
		°C	Tiempo
	Desnaturalización Inicial	95	10 min.
45 ciclos	Desnaturalización	95	15 s
	Alineamiento	60	1 min.
	Extensión	60	1 min.
	Extensión final	72	10 min.

2.4.6.2 Tuberculosis aviar

La detección de *M. avium* se dio por la región espaciadora entre 16S-23S del ARN. Los oligonucleótidos usados fueron sp1 (5'-ACCTCCTTTCTAAGGAGCACC 3') y sp2 (5'-GATGCTCGCAACCACTATCCA3') previamente descritos por Castro-Ramos *et al.* (2014). El tamaño del amplicon varía entre 200 y 35 pb, dependiendo de la especie de micobacteria, (314 pb para *M. terrae*, 220 pb para *M. intracellulare*, 219 pb para *M. avium*, 205 pb para *M. xenopi*, 200 pb para *M. tuberculosis* y *M. bovis*). Las condiciones de PCR se especifican en la Tabla 2. Los productos de PCR se analizaron en gel de agarosa al 2% a 94 volts por 45 min.

Tabla 2 Condiciones de PCR para la detección de *Mycobacterium avium*

Programa PCR			
		°C	Tiempo
	Desnaturalización Inicial	94	5 min.
40 Ciclos	Desnaturalización	94	1 min.
	Alineamiento	59	1 min.
	Extensión	72	1 min.
	Extensión final	72	5 min.

2.4.6.3 *Toxoplasmosis*

La detección de *T. gondii* se dio por un fragmento del gen B1. Los oligonucleótidos usados fueron Tg1 (5'-AAAAATGTGGGAATGAAAGAG-3') y Tg2 (5'-ACGAATCAACGGAAGTGAAT-3') previamente descritos por Jalal *et al.* (2004). El tamaño del amplicon es de 469 pb. Las condiciones de PCR se indican en la tabla 4. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.8 % por 60 minutos a 70 volts.

Tabla 3 Condiciones de PCR para la detección de *Toxoplasma gondii*

Programa PCR			
		°C	Tiempo
	Desnaturalización Inicial	95	10 min.
35 ciclos	Desnaturalización	94	1 min.
	Alineamiento	52	30 s.
	Extensión	72	1 min.
	Extensión final	72	7 min.

2.4.6.4 *Salmonelosis*

La detección de *Salmonella* spp. se dio por la amplificación del gen fimA. Los oligonucleótidos usados fueron Fim1A, (5'-CCT TTC TCC ATC GTC CTG AA-3') y Fim2A, 5'-TGGTGTATCTGCCTGACCA-3') descritos anteriormente por Cohen *et al.* (1996). El tamaño del amplicon esperado es de 85 pb. Las condiciones de

PCR se describen en la Tabla 5. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.8 % por 60 minutos a 70 volts.

Tabla 4 Condiciones de PCR para la detección de *Salmonella spp.*

Programa PCR			
		°C	Tiempo
	Desnaturalización Inicial	94	1 min.
21 ciclos	Desnaturalización	94	1 min.
	Alineamiento	58	30 s.
	Extensión	72	1 min.
	Extensión final	72	5 min.

2.4.7 Secuenciación Sanger

Para confirmar la naturaleza de los amplicones obtenidos de cada uno de los patógenos mencionados previamente, dos muestras positivas para cada uno de los patógenos fueron enviadas al laboratorio Eton Bioscience, en San Diego, California, para obtener la secuenciación sanger. Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron analizadas con el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Mega X) y comparadas con las secuencias correspondientes de cada uno de los patógenos seleccionados disponibles en la base de datos de nucleótidos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

2.4.8 Análisis estadísticos

Los datos fueron procesados en el software estadístico R versión 3.5.1. Se ejecutó la prueba de Shapiro-Wilk para contrastar la normalidad de nuestro conjunto de datos. Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) a las medidas biométricas (medida del ala, tarso, longitud del culmen, longitud craneal, profundidad del pico. El primer componente (PCA1) nos informó sobre las medidas esqueléticas del individuo. Posteriormente, se obtuvo la condición corporal (así se obtuvo la masa corregida por tamaño, SMC) utilizando los residuales de los valores de PCA1 en la regresión con el peso del individuo (Albores-Barajas *et al.*, 2015).

Los residuales de la regresión del factor 1 de la PCA contra el peso del individuo nos informó de la condición corporal de los individuos. Por lo tanto, ambos valores (PCA1 y SMC) fueron utilizados para las comparaciones de individuos sanos e infectados. Esto nos permitió discriminar la importancia del factor esquelético y de la cantidad de grasa acumulada y eventualmente justificar la asociación del estatus de animal infectado con la capacidad de almacenar reservas en forma de grasa. Se realizaron comparaciones entre los datos obtenidos de PCA1 así como condición corporal (SMC) e infección por *M. avium*. También se llevó a cabo un análisis de varianza de dos factores (ANOVA) para analizar el efecto que tiene el sexo sobre el tamaño estructural de Pardela mexicana y la probabilidad de infección por *M. avium* y el efecto de la infección por *M. avium* sobre la condición corporal. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de p inferiores a 0.05.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Sexado

Los análisis para determinar el sexo de los individuos a partir de las muestras de sangre nos indican que la muestra poblacional de pardela mexicana se compone de 15 machos, 14 hembras y 2 individuos cuyo sexo no pudo ser determinado.

3.2 Viruela aviar (inspección visual de lesiones)

No se observaron lesiones proliferativas o nódulos característicos de viruela aviar durante la inspección individual de cada individuo colectado, por lo tanto, no se procedió a detectar la presencia de poxvirus mediante la técnica de PCR.

3.3 Ensayo de PCR en Pardela mexicana

3.3.1 *C. psittaci* (Clamidiosis aviar)

Los análisis de PCR mostraron una prevalencia de infección de *C. psittaci* arrojaron una prevalencia de 18% en muestras cloacales y 9% en sangre (Figs. 1 y 2).

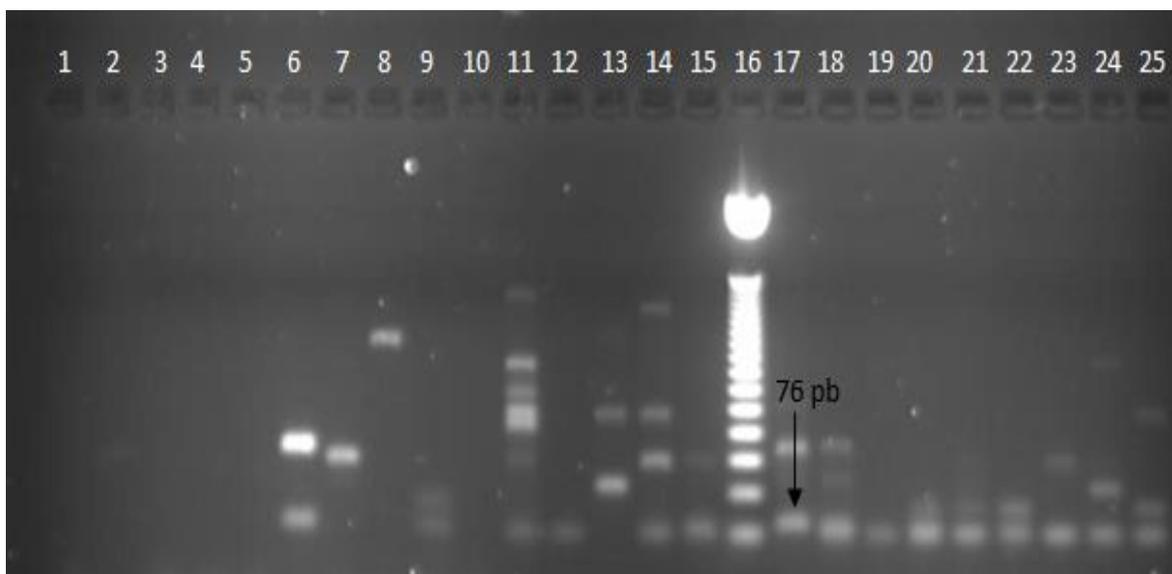


Figura 1 Amplificación de un fragmento (76 pb) del gen ompA en muestras cloacales de Pardela mexicana. Carriles 1-15(muestras 1-15) y 19-30 (muestras 16-27); Carril 16, marcador de peso molecular de 50 pb; carril 17, control positivo; carril 18, control negativo

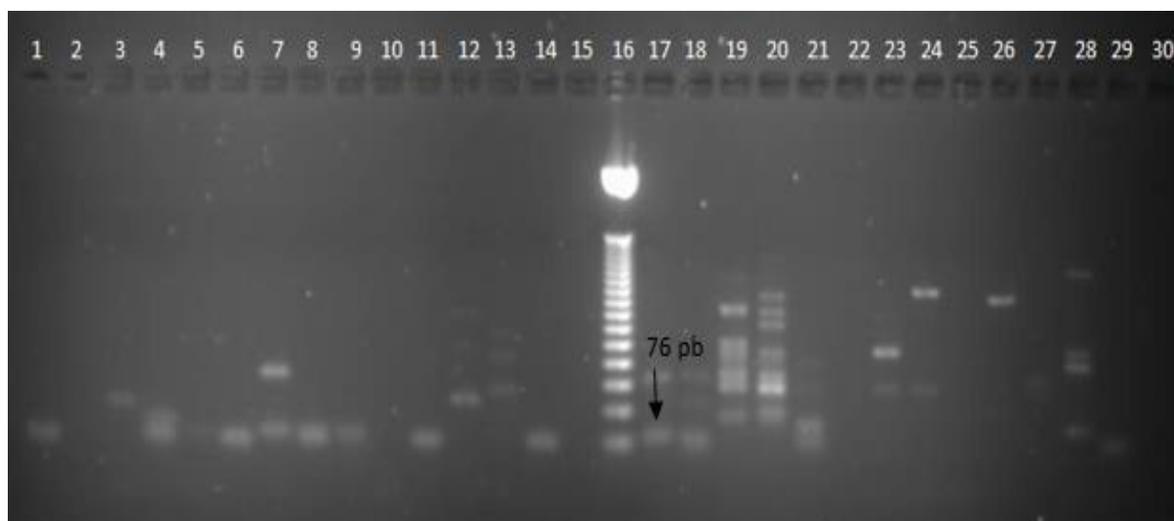


Figura 2 Amplificación de un fragmento (76 pb) del gen ompA en muestras de sangre de la Pardela mexicana. Carriles 1-15 (muestras 1-15) y 19-25 (muestras 16-22); Carril 16, marcador de peso molecular de 50 pb; carril 17, control positivo; carril 18, control negativo.

3.3.2 Salmonelosis

Los análisis de PCR para detectar la presencia del gen fimA en muestras de sangre y cloacales de Pardela mexicana no mostraron fragmentos del amplicon esperado. (Fig. 3 y 4).

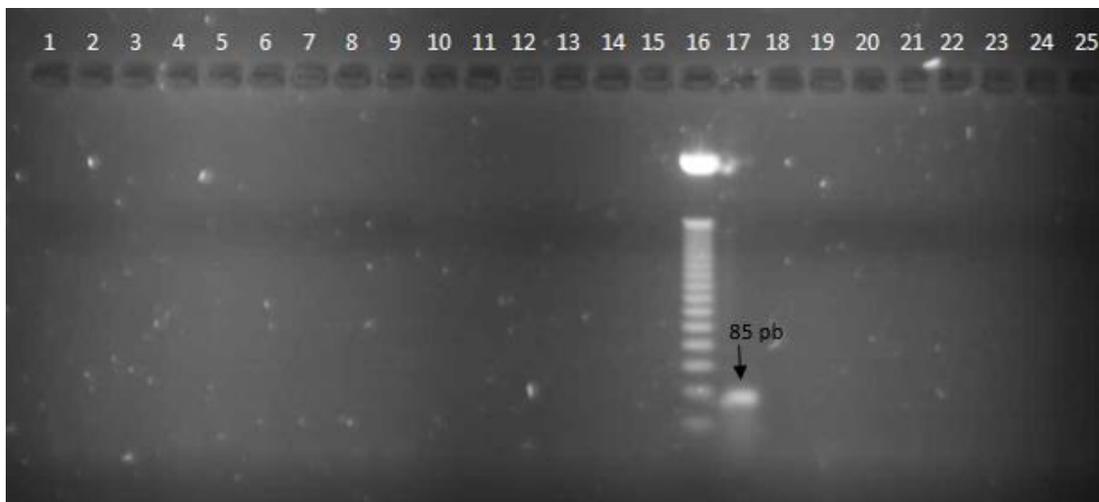


Figura 3 Amplificación de un fragmento (85 pb) del gen fimA en muestras de sangre de la Pardela mexicana. Carriles 1-15 (muestras 1-15), 19-25 (muestras 16-22); Carril 16, marcador de 50 pb; carril 17, control positivo; carril 18, control negativo.

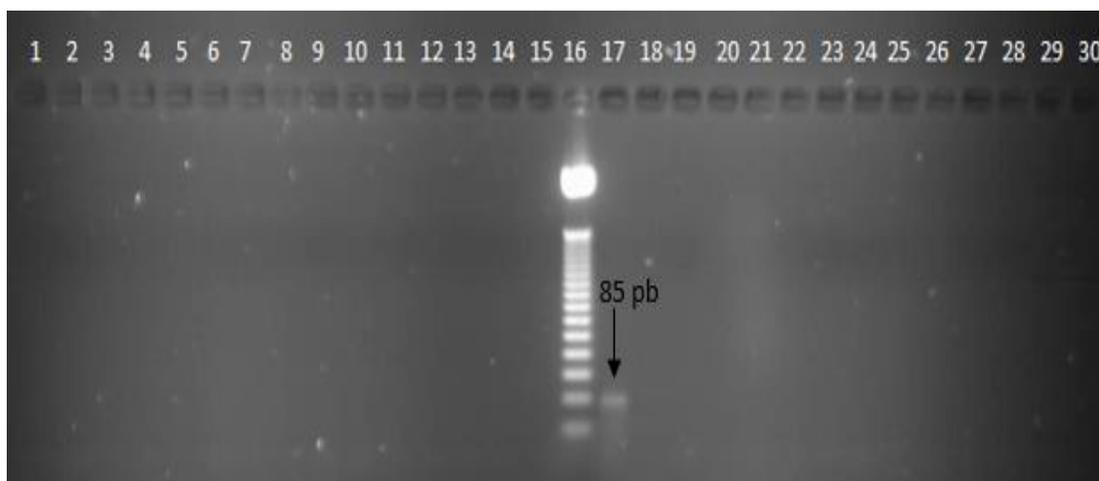


Figura 4 Amplificación de un fragmento (85 pb) del gen fimA en muestras cloacales de la Pardela mexicana. Carriles 1-15 (muestras 1-15) y 19-30 (muestras 16-27); Carril 16, marcador de peso molecular de 50 pb; carril 17, control positivo; carril 18, control negativo.

3.3.3 Tuberculosis aviar

Los análisis de PCR mostraron una prevalencia de infección por *M. avium* de 90% en muestras de sangre y del 77% en muestras cloacales de pardela mexicana (Fig. 5-10).

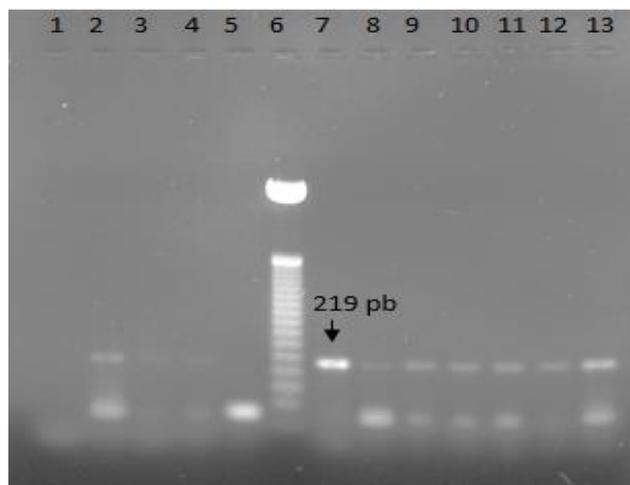


Figura 5 Amplificación de un fragmento (219 pb) de la región espaciadora entre 16S-23S del ARN en muestras de sangre de la Pardela mexicana. Carriles 1-5 (muestras 1-5) y 9-13 (muestras 6-10); Carril 6, marcador de peso molecular de 50 pb; carril 7, control positivo; carril 8, control negativo.

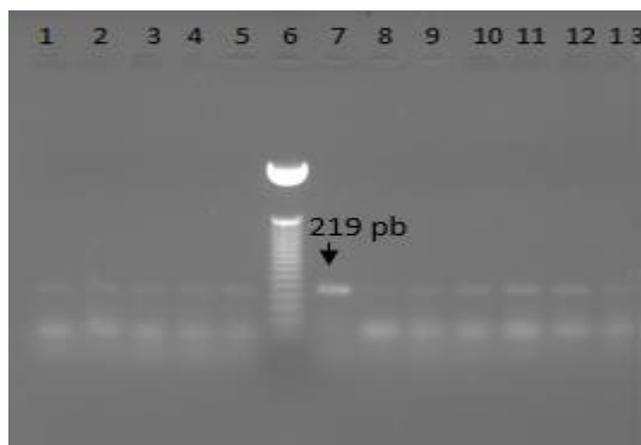


Figura 6 Amplificación de un fragmento (219 pb) de la región espaciadora entre 16S-23S del ARN en muestras de sangre de la Pardela mexicana. Carriles 1-5 (muestras 11-15) y 9-13 (muestras 16-20); carril 6, marcador de peso molecular, carril 7, control positivo; carril 8, control negativo.

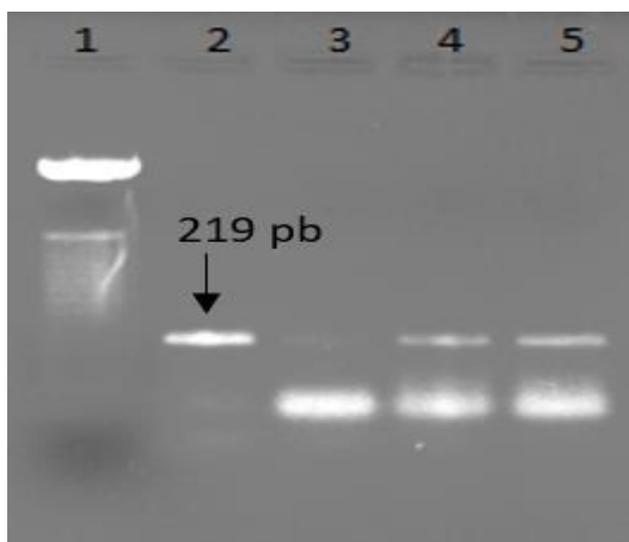


Figura 7 Amplificación de un fragmento (219 pb) de la región espaciadora entre 16S-23S del ARN en muestras de sangre de la Pardela mexicana. Carriles 4 y 5 (Muestras 21 y 22); Carril 1, marcador de peso molecular de 50 pb; carril 2, control positivo; carril 3, control negativo.

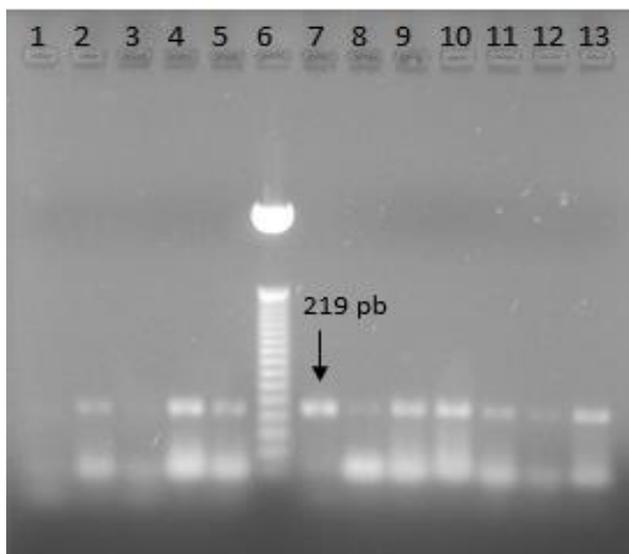


Figura 8 Amplificación de un fragmento (219 pb) de la región espaciadora entre 16S-23S del ARN en muestras cloacales de la Pardela mexicana. Carriles 1-5(muestras 1-5) y 9-13 (muestras 6-10); Carril 6, marcador de peso molecular de 50 pb; carril 7, control positivo; carril 8, control negativo.

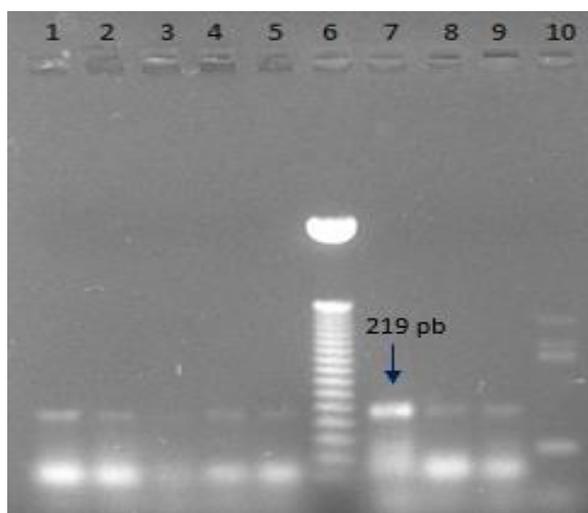


Figura 9 Amplificación de un fragmento de 219 pb de la región espaciadora entre 16S-23S del ARN en muestras cloacales de la Pardela mexicana. Carriles 1-5(muestras 1-5) y 9-13 (muestras 16-20); Carril 6, marcador de peso molecular de 50 pb; carril 7, control positivo; carril 8, control negativo.

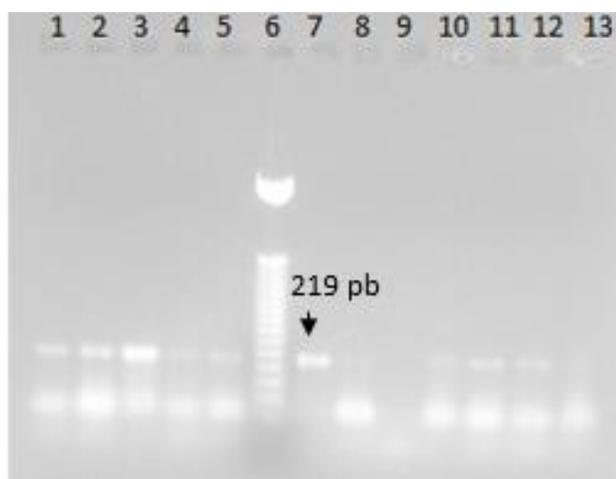


Figura 10 Amplificación de un fragmento (219 pb) de la región espaciadora entre 16S-23S del ARN en muestras cloacales de la Pardela mexicana. Carriles 1-5(muestras 21-25) y 9-10 (muestras 21-27); Carril 6, marcador de peso molecular; carril 7, control positivo; carril 8, control negativo.

3.3.4 Toxoplasmosis

Los análisis de PCR para detectar la presencia de *T. gondii* en las muestras de sangre y cloacales de Pardela mexicana no mostraron ningún fragmento del amplicon esperado (Fig. 11 y 12).



Figura 11 Amplificación de un fragmento (469 pb) del gen B1 en muestras de sangre de la Pardela mexicana. Carriles 1-10 (muestras 1-10) y 13-24 (muestras 11-22); Carril 11, marcador de peso molecular; carril 12, control negativo.

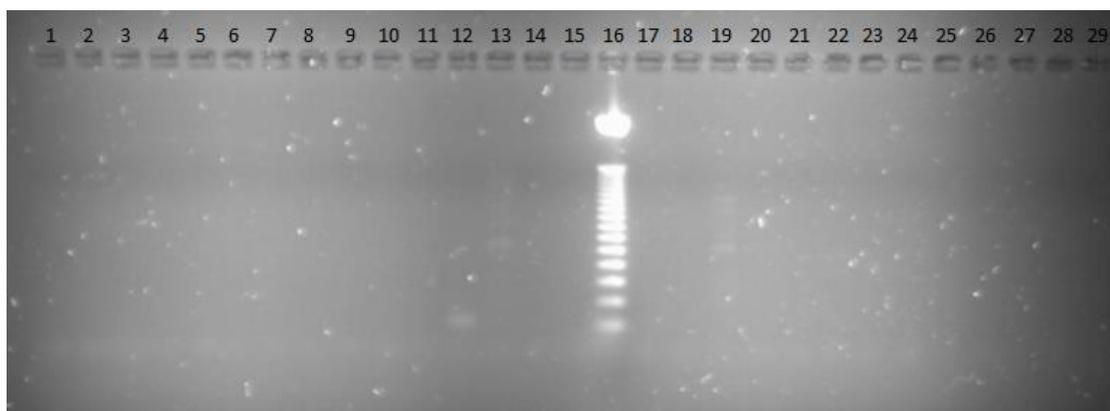


Figura 12 Amplificación de un fragmento (469 pb) del gen B1 en muestras cloacales de la Pardela mexicana. Carriles 1-15 (muestras 1-15) y 18-29 (muestras 16-27); Carril 11, marcador de peso molecular; carril 12, control negativo.

3.4 Ensayo de PCR en Gaviota occidental

3.4.1 Clamidiosis aviar

Los análisis de PCR mostraron una prevalencia de infección de *C. psittaci* de 57% en muestras cloacales y 27% en muestras de sangre (Fig. 13).

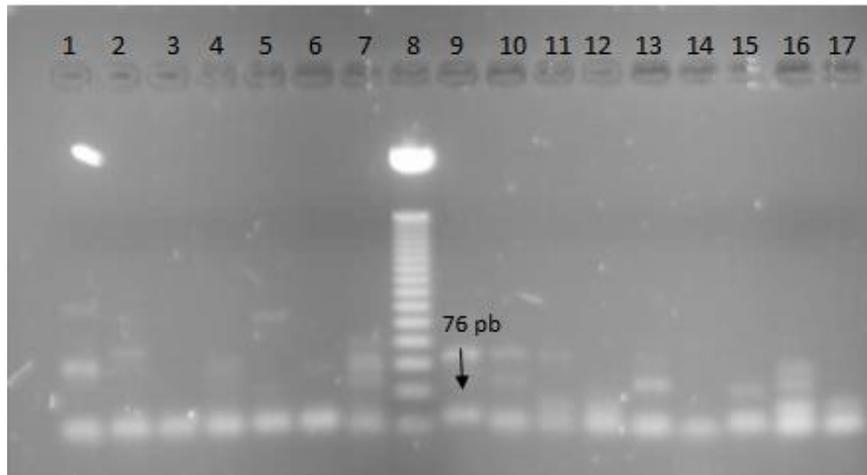


Figura 13 Amplificación de un fragmento (76 pb) del gen *ompA* en muestras de sangre y cloacales de gaviota occidental; Carriles 1-7(muestras de sangre) y 11-17 (muestras cloacales). Carril 8, marcador de peso molecular de 50 pb; carril 9, control positivo; carril 10, control negativo.

3.4.2 Salmonelosis

Los análisis de PCR para detectar la presencia del gen *fimA* en muestras de sangre y cloacales de pardela mexicana no mostraron ningún fragmento del amplicon esperado (Fig. 14).

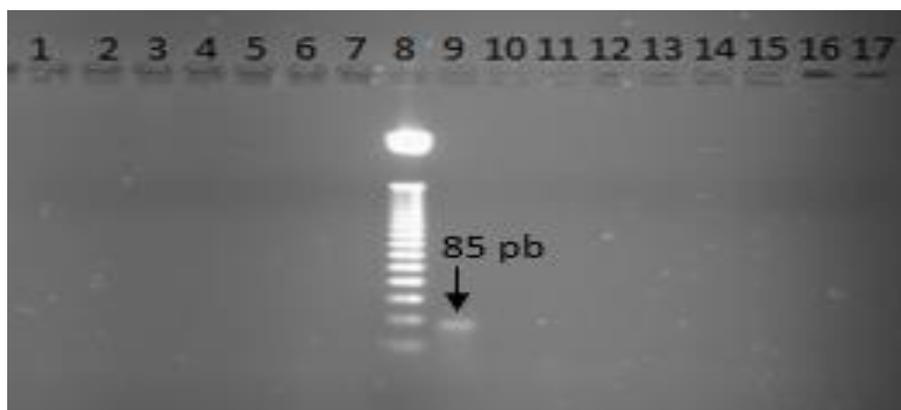


Figura 14 Amplificación de un fragmento (85 pb) del gen *fimA* en muestras de sangre y cloacales de gaviota occidental; Carriles 1-7(muestras de sangre) y 11-17 (muestras cloacales). Carril 8, marcador de peso molecular de 50 pb; carril 9, control positivo; carril 10, control negativo.

3.4.3 Tuberculosis aviar

Los análisis de PCR mostraron una prevalencia de infección por *M. avium* de 42% en muestras de sangre y del 85% en muestras cloacales de gaviota occidental (Fig. 15).

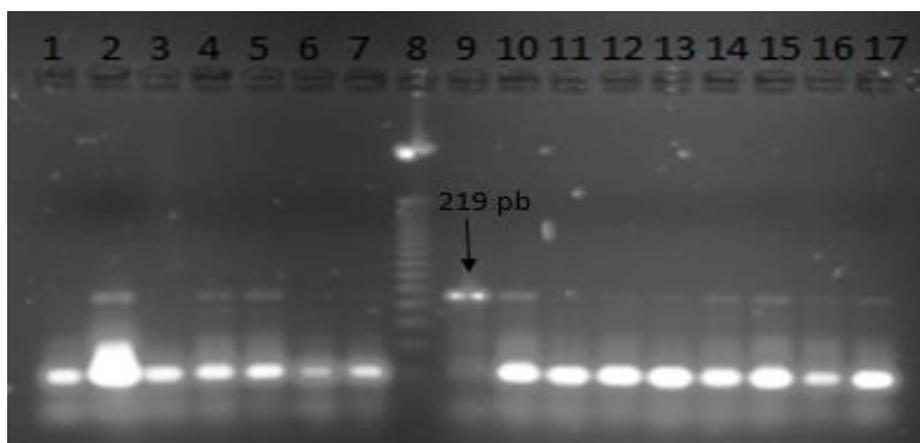


Figura 15 Amplificación de un fragmento (219 pb) de la región espaciadora entre 16S-23S del ARN en muestras de sangre y cloacales de gaviota occidental; Carriles 1-7(muestras de sangre) y 11-17 (muestras cloacales). Carril 8, marcador de peso molecular; carril9, control positivo; carril 10, control negativo.

3.4.4 Toxoplasmosis

Los análisis de PCR para detectar la presencia de *T. gondii* en las muestras de sangre y cloacales de gaviota occidental no mostraron ningún fragmento del amplicon esperado (Fig. 16).



Figura 16 Amplificación de un fragmento (469 pb) del gen B1 en muestras de sangre y cloacales de gaviota occidental (*Larus occidentalis*); Carriles 1-7(muestras de sangre) y 11-17 (muestras cloacales). Carril 8, marcador de peso molecular; carril 9, control negativo.

3.5 Secuenciación Sanger

La comparación de las secuencias obtenidas de este estudio con la base de datos de NCBI confirmó la naturaleza de las secuencias correspondientes a *Mycobacterium*, sin embargo ninguna de las muestras que aparecen como positivas en la reacción de PCR de *C. psittaci* arrojó coincidencias con cepas del género.

3.6 Análisis estadísticos

Se comprobó la suposición de normalidad de los datos al no rechazar la hipótesis nula de distribución. ($W=0.925$, $P=>0.05$) (Figura 17).

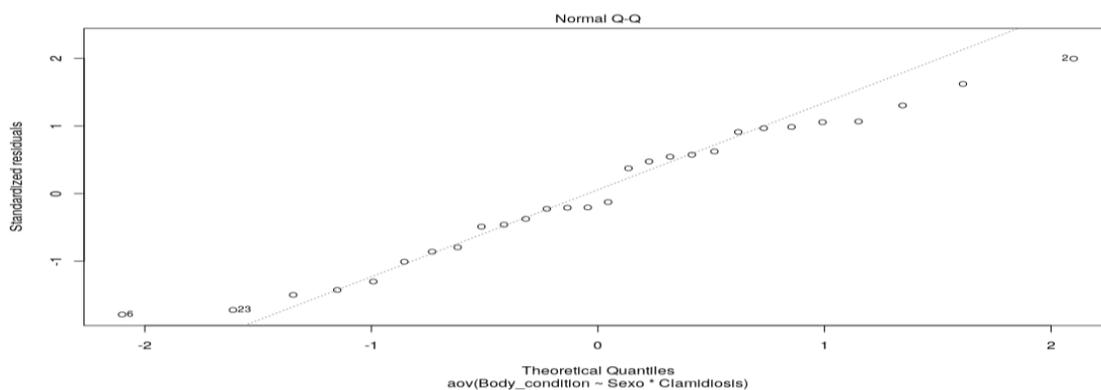


Figura 17 Prueba de normalidad del conjunto de datos. Se muestra distribución normal.

Al analizar las gráficas de regresión de los valores del primer componente (PCA1) y las medidas esqueléticas por sexo, se puede interpretar que los valores altos de PCA1, en ambos sexos, pertenecen a individuos de un tamaño estructural más pequeño (Figuras 18- 20).

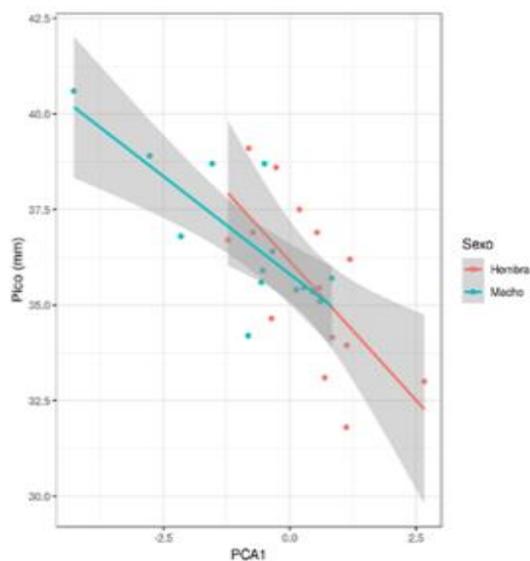


Figura 18 Valores de PCA1 en relación con medidas del pico de hembra y macho. Los valores altos de PCA1 se adjudican a individuos con tamaño estructural más pequeño.

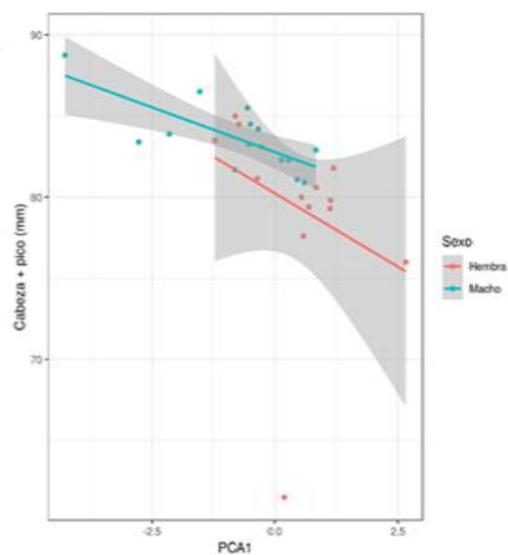


Figura 19 Valores de PCA1 en relación con medidas de cabeza y pico de hembra y macho. Los valores altos de PCA1 se adjudican a individuos con tamaño estructural más pequeño.

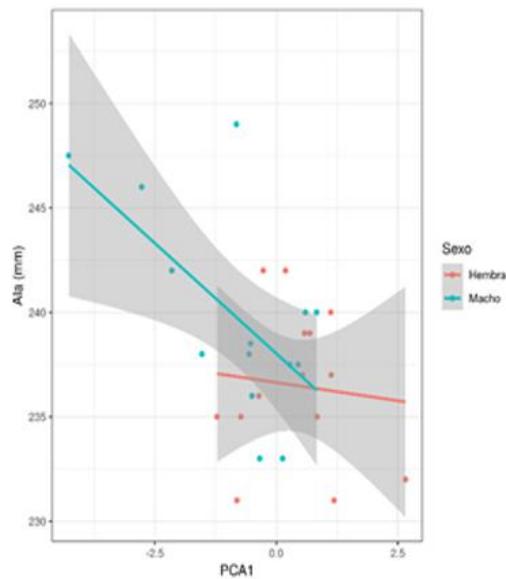


Figura 20 Valores de PCA1 en relación con medidas del ala de hembra y macho. Los valores altos de PCA1 se adjudican a individuos con tamaño estructural más pequeño.

Al comparar el tamaño estructural, dado por los valores de PCA1, entre individuos sanos e infectados por *Mycobacterium* se observó que las hembras de mayor tamaño estructural contraen la infección más fácilmente (Figura 21). Por otra parte, al considerar la condición corporal (v.g. masa relativa del individuo corregida por tamaño) y comparando individuos sanos e infectados por *M. avium*, se observó que las hembras y machos con mejor condición corporal no están infectados (Figura 22).

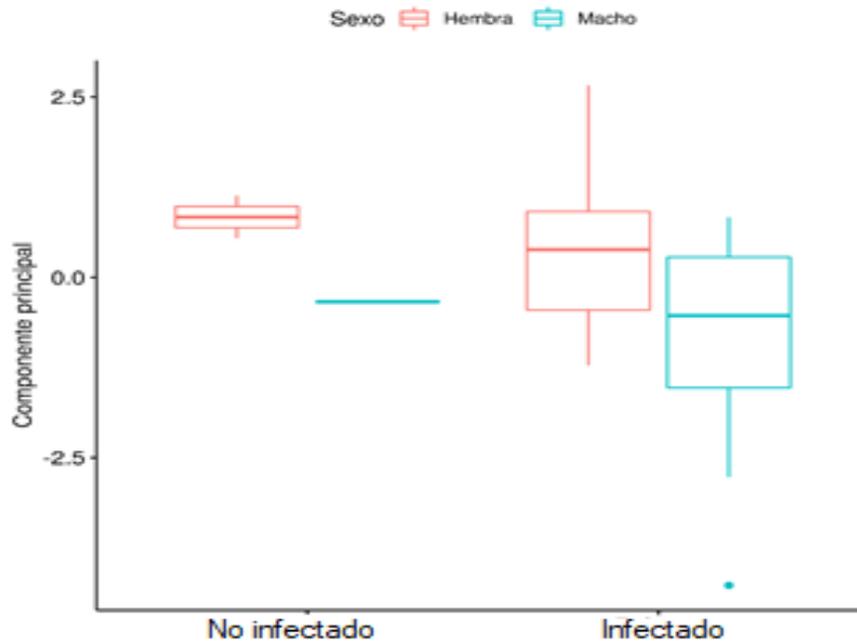


Figura 21 Comparación de los valores de PCA e infección por *M. avium* respecto al sexo. Se observan hembras de mayor tamaño estructural infectadas.

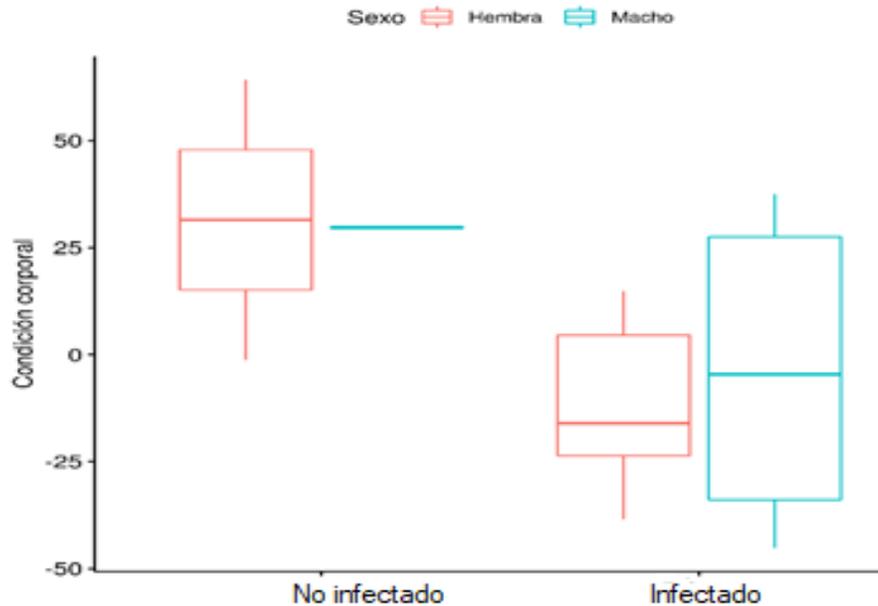


Figura 22 Comparación de los valores de condición corporal e infección por *M. avium* respecto al sexo. Se observa que los individuos sanos son aquellos con mejor condición corporal.

ANOVA de dos vías indicó que existe un efecto significativo de la infección por *M. avium* sobre la condición corporal de las aves ($F_{1,24}=5.538$; $P: <0.05$), independientemente del sexo ($F_{1,24} = 0.256$ $P: >0.05$). Por otra parte, también nos muestra que no existe ningún efecto de interacción entre el sexo e infección por *M. avium* sobre la condición corporal de los individuos ($F_{1, 24} = 0.097$ $P: >0.05$). Además, con base en los resultados, se puede apreciar que el sexo de los individuos tiene un efecto significativo sobre el tamaño estructural ($F_{1, 24}=6.030$; $P:<0.05$) pero, como esperado, no hay efectos de la infección por *M. avium* ($F_{1, 24} = 0.408$ $P:>0.05$) ni interacción del sexo e infección ($F_{1, 24} = 0.00$ $P: >0.05$) sobre el tamaño estructural de Pardela mexicana.

Capítulo 4. Discusión

La prevalencia de infección por *Mycobacterium*, que potencialmente causa tuberculosis dentro de la población de Pardela mexicana fue del 90% en muestras sanguíneas y 77% en muestras cloacales. Se ha reportado altas prevalencias por infección de *Mycobacterium* spp. en aves acuáticas y terrestres en los que el diagnóstico se ha realizado mediante PCR (Gronesova *et al.*, 2008). Sin embargo, las prevalencias han sido notablemente menores (v.g. 0.7% a 17%) en estudios de salud de aves marinas y costeras donde las muestras fueron procesadas principalmente por métodos de cultivo, microscópicos o histológicos (Smit *et al.*, 1987; Siebert *et al.*, 2012). Del Pilar Silva y colaboradores (2009) mencionan que por medio de la técnica de PCR es posible detectar concentraciones bajas de *Mycobacterium* spp. durante las primeras etapas de infección ya que las técnicas moleculares son muy sensibles para la detección de este grupo de bacterias. Además, la mayor prevalencia en muestras sanguíneas podría deberse a que, según se menciona en diversos estudios, el microorganismo infeccioso entra al torrente sanguíneo y sensibiliza a las células efectoras mientras que la abundante flora microbiana del tracto gastrointestinal dificulta el aislamiento de las micobacterias, haciendo más efectiva la detección en sangre periférica que en otras muestras (Schluger *et al.*, 1994; Del Pilar Silva *et al.*, 2009).

La inspección visual de los individuos en nuestro estudio no arrojó evidencia de infección por Avipoxvirus que puede causar viruela aviar en la población de Pardela mexicana. Estos resultados difieren con los obtenidos en otros estudios realizados en islas del Pacífico. Van Riper y colaboradores (2002) reportaron una prevalencia del 7.4% al 34.9% en 16 localidades de Hawái, además, la viruela aviar fue predominante en especies nativas más que en especies introducidas. Los patrones obtenidos de diferentes variables estudiadas apoyan la hipótesis de que el mosquito *Culex quinquefasciatus* es el vector que transmite la viruela y su dinámica de población está fuertemente controlada por estacionalidad y patrones climáticos altitudinales (zonas húmedas, estación húmeda del año y elevaciones medias del lugar (1200 m) (Van Riper *et al.*, 2002; Whiteman *et al.*, 2005; Samuel *et al.*, 2018). Isla Natividad es una zona desértica con vientos predominantes y elevaciones máximas de 300 m (Keitt *et al.*, 2003), esto podría ser una limitante para la proliferación del mosquito.

En este estudio, el número de casos positivos para infección causada por *C. psittaci*, que potencialmente causa clamidiosis aviar fue de dos muestras en sangre y cinco en muestras cloacales. Estos datos coinciden con lo mencionado por Harkinezhad *et al.* (2009) pues señalan que *C. psittaci* puede sobrevivir en heces hasta por 30 días, mientras que Beeckman, y colaboradores (2010) proponen que *C. psittaci* utiliza monocitos/macrófagos en sangre como vehículo para expandirse a otros órganos, por lo que su presencia

en sangre es detectable sólo por un periodo corto de la infección. Brooks y colaboradores (2010) mencionan que el microorganismo aparece en la sangre sólo en las primeras dos semanas de la enfermedad y esto explicaría el hecho de no haber encontrado ambas muestras positivas para un mismo individuo. Sin embargo, al recibir los resultados de la secuenciación para comprobar la naturaleza del fragmento de ADN aislado, nos encontramos con que ninguna de las muestras que aparecen como positivas en la reacción de PCR arroja coincidencias con cepas de *C. psittaci* de la base de datos de NCBI, por lo tanto, nuestros resultados fueron considerados falsos positivos. Los falsos positivos en ensayos de PCR pueden deberse a la introducción de ADN objetivo no deseado a través de reactivos, equipo, por arrastre entre muestras y por fuga en los pocillos en geles de agarosa. Este tipo de contaminación sólo afecta a un número limitado de muestras en el ensayo, como en el caso de nuestro estudio (Borst *et al.*, 2004). Otra forma de explicar los falsos positivos son bandas obtenidas por amplificación de secuencias similares encontradas en otras bacterias presentes en el individuo (Rolain *et al.*, 2007). Sin embargo, los falsos positivos podrían ser causa de una baja especificidad del oligonucleótido, dímeros de primers (los oligonucleótidos interaccionan entre sí), o incluso debe considerarse la posibilidad de que estuviesen degradados, defectuosos o mal diseñados (Espinosa, 2007; Fonseca-Mendoza *et al.*, 2010).

Al analizar nuestros datos, no se reportan casos positivos de infección por *Salmonella*, que potencialmente causa salmonelosis en la población muestra de Pardela mexicana. La prevalencia de *Salmonella* spp. en diversos estudios realizados en aves marinas varía del 1.1% hasta el 8.4% acrecentándose el porcentaje en aquellas zonas de aguas residuales, sitios de contaminación o de eliminación de desechos. (Butterfield *et al.*, 1983; Steele *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2010). Las especies de *Salmonella* son bacterias de fácil diseminación y persistentes en los sitios de infección ya que puede sobrevivir en el suelo por periodos de hasta un año, lo que asegura su paso a un nuevo huésped susceptible (Winfield y Groisman, 2003; López-Martín *et al.*, 2011). Por lo tanto, nuestros resultados negativos podrían significar: 1) que no hay infección por *Salmonella* dentro de la población de Pardela o 2) que la infección no fue detectada debido a los tiempos de recolección de la muestra considerando la evolución de la infección en el hospedero. En este último caso se ha reportado que las salmonelas al ser ingeridas, llegan al intestino delgado, desde ahí, penetran al sistema linfático y posteriormente llegan al torrente sanguíneo, donde son transportadas a diversos órganos. Las salmonelas pueden ser detectadas en sangre durante la primera y segunda semana de infección, después de cuatro a cinco semanas la sangre vuelve a ser estéril (Davis *et al.*, 1996; Brooks *et al.*, 2011). En heces, la detección se puede dar sólo dentro de las primeras 24 horas posteriores a la infección y después de 7 a 14 días, cuando aparecen los signos clínicos; entre estos periodos las pruebas aparecerán como negativas. Además, cuando la enfermedad es crónica, las aves secretan salmonelas en las heces de manera intermitente (Altman *et al.*, 1997; Tully *et al.*, 2000).

Para verificar la presencia o ausencia de infección por *T. gondii* que potencialmente causa toxoplasmosis en la población de Pardela mexicana, las muestras sanguíneas y cloacales se corrieron con las condiciones de PCR descritas por Jalal y colaboradores (2004) del cual obtuvimos nuestros oligonucleótidos. No fue posible obtener un control positivo de *T. gondii*, por lo tanto, nuestros resultados no fueron concluyentes para descartar la presencia o ausencia de *T. gondii* por medio de la técnica de PCR. Los controles positivos contienen una muestra de ADN que ha amplificado el fragmento de interés adecuadamente bajo un protocolo específico de PCR, por lo tanto, aumentan la confianza para identificar resultados falsos positivos o negativos, que pueden ser producto de sustancias inhibitorias de la reacción, mal funcionamiento de reactivos, contaminación en la mezcla maestra, mal funcionamiento de la maquinaria o el programa de PCR utilizado (Cone *et al.*, 1992; Sánchez y Cardona, Espinosa, 2007).

Los resultados positivos para infección por *Mycobacterium* en muestras cloacales y sanguíneas tanto de Pardela mexicana como de gaviotas, sugieren que las gaviotas están dispersando la infección por *Mycobacterium*, que podría ocasionar tuberculosis en la población de Pardela mexicana al estar en estrecha relación con ellas (Keitt *et al.* 1998; Keitt *et al.*, 2003). Por sus hábitos alimenticios, (v.g. consumo de alimentos de industrias pesqueras, procesadoras, rellenos sanitarios y desperdicios), se ha reportado que las gaviotas, principalmente del género *Larus*, pueden ser portadoras y dispersoras eficaces de agentes patógenos importantes (López-Martín *et al.*, 2011). Por lo tanto, se sugiere que en estudios futuros se aumente el muestreo en Gaviota occidental y se tomen muestras del relleno sanitario de Isla Natividad para esclarecer los mecanismos de transmisión de las enfermedades.

Los individuos de Pardela mexicana con mejor condición corporal no están infectados por *Mycobacterium*, esto indica que lo más posible es que haya un efecto de la infección por *Mycobacterium* sobre la condición corporal de los individuos. Anteriormente se ha descrito que los parásitos, al obtener sus recursos del huésped, comprometen la condición corporal de individuo, puesto que reducen sus reservas de energía (Schulte-Hostedde y Elsasser, 2011). Además, una mala condición aumenta la probabilidad de infección, ya que un hospedero en malas condiciones se defenderá pobremente de las infecciones, que podrían ser de mayor intensidad, por lo tanto, las defensas del individuo se verían abrumadas y se promovería el deterioro de su estado, éste ciclo vicioso deja al hospedero en un estado de vulnerabilidad frente a la comunidad de parásitos y al aumentar la probabilidad de una infección generalizada más severa, podría llevarle a la muerte (Beldomenico *et al.*, 2008; Beldomenico y Begon, 2010). Además encontré que las hembras de mayor tamaño estructural contraen la infección más fácilmente, este hecho puede ser explicado por la exposición a patógenos debido a competencia entre sexos sobre los recursos alimenticios, puesto que en algunas aves marinas, se han reportado diferencias en la ecología de la alimentación,

además, el tamaño corporal puede influir en la susceptibilidad a patógenos puesto que individuos más grandes deben comer más (Benskin *et al.*, 2009). Además, se encontró que el sexo de los individuos tiene un efecto significativo sobre el tamaño estructural, anteriormente se ha reportado que solo en unas pocas especies de procellariiformes se ha detectado diferencias del tamaño corporal entre sexos, siendo las hembras significativamente más pequeñas que los machos (Genovart *et al.*, 2003).

El diagnóstico de infecciones en nuestro estudio se basó en el análisis molecular, sin embargo existen otros métodos que pueden complementarlos o utilizarse por sí solos. Entre ellos destacan el examen microscópico, técnicas de cultivo en medios selectivos y pruebas inmunológicas (Ingraham y Ingraham, 1998; Koneman y Allen, 2008). En nuestro caso, la técnica molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico de infecciones fue elegida por las ventajas que ofrece, entre ellas destacan el buen límite de sensibilidad (v.g. probabilidad de que el resultado de la prueba sea positivo en un individuo infectado) y especificidad (probabilidad de que el resultado de la prueba sea negativo en un individuo sano) (Segura-Egea, 2002), automatización del proceso, capacidad de procesar grandes cantidades de muestra, así como una mayor rapidez en el diagnóstico. Sin embargo, el proceso también conlleva algunas desventajas y limitaciones como las siguientes: el equipo y los reactivos son costosos, es difícil optimizar las condiciones adecuadas de PCR y es necesario un proceso posterior a la PCR para observar los productos (Palomino-Camargo y González-Muñoz, 2014).

Uno de los factores a considerar en la investigación es la obtención de información de calidad y los eventuales errores que puede haber en el proceso (Schlesselman, 1982; Manterola y Otzen, 2015). Por lo tanto, hemos considerado algunos de los sesgos que pueden producirse en la etapa de recolección y transporte de la muestra, el cual es un paso crítico y principal en la confirmación de la presencia de un agente infeccioso (Koneman y Allen, 2008). La muestra debe recolectarse con un mínimo de contaminación en los tejidos, órganos y secreciones adyacentes; los tiempos de recolección y transporte de muestra prolongados así como condiciones ambientales adversas deben evitarse, si se estima una demora para el procesamiento, es preferible congelar a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, además, es importante establecer los tiempos de recolección de muestra para proporcionar la mejor oportunidad de recuperar los agentes causales, tomando en cuenta el ciclo de vida y evolución de la infección en el hospedero (Koneman y Allen, 2008). Al haber colectado las muestras en una Isla, el tiempo de transporte hasta el laboratorio y su posterior procesamiento es largo y algunas veces no se cuenta con todo el equipo necesario. Además, al trabajar con aves, no es posible conocer la etapa de evolución de la infección en el individuo.

Capítulo 5. Conclusiones

Los resultados de este estudio demostraron que la población de Pardela mexicana anidante en Isla Natividad está siendo infectada por *Mycobacterium* y por lo tanto es altamente vulnerable a desarrollar tuberculosis aviar. En cuanto a los demás patógenos investigados, no hay evidencia dentro de la muestra poblacional de infección por los agentes que causan salmonelosis, viruela aviar y clamidiosis. En el caso de *T. gondii* los resultados aparentemente negativos, no son concluyentes para descartar su presencia en la población de Pardela mexicana. Estos datos son contrarios a la hipótesis planteada. Bajo la presencia de aves migratorias y especies introducidas en Isla Natividad, esperábamos observar una mayor prevalencia de infección por los patógenos seleccionados en la población de Pardela mexicana, lo que sugiere que el riesgo de extinción por enfermedades zoonóticas en la especie es relativamente bajo. Los resultados también muestran que hay un efecto de la infección por *M. avium* sobre la condición corporal de las aves, que las hembras de mayor tamaño estructural se infectan más fácilmente y que existe un efecto del sexo del ave y su tamaño estructural. Además, sugieren que uno de los posibles dispersores de patógenos zoonóticos como *Mycobacterium* dentro de la población de Pardela mexicana de Isla Natividad son las gaviotas, puesto que, estas aves anidan en la misma área y por medio de sus heces podrían estar contaminando el ambiente propiciando así la infección de Pardela mexicana.

Se recomienda que en futuros trabajos se amplíe el panorama de diagnóstico de patógenos en la Pardela mexicana mediante la utilización de métodos microscópicos, histopatológicos y moleculares. Así mismo, se recomienda implementar estudios de inmunocompetencia de la Pardela mexicana para tener un entendimiento más completo de la ecología de enfermedades en la especie que nos permita evaluar con mayor certeza su riesgo de extinción relacionado a enfermedades infecciosas para ser considerado en los planes de manejo y conservación de la especie.

Finalmente, nuestros resultados son relevantes para el sector salud y seguridad de Isla Natividad. Se sugiere que se evite el contacto entre los habitantes de la Isla y Pardela mexicana y Gaviota occidental para prevenir contagio en la población humana. Además, es importante que se tomen medidas en cuanto al manejo y funcionamiento del relleno sanitario de la isla ya que éste podría ser un ambiente contaminado que promueva la dispersión de la infección por *Mycobacterium* y potencialmente tuberculosis entre las poblaciones de aves marinas y de personas que habitan en la isla.

Literatura citada

- Albores-Barajas, Y. V., Massa, B., Tagliavia, M. y Soldatini, C. (2015). Parental care and chick growth rate in the Mediterranean Storm-petrel *Hydrobates pelagicus melitensis*. *Avocetta*, 39, 29-35.
- Albores-Barajas Y.V., Soldatini C., Ramos-Rodríguez A. y Dell'Omo G. (2016) Metal fence removal improved survival of a nocturnal seabird on Isla Natividad, Mexico. *Conservation Evidence*, 13, 67-71
- Albores-Barajas, Y. V., Soldatini, C., Ramos-Rodríguez, A., Alcalá-Santoyo, J. E., Carmona, R. y Dell'Omo, G. (2018). A new use of technology to solve an old problem: Estimating the population size of a burrow nesting seabird. *PloS one*, 13(9).
- Altman, R.B., Clubb, S.L., Dorrestein, G.M, Quesenberry, K. (1997). *Avian medicine and surgery*. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Azpiri, G. S., Maldonado, F. G. y González, G. C. (2000). La importancia del estudio de enfermedades en la conservación de fauna silvestre. *Veterinaria México*, 31(3), 223-230.
- Beeckman, D. S. A. y Vanrompay, D. C. (2010). Biology and intracellular pathogenesis of high or low virulent *Chlamydophila psittaci* strains in chicken macrophages. *Veterinary microbiology*, 141(3-4), 342-353.
- Beldomenico, P. M. y Begon, M. (2010). Disease spread, susceptibility and infection intensity: vicious circles?. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(1), 21-27.
- Beldomenico, P. M., Telfer, S., Gebert, S., Lukomski, L., Bennett, M. y Begon, M. (2008). Poor condition and infection: a vicious circle in natural populations. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 275(1644), 1753-1759.
- Benskin, C. M., Wilson, K., Jones, K. y Hartley, I. R. (2009). Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection. *Biological Reviews*, 84(3), 349-373.
- Berlanga, H., Gómez de Silva, H., Vargas-Canales, V. M., Rodríguez-Contreras, V., Sánchez-González, L.A., Ortega-Álvarez R., y Calderón-Parra, R.
(2015). *Aves de México: Lista actualizada de especies y nombres comunes*. CONABIO. México. D.F.
- BirdLife International. 2016. *Puffinus opisthomelas*. Consultado el 23 de junio de 2017, de <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T22698246A93673861.en>.
- Borst, A., Box, A. T. A. y Fluit, A. C. (2004). False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy. *European journal of clinical microbiology and infectious diseases*, 23(4), 289-299
- Brooks, G.F, Carroll, K.C., Butel, J.S., Morse, S.A.y Mietzner, T.A. (2011). *Microbiología médica*. (25ª ed.). Mc Graw Hill companies. Mexico, D.F.
- Butterfield, J., Coulson, J. C., Kearsley, S. V., Monaghan, P., McCoy, J. H. y Spain, G. E. (1983). The herring gull *Larus argentatus* as a carrier of *salmonella*. *Epidemiology & Infection*, 91(3), 429-436.

- Castro-Ramos, M., Tiscornia, I., Lorenzo, M. y Sanguinetti, C. (2014). Avian tuberculosis in *Rhea americana* (Ñandú) in captivity in Uruguay. Bacteriologic and molecular diagnosis. *Veterinaria (Montevideo)*, 50(196), 45-64.
- Cohen, H. J., Mechanda, S. M. y Lin, W. (1996). PCR amplification of the fimA gene sequence of *Salmonella typhimurium*, a specific method for detection of *Salmonella* spp. *Applied and environmental microbiology*, 62(12), 4303-4308.
- Cone, R. W., Hobson, A. C. y Huang, M. L. (1992). Coamplified positive control detects inhibition of polymerase chain reactions. *Journal of clinical microbiology*, 30(12), 3185-3189.
- Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.M., Ginsberg, H.S. (1996). *Tratado de microbiología*. (4ta ed.). Masson S.A. Barcelona, España.
- De Wit, L. 14 de junio de 2017. Island Conservation: [La biodiversidad y la salud humana se benefician de la remoción de especies invasoras](https://www.islandconservation.org/biodiversidad-salud-humana-benefician-de-la-remocion-de-especies-invasoras/). Recuperado el 24 de junio de 2017 de <https://www.islandconservation.org/biodiversidad-salud-humana-benefician-de-la-remocion-de-especies-invasoras/>
- Deem, S. L., Karesh, W. B. y Weisman, W. (2001). Putting theory into practice: wildlife health in conservation. *Conservation Biology*, 15(5), 1224-1233.
- Deem, S. L., Merkel, J., Ballweber, L., Vargas, F. H., Cruz, M. B. y Parker, P. G. (2010). Exposure to *Toxoplasma gondii* in Galapagos penguins (*Spheniscus mendiculus*) and flightless cormorants (*Phalacrocorax harrisi*) in the Galapagos Islands, Ecuador. *Journal of Wildlife Diseases*, 46(3), 1005-1011.
- Del Pilar Silva, A., Leon, C. I., Guerrero, M. I., Neira, R., Arias, L. y Rodriguez, G. (2009). Avian tuberculosis of zoonotic importance at a zoo on the Bogotá Andean plateau (Sabana), Colombia. *The Canadian Veterinary Journal*, 50(8), 841.
- Dubey, J. P. (2010). *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. *Zoonoses and Public Health*, 57(1), 60-73.
- Elmore, S. A., Jones, J. L., Conrad, P. A., Patton, S., Lindsay, D. S. y Dubey, J. P. (2010). *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends in Parasitology*, 26(4), 190-196.
- Espinosa L. 2007. *Guía práctica sobre la técnica de PCR*. En: L.E. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre (comps.). *Ecología Molecular*. Semarnat, INE, UNAM, Conabio. México. (pp. 251-278).
- Fonseca-Mendoza, D., Mateus-Arbelaez, H. y Contreras-Bravo, N. 2010. *Prácticas de laboratorio de biología molecular: su aplicación en genética básica*. Universidad del Rosario. Bogotá.
- Friend, M. 1999. *Field Manual of Wildlife Diseases: General Field Procedures and Diseases of Birds U.S. Geological Survey*. Washington, D.C
- Friend M. (2001). *Field Manual of Wildlife Diseases: General Field Procedures and Diseases of Birds*. *Journal of Wildlife Diseases*, 37(1), 2001, pp. 208–211
- Genovart, M., McMinn, M. y Bowler, D. (2003). A discriminant function for predicting sex in the Balearic Shearwater. *Waterbirds*, 26(1), 72-76.

- González-Solís, J., Croxall, J. P. y Wood, A. G. (2000). Sexual dimorphism and sexual segregation in foraging strategies of northern giant petrels, *Macronectes halli*, during incubation. *Oikos*, 90(2), 390-398.
- Gronesova, M. F., Mizakova A., Kabat P., Trnka A., y Betakova T. (2008) Prevalence of avian influenza viruses, *Borrelia garinii*, *Mycobacterium avium*, and *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in waterfowl and terrestrial birds in Slovakia, 2006. *Avian Pathology*, 37, (5), 537-543.
- Harkinezhad, T., Geens, T. y Vanrompay, D. (2009). *Chlamydoiphila psittaci* infections in birds: a review with emphasis on zoonotic consequences. *Veterinary microbiology*, 135(1), 68-77.
- Hubálek, Z. (2004). An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. *Journal of Wildlife Diseases*, 40(4), 639-659.
- Ingraham, J.L., Ingraham, C.A. 1998. *Introducción a la microbiología*. (2da Ed.). Reverte. Barcelona, España.
- Jalal, S., Nord, C. E., Lappalainen, M. y Evengård, B. (2004). Rapid and sensitive diagnosis of *Toxoplasma gondii* infections by PCR. *Clinical microbiology and infection*, 10(10), 937-939.
- Jourdain, E., Gauthier-Clerc, M., Bicoût, D. y Sabatier, P. (2007). Bird migration routes and risk for pathogen dispersion into western Mediterranean wetlands. *Emerging Infectious Diseases*, 13(3), 365.
- Kaufman, K. 1996. *Lives of North American Birds*. Houghton Mifflin Company. New York.
- Keitt, B.S. (1998). *Ecology and conservation biology of the black-vented shearwater (Puffinus opisthomelas) on Natividad Island, Vizcaino Biosphere Reserve, Baja California Sur, Mexico*. University of California, Santa Cruz.
- Keitt, B. S. y Tershy, B. R. (2003). Cat eradication significantly decreases shearwater mortality. *Animal Conservation*, 6(4), 307-308
- Keitt, B. S., Tershy, B. R. y Croll, D. A. (2003). Breeding biology and conservation of the Black-vented Shearwater *Puffinus opisthomelas*. *Ibis*, 145(4), 673-680.
- Keitt, B. S., Tershy, B. R. y Croll, D. A. (2004). Nocturnal behavior reduces predation pressure on black-vented shearwaters *Puffinus opisthomelas*. *Marine Ornithology*, 32(3), 173-178.
- Keitt, B. S., Wilcox, C., Tershy, B. R., Croll, D. A. y Donlan, C. J. (2002). The effect of feral cats on the population viability of black-vented shearwaters (*Puffinus opisthomelas*) on Natividad Island, Mexico. *Animal Conservation*, 5(3), 217-223.
- Koneman, E. W. y Allen, S. (2008). *Koneman. Diagnostico microbiológico: texto y atlas En color*. (6ta ed.). Médica Panamericana. Madrid. España.
- López-Martín, J., Junod, T., Riquelme, F., Contreras, C. y González-Acuña, D. (2011). Detección de especies de *Salmonella* y *Mycobacterium* en gaviotas dominicanas (*Larus dominicanus*) y gaviotas de Franklin (*Leucophaeus pipixcan*) en la ciudad de Talcahuano, Chile. *Revista Médica de Chile*, 139(11), 1496-1502.
- Manterola, C. y Otzen, T. (2015) Los sesgos en investigación clínica. *International Journal of Morphology*, 33(3):1156-1164

- Miller, M.J.R., Dawson, R.D., Schwantje, H. (2014). *Manual of common diseases and parasites of wildlife in Northern British Columbia*. UNBC. (2nd. ed). Prince George.
- Newman, S. H., et al. (2007). Aquatic bird disease and mortality as an indicator of changing ecosystem health. *Marine Ecology Progress Series*, 352, 299-309.
- Nuttall, P.A., M. De L Brooke y C.M. Perrins. (1985). Poxvirus infection of the Manx Shearwater (*Puffinus puffinus*). *Journal of Wildlife Diseases*, (21), 120–124.
- Padilla, L. R., Huyvaert, K. P., Merkel, J., Miller, R. E. y Parker, P. G. (2003). Hematology, plasma chemistry, serology, and *Chlamydophila* status of the waved albatross (*Phoebastria irrorata*) on the Galapagos Islands. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 34(3), 278-283.
- Padilla, L. R., N. K. Whiteman, J. Merkel, K. D. Huyvaert y P. G. Parker. (2006). Health assessment of seabirds on Isla Genovesa, Galápagos. *Current Topics in Avian Disease Research: Understanding Endemic and Invasive Diseases* (R. K. Barraclough, Ed. Ornithological Monographs, (60), 86-97.
- Pantchev, A., Sting, R., Bauerfeind, R., Tyczka, J. y Sachse, K. (2009). New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* from tissue samples. *The Veterinary Journal*, 181(2), 145-150.
- Palomino-Camargo, C., González-Muñoz, Y. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, (31), 535-546.
- Ramírez Flores, O., Gavito Pérez, F. y García Martínez, M. (2009). Acciones de la CONANP en materia de especies invasoras en ANP's insulares. Encuentro nacional para la conservación y el desarrollo sustentable de las islas de México. Ensenada, B.C., del 23 al 26 de junio de 2009.
- Ramos, R., Cerdà-Cuéllar, M., Ramírez, F., Jover, L. y Ruiz, X. (2010). Influence of refuse sites on the prevalence of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* serovars in seagulls. *Applied and environmental microbiology*, 76(9), 3052-3056.
- Robinson, R. A., et al. (2010). Emerging infectious disease leads to rapid population declines of common British birds. *PLoS one*, 5(8), e12215.
- Rolain, J. M., Fenollar, F. y Raoult, D. (2007). False positive PCR detection of *Tropheryma whippelii* in the saliva of healthy people. *BMC microbiology*, 7(1), 48.
- Sánchez, M.M, Cardona-Castro, N.M. (2004). Desarrollo y evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando la secuencia del gen hilA para diagnóstico de fiebre entérica por *Salmonella* spp. *Biomédica*. 24 (2), 194-199.
- Samuel, M. D., Woodworth, B. L., Atkinson, C. T., Hart, P. J. y LaPointe, D. A. (2018). The epidemiology of avian pox and interaction with avian malaria in Hawaiian forest birds. *Ecological Monographs*, 88 (4), 621-637.
- Schlesselman, J. J. 1982. *Case-Control Studies Design, Conduct, Analysis (Monographs in Epidemiology and Biostatistics)*. Oxford, Oxford University Press.

- Schluger, N. W., Condos, R., Lewis, S. y Rom, W. N. (1994). Amplification of DNA of *Mycobacterium tuberculosis* from peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis. *The Lancet*, 344(8917), 232-233.
- Schulte-Hostedde, A. I. y Elsasser, S. C. (2011). Spleen mass, body condition, and parasite load in male American mink (*Neovison vison*). *Journal of Mammalogy*, 92(1), 221-226.
- Sebastiano, M., et al. (2017). Oxidative stress biomarkers are associated with visible clinical signs of a disease in frigatebird nestlings. *Scientific reports*, 7(1), 1599.
- Segura-Egea, J. J. (2002). Sensibilidad y especificidad de los métodos diagnósticos convencionales de la caries oclusal según la evidencia científica disponible. *Revista del Consejo de Odontólogos y Estomatólogos* (7) 5, 491-501.
- SEMARNAP. (2000). Programa de manejo: Reserva de la biosfera el Vizcaíno. Instituto nacional de ecología. Autor.
- SEMARNAT. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental. Especies nativas de México de flora y fauna silvestres. Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, 30 de diciembre de 2010. Autor.
- Sibley, D.A. (2000). *The Sibley guide to birds*. Chanticleer Press, Inc. New York.
- Siebert, U., Schwemmer, P., Guse, N., Harder, T., Garthe, S., Prenger-Berninghoff E., y Wohlsein, P. (2012). Health status of seabirds and coastal birds found at the German North Sea coast. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 54(1), 43.
- Smit, T., Eger, A., Haagsma, J. y Bakhuizen, T. (1987). Avian tuberculosis in wild birds in the Netherlands. *Journal of Wildlife Diseases*, 23(3), 485-487.
- Smith, H. M., et al. (2011). Genome sequence of the zoonotic pathogen *Chlamydophila psittaci*. *Journal of bacteriology*, 193(5), 1282-1283.
- Steele, C. M., Brown, R. N. y Botzler, R. G. (2005). Prevalences of zoonotic bacteria among seabirds in rehabilitation centers along the Pacific Coast of California and Washington, USA. *Journal of Wildlife Diseases*, 41(4), 735-744.
- Tenter, A. M., Heckerroth, A. R. y Weiss, L. M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International journal for parasitology*, 30(12), 1217-1258.
- Thomas, N.J., Hunter, D.B., Atkinson, C.T. (2008). *Infectious Diseases of Wild Birds*. Blackwell Pub. John Wiley & Sons.
- Tully, T.N, Lawton, M.P., Dorrestein, G.M. (2000). *Avian medicine*. Butterworth-Heinemann. Jordan Hill, Oxford.
- Van Riper III, C., van Riper, S. G. y Hansen, W. R. (2002). Epizootiology and effect of avian pox on Hawaiian forest birds. *The Auk*, 119(4), 929-942.
- Velarde-González, M. E. (2008). Ficha técnica de *Puffinus opisthomelas*. En: Escalante-Pliego, P. (compilador). "Fichas sobre las especies de Aves incluidas en el Proyecto de Norma Oficial

Mexicana PROY-NOM-ECOL-2000. Parte 2". Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. W042. México. D. F.

- Whiteman, N. K., Goodman, S. J., Sinclair, B. J., Walsh, T. I. M., Cunningham, A. A., Kramer, L. D., y Parker, P. G. Establishment of the avian disease vector *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae) on the Galápagos Islands, Ecuador. *Ibis*, 147(4), 844-847.
- Winfield, M. D. y Groisman, E. A. (2003). Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 69(7), 3687-3694.
- Work, T. M., Massey, J. G., Lindsay, D. S. y Dubey, J. P. (2002). Toxoplasmosis in three species of native and introduced Hawaiian birds. *Journal of Parasitology*, 88(5), 1040-1042.