



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**BACTERIAS COMO CENTINELAS AMBIENTALES, UTILIZANDO A  
LOS MAMÍFEROS MARINOS DE LAS COSTAS DE BAJA  
CALIFORNIA COMO MODELO DE SEGUIMIENTO**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

**ROSALÍA ÁVALOS TÉLLEZ**

TUTOR:

DR. FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES  
(PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL, FACULTAD DE MEDICINA  
VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. RIGOBERTO HERNÁNDEZ CASTRO  
(HOSPITAL GRAL. DR. MANUEL GEA GONZALEZ)

DR. GERARDO SUZÁN AZPIRÍ  
(FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM)

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. Enero 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **DEDICATORIA**

A mis padres:

Que han sabido guiarme a lo largo de mi vida y  
he aprendido de ellos la fortaleza para luchar por mis sueños.  
Mi madre, Rosa María Téllez, por su confianza y apoyo incondicional.  
A mi padre, Humberto Ávalos, por siempre creer en mí.

A mi hija:

Alessandra Saramaya O. Avalos,  
por ser mi motivación para ser mejor cada día.

A mis hermanos:

Gerardo, Hassan Humberto e Iván André,  
por su apoyo y cariño.

## A G R A D E C I M I E N T O S

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT),  
por otorgarme una beca para realizar mis estudios.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica,  
UNAM, a los Proyectos PAPITT-IN221314 y PAPITT- IN229111 con los cuales se  
financió este trabajo.

A mi tutor, Dr. Francisco Suárez Güemes,  
por el valioso apoyo, motivación y confianza que ha depositado en mi a lo largo de  
mis estudios de posgrado.

A mi comité tutorial y jurado de mi tesis,  
Dr. Rigoberto Hernández Castro, Dr. Gerardo Suzan Azpiri, Dra. Beatriz Arellano  
Reynoso, Dra. Araceli Contreras y Dra. Susana Méndez por sus valiosas  
aportaciones a mi tesis.

A ti, David Ramírez, que estuviste en el desarrollo y hasta el final de este proyecto,  
sin tu apoyo sin duda habría sido más difícil este camino.

Al Dr. Efrén Díaz Aparicio, Dr. Carlos Ramírez P., M en C Erika M. Carrillo, por  
su dedicación y apoyo en los artículos publicados.

Durante este largo recorrido conocí gente muy valiosa en campo, que gracias a su  
apoyo fue posible el éxito de este trabajo:

Al personal del Área de Protección de Flora y Fauna Islas del Golfo de California  
BC. (Carlos Godínez, David Ramírez, Hugo Moreno, Rito Vale y Eduardo Guillen),  
al personal del Parque Africam Safari (Dr. Marco Antonio Benítez y al Dr. Osvaldo  
Martínez González); al personal de Exportadora de Sal SA de CV. (Martín  
Domínguez, Fabián Castillo, Joaquín Rivera y Antonio), al de la Reserva de la  
Biosfera El Vizcaíno (Noé López y Javier), al señor Víctor de la Toba en Puerto  
Adolfo Mateos.

A mis compañeros de trabajo de campo:  
Octavio López, Ma. Fernanda Ramírez, Karla López, Liliana Suárez y Jesús  
Sotomayor.

A mis compañeros del laboratorio de investigación en Tuberculosis y brucelosis  
(FMVZ), por todo su apoyo y compañerismo:  
Dra. Beatriz Arellano Reynoso, Dra. Irasema Yela Miranda, Pablo Vera, Cristina  
Ibarra, Liliana Sánchez, Adrian Muñoz, Jonathan y Alejandro Benítez.

## TRABAJOS GENERADOS DE ESTA TESIS

### ARTICULOS EN REVISTAS INDEXADAS

#### *Publicados:*

Avalos-Téllez R., Ramírez-Pfeiffer C., Hernández Castro R., Díaz-Aparicio E., Sanchez-Dominguez C., Zavala-Norzagaray A., Arellano-Reynoso B., Suárez-Güemes F., Aguirre-Alonso A., Auriolos-Gamboa D. Infection of California sea lions (*Zalophus californianus*) with terrestrial *Brucella* spp. Vet. J. 2014; 202: 198-200.

Avalos-Téllez R., Carrillo-Casas EM., Atilano-lópez D., Godínez-reyes CR., Díaz-Aparicio E., Ramirez Delgado D., Ramírez-Echenique MF., Leyva-Leyva M., SuzanG., Suárez-Güemes F. Pathogenic *Leptospira* serovars in free-living sea lions in the Gulf of California and along the Baja California coast of Mexico. J Wildlif Diseases 2016, 52 (2): 199-208.

#### *En preparación:*

Avalos-Téllez R., Hernández-Castro R., Ramírez-Delgado D., Gerardo Suzán, Solana-Arellano E., and Suárez-Güemes F. **Antibiotic resistance in gram-negative bacteria isolated from free-living sea lions in the Pacific Coast of Baja California and the Gulf of California, Mexico**

### TRABAJOS EN CONGRESOS

- 2016.- *Leptospira* en lobos marinos de vida libre en las costas mexicanas. Reunión SOMEMMA. La Paz, BCS.
- 2015.- Sea lions as environment sentinels for antibiotic resistant genes in pacific sea and Gulf of California México. “Livestock production in the post antibiotic era” Uppsala, Suecia.
- 2014.- Presence of *Brucella* spp. in sea lions (*Zalophus californianus*) from San Esteban island, on the Gulf of California, Mexico”. Workshop “*Brucellosis: the use of biotechnology in molecular epidemiology, diagnosis and vaccine developmnet*”. Ciudad de México, 16 al 20 de Junio 2014.
- 2013. - Presence of *Brucella* spp. in sea lions (*Zalophus californianus*) on the Gulf of California, México. CRWAD 66<sup>TH</sup> Annual Brucellosis Research Conference, Chicago, IL, December 7-8.
- 2013. - Presence of *Brucella* spp. in sea lions (*Zalophus californianus*) on the Gulf of California, México. IAAAM 44<sup>th</sup> Annual Conference, San Francisco, EUA.

## **DECLARACIÓN**

La autora da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para que la tesis este disponible para cualquier tipo de intercambio bibliotecario.

---

**ROSALÍA AVALOS TÉLLEZ**

## PERMISOS DE REIMPRESION

---

**Asunto:** Copyright exception request

---

**De:** Daniel Mulcahy (drdanielmulcahy@gmail.com)

---

**Para:** rosaliaavalos@yahoo.com.mx;

---

**Fecha:** Miércoles, 30 de noviembre, 2016 12:07:47

---

Dr: Avalos:

Permission is granted for the use of the article you requested (below) in your Ph.D. thesis.

Thank you for publishing your work with us.

Daniel M. Mulcahy

Editor

Journal of Wildlife Diseases

---

**From:** Rosalia Avalos [mailto:]  
**Sent:** Tuesday, November 29, 2016 12:54 AM  
**To:** Kristen Anderson <kanderson@allenpress.com>  
**Cc:** Francisco Suárez Güemes <fsg@unam.mx>  
**Subject:** Request for reprint

Good night, Kristen Anderson

My name is Avalos-Tellez Rosalía, in this year it was published in the Journal Of Wildlife Diseases (52 (2): 199-208 pg) the next publication:

ELSEVIER LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS

Jan 05, 2017

---

---

This Agreement between Avalos Tellez ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4019140063728
License date	Dec 30, 2016
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	The Veterinary Journal
Licensed Content Title	Infection of California sea lions ( <i>Zalophus californianus</i> ) with terrestrial <i>Brucella</i> spp.
Licensed Content Author	Rosalía Ávalos-Téllez, Carlos Ramírez-Pfeiffer, Rigoberto Hernández-Castro, Efrén Díaz-Aparicio, Carlos Sánchez-Domínguez, Alan Zavala-Norzagaray, Beatriz Arellano-Reynoso, Francisco Suárez-Güemes, A. Alonso Aguirre, David Auriolles-Gamboa
Licensed Content Date	October 2014
Licensed Content Volume Number	202
Licensed Content Issue Number	1
Licensed Content Pages	3
Start Page	198
End Page	200
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No



## RESUMEN

El objetivo general de este trabajo fue determinar la presencia de *Brucella* spp., *Leptospira* spp., y genes de resistencia a  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en bacterias Gram negativas en lobos marinos de las islas de la Península de Baja California y utilizarlos como centinelas ambientales.

Se obtuvieron 123 muestras de hisopos anales o de heces de lobos marinos (*Zalophus californianus*) de 9 diferentes loberas para el estudio de resistencia a antibióticos en bacterias Gram negativas. Se obtuvieron 147 cepas que fueron identificadas y se determinó la resistencia a antibióticos por medio del sistema VITEK 2. Un total de 35 aislamientos bacterianos mostraron resistencia a algún tipo de antibiótico. Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se identificaron genes para  $\beta$ -lactamasas tipo bla<sub>SHV-33</sub>, bla<sub>SHV1</sub>; bla<sub>TEM-1</sub> y bla<sub>TEM-116</sub>, en 6 cepas bacterianas, todas ellas de las loberas del Océano Pacífico (5 en Isla Magdalena y 1 en isla Asunción). Por otra parte, en muestras de sangre de 22 lobos marinos en isla San Esteban en el Golfo de California, se detectó la presencia de anticuerpos contra *Brucella* spp. en suero por medio de las técnicas: rosa de Bengala, inmunodifusión radial y fluorescencia polarizada. Se realizó la detección molecular en DNA a partir de sangre por medio de PCR para la secuencia de inserción IS711, que diferencia de cepas terrestres de las marinas. El 22.7% fueron seropositivos a este microorganismo, y 2 animales mostraron la amplificación para cepas de *Brucella* de origen terrestre y otra a origen marino. Por otra parte, se analizaron 91 muestras de crías de lobo marino en 7 loberas en el O. Pacífico y Golfo de California mediante la prueba por microaglutinación (MAT), contra 11 serovariedades de *Leptospira* patógenas, en ambas regiones geográficas presentaron diferente perfil serológico. La presencia de especies patógenas de *Leptospira* en sangre fue confirmada por PCR en el 63% (n=57), no se detectaron especies saprófitas en ninguna muestra.

Este estudio permitió obtener información sobre la distribución de dos patógenos importantes en lobos marinos en dos áreas importantes de reproducción en México, que pueden mermar las poblaciones de lobos marinos en la zona. Por otra parte se obtuvo un indicador de contaminación antropogénica utilizado por primera vez en México en estos animales, el conjunto de la determinación de presencia de bacterias con resistencia a antibióticos, de *Leptospira* spp. y de *Brucella* spp., ha permitido tener una línea base del ecosistema marino de ambas costas de la península de Baja California.

**Palabras clave:** Lobo marino de California, *Zalophus californianus*, *Brucella* spp., leptospirosis, resistencia a antibióticos.

## ABSTRACT

The overall objective of this work was to determine the presence of *Brucella* spp., *Leptospira* spp. and of genes for resistance to broad-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria of sea lions from islands of the Baja California Peninsula, and its use as environmental sentinels.

A total of 123 samples of anal swabs or feces from sea lions (*Zalophus californianus*) were obtained from 9 different sea lion islands to study antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. A set of 147 strains were obtained, which were identified, and antibiotic resistance was determined by the VITEK 2 system; a total of 35 bacterial isolates showed resistance to any type of antibiotic. Genes for  $\beta$ -lactamase of bla<sub>SHV-33</sub>, bla<sub>SHV1</sub>, bla<sub>TEM-1</sub> and bla<sub>TEM-116</sub> types were identified by polymerase chain reaction (PCR) in 6 bacterial strains, all from the Pacific Ocean. The presence of *Brucella* spp. was detected in samples of 22 sea lions by serologic techniques, rose Bengal, radial immunodiffusion, polarized fluorescence, and by means of PCR for detection of IS711 in San Esteban Island in the Gulf of California, finding 22.7% of animals exposed to said microorganism, with 2 out of 5 animals showing DNA amplification for *Brucella* strains from terrestrial origin and another from sea origin. Moreover, 91 samples of sea lion in 7 sea lion islands were analyzed by microscopic agglutination test (MAT) against 11 pathogenic serovars of *Leptospira* and, different serological profiles were exhibited. The presence of pathogenic species of *Leptospira* in blood samples was confirmed by PCR in a 63% (n=57).

This study provides information of two important sea lion pathogens in significant breeding areas in Mexico. Also, this study produced for the first time in Mexico an indicator of anthropogenic pollution, and together with the presence of antibiotic-resistant bacteria of *Leptospira* spp. and *Brucella* spp. a baseline of the marine ecosystem on both coast of the Baja California Peninsula.

**Keywords:** California sea lion, *Zalophus californianus*, *Brucella* spp., leptospirosis, antibiotic resistance.

## CONTENIDO

	Página
<b>INTRODUCCIÓN</b> _____	1
<b>CAPÍTULO 1</b> _____	4
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> _____	4
Generalidades _____	4
Lobo marino ( <i>Zalophus californianus</i> ) _____	4
Brucelosis en mamíferos marinos _____	7
Resistencia a antibióticos _____	9
Leptospirosis en mamíferos marinos _____	11
<b>CAPÍTULO 2</b> _____	13
<b>Infección de <i>Brucella</i> spp. en lobos marinos (<i>Zalophus californianus</i>) con cepas terrestres.</b>	
<b>Abstract</b> _____	14
<b>Introduction</b> _____	14
<b>Material and methods</b> _____	15
<b>Results</b> _____	15
<b>Discussion</b> _____	16
<b>References</b> _____	16
<b>CAPÍTULO 3</b> _____	17
<b>Serovariedades de <i>Leptospira</i> patógenas en lobos marinos (<i>Zalophus californianus</i>) en vida libre en el Golfo de California y costas de Baja California.</b>	
<b>Abstract</b> _____	18
<b>Introduction</b> _____	18
<b>2. Material and methods</b> _____	19
2.1 <i>Animal and blood samples</i>	
2.2 <i>Bacterial culturing</i>	
2.3 <i>DNA extraction</i>	
2.4 <i>PCR targets</i>	
2.5 <i>Microscopic agglutination test</i>	
2.6 <i>Statistical analysis</i>	
<b>3. Results</b> _____	21
3.1 <i>Bacterial culture</i>	

3.2 Serology of <i>Leptospira</i> spp.	
3.3 PCR analysis	
<b>4. Discussion</b>	22
<b>References</b>	26
<b>CAPÍTULO 4</b>	28
<b>Bacterias Gram negativas con resistencia a antibióticos en lobos marinos</b>	
<b>(<i>Zalophus californianus</i>) en vida libre en el Golfo de California y Pacífico</b>	
<b>Mexicano.</b>	
<b>Abstract</b>	29
<b>1. Introduction</b>	30
<b>2. Material and methods</b>	31
2.1 Sample collection	
2.2 Bacterial identification	
2.3 Detection of <i>blaSHV</i> , <i>blaTEM</i> and <i>blaCTX-M</i> genes	
2.4 Statistical analysis	
<b>3. Results</b>	34
3.1 Bacterial identification	
3.2 PCR analysis	
<b>4. Discussion</b>	37
<b>References</b>	42
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b>	45
<b>CONCLUSIONES</b>	53
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	54

## INTRODUCCIÓN

La presencia de diversas enfermedades infecciosas, así como estresores ambientales, han mermado las poblaciones de mamíferos marinos en vida libre alrededor del mundo, haciendo difícil cuantificar la morbilidad y mortalidad en estas especies (Brownstein *et al.*, 2011). Entre los estresores ambientales se han descrito contaminantes químicos, biotoxinas de algas, bacterias con resistencia a antibióticos, patógenos emergentes y reemergentes, los cuales pueden estar en contacto con los mamíferos marinos a lo largo de las costas (Bossart, 2011; Brownstein *et al.*, 2011). Los mamíferos marinos en general son considerados buenos centinelas ambientales porque se puede inferir de ellos modificaciones en el ecosistema y su funcionalidad, esto debido a que son susceptibles a los procesos de deterioro del ambiente, están en el tope de la cadena trófica, tienen un periodo de vida largo y aunado a ello habitan a lo largo de las costas (Bossart, 2011; Arellano-Peralta & Medrano-González, 2015).

El objetivo general de este trabajo fue determinar la presencia de *Brucella* spp., *Leptospira* spp., y genes de resistencia a  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en bacterias Gram negativas aisladas de lobos marinos de las islas de la Península de Baja California.

Este estudio centró su atención en las poblaciones de lobos marinos en la región costera e insular de la península de Baja California, tanto en el Océano Pacífico (OP) y la región de las grandes islas en el Golfo de California (GC); este pinnípedo, es el más abundante en México, es una especie residente de fácil seguimiento y su distribución abarca a lo largo de la costa del pacífico Norte de la Columbia británica hacia el sur de la península de Baja California en México, incluyendo el Golfo de California (Hernández-Camacho *et al.*, 2008). En las últimas dos décadas los lobos marinos en México, han mostrado una tendencia a la baja poblacional (Auriol-Gamboa *et al.*, 2010; French *et al.*, 2011), por lo que la información acerca de la presencia o ausencia de patógenos emergentes que puedan mermar las poblaciones de esos mamíferos marinos son un parte clave para el entendimiento de este fenómeno, la cual puede ayudar para la toma de decisiones en el manejo y conservación de estas especies. Los primeros dos trabajos (capítulo 2 y 3) se encaminaron a determinar la presencia de *Brucella* spp. y *Leptospira* spp. en estos animales.

*Brucella* spp., es un agente bacteriano considerado como emergente en mamíferos marinos, este patógeno es capaz de infectar a una gran variedad de mamíferos domésticos, silvestres e incluso al humano (Moreno *et al.*, 2002; Foster *et al.*, 2007; Cloeckaert *et al.*, 2011). La brucelosis se ha asociado a abortos espontáneos e infertilidad en su huésped primario. En mamíferos marinos, actualmente se consideran dos especies nuevas en éste género, *B. pinnipedialis* y *B. ceti* (Cloeckaert *et al.*, 2011), las cuales tienen afinidad por pinnípedos y cetáceos respectivamente. En este trabajo se determinó la presencia de *Brucella* spp., mediante pruebas serológicas y por PCR en muestras de lobos marinos en Isla San Esteban en el Golfo de California. Siendo el primer trabajo que realiza la detección molecular de este patógeno en México.

Con respecto a la detección de *Leptospira* spp., en lobos marinos se ha documentado la importancia de este patógeno, su presencia en lobos marinos ha sido asociada a mortandades masivas y abortos (Roe *et al.*, 2010; Mancía *et al.*, 2012), hasta el momento no se tiene registro de eventos de mortandad masiva por Leptospirosis en el área del Golfo de California, pero se ha registrado la presencia de anticuerpos contra este patógeno (Godínez *et al.*, 1999; Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2003; Avalos-Téllez *et al.*, 2016). En este trabajo se demostró que en el Golfo de California existe una mayor diversidad de serovariedades patógenas de *Leptospira* spp. con respecto al Océano Pacífico; y que la detección de *Leptospira* spp. en sangre a partir de pruebas moleculares y la diferenciación de leptospiros patógenas de saprofitas puede ayudar a complementar el diagnóstico de este patógeno en estos animales.

Por otro lado, el lobo marino al ser una especie residente, puede proporcionarnos información acerca del ecosistema marino por medio de la detección de bacterias con resistencia a antibióticos, consideradas como un indicador de contaminación antropogénica en animales de vida libre, el cual se abordó como el último estudio realizado en el capítulo 4.

La presencia de bacterias con resistencia antibióticos en animales de vida silvestre se ha asociado directamente a actividades humanas (Skurnik *et al.*, 2006), así como la resistencia mediada por plásmidos ha sido considerada como contaminantes por si mismos (Martínez, 2009). Este trabajo evidenció la presencia de bacterias Gram negativas resistentes a antibióticos en muestras de lobos marinos en vida libre, así como la presencia de genes de resistencia a antibióticos en muestras de lobos marinos en

loberas del O. Pacífico mexicano. Esta detección de resistencia es el primer trabajo realizado en México en lobos marinos en vida libre y puede considerarse una buena herramienta para considerar el impacto antropogénico en el ecosistema marino.

Los resultados de la identificación de bacterias con resistencia a antibióticos, de *Leptospira* spp., y de *Brucella* spp., permitieron contar con datos y generar una línea base con respecto a estos tres indicadores y aportar información sobre el estado ecológico del ecosistema marino de la península de Baja California, en dos zonas de alta importancia ecológica, de conservación y económica pero con grado diferente de uso e impacto antropogénico realizados de forma integral en esta investigación muestra claras diferencias entre ambas zonas, congruente con la diferencia de uso antropogénico. El aumento en la frecuencia y aparición de estas bacterias, podrían asociarse a un desequilibrio en el ecosistema inducido por contaminación antropogénica, pudiendo afectar directamente a la salud de las poblaciones de lobos marinos en la zona, por lo que es de suma importancia contar con esta información.

## **CAPÍTULO 1**

### **REVISIÓN DE LITERATURA**

#### *Generalidades*

#### **Lobo marino (*Zalophus californianus*)**

El lobo marino de california (*Zalophus californianus*) esta clasificado dentro del grupo de los pinnípedos, el cual incluye tres familias cercanamente relacionadas dentro del orden Carnívora: Otariidae, que incluye a los lobos marinos, Odobenidae incluye a la morsa y Phocidae, que incluye a las focas; con alrededor de 30 especies (Folkens *et al.*, 2002). Todos los pinnípedos tienen un cuerpo relativamente largo y bien adaptado para la vida acuática. La familia Otariidae comprende a los lobos marinos ellos poseen orejas bien definidas, al menos hay 15 especies en 7 géneros. Los lobos marinos están divididos en 5 géneros, cada uno con una sola especie, excepto *Zalophus* donde son consideradas 2 especies (*Z. californianus californianus* y *Z. californianus wollebaeki*) (Folkens *et al.*, 2002). El lobo marino de california presenta la siguiente taxonomía:

Reino: Animal

Filo: Cordados

Subfilo: Vertebrados

Clase: Mamíferos

Orden: Carnívora

Suborden: Caniformia

Superfamilia: Pinnipedia

Familia: Otariidae

Genero: *Zalophus*

Especie: *californianus*

Nombre común: Lobo marino de california

Nombre científico: *Zalophus californianus*

#### *Descripción de la especie*

El lobo marino, como mamífero, es una especie vivípara y homeoterma, y presentan un oído externo. Posee cuatro aletas, todas desprovistas de pelo. Los testículos son escrotales (King, 1983). El lobo marino de California se caracteriza por tener las aletas posteriores relativamente cortas y presenta pelo en la superficie dorsal de la inserción



dorsal de la extremidad hacia abajo para el primer o segundo dígito. En los machos adultos, su pelo es en general de color marrón oscuro. La cresta sagital externa de los machos es prominente y muy desarrollada, al igual que los músculos del cuello (Folkens *et al.*, 2002). En las hembras adultas el pelaje varía de color marrón a paja. En el mar ambos sexos se observan de color chocolate- negro al gris. Los cachorros son de color obscuro, ligeramente más claro que las hembras y juveniles (Folkens *et al.*, 2002).

Los machos adultos pesan alrededor de 380 kg y miden aproximadamente 2.2 m de longitud, las hembras adultas son considerablemente más pequeñas, pesan cerca de 100 kg y alcanzan hasta 1.8 m de longitud (King, 1983).

Ambos sexos alcanzan la madurez sexual aproximadamente entre los 4 y 5 años de edad y la madurez física se presenta entre los 8 a 9 años de edad. Su estrategia reproductiva es por poliginia con el establecimiento de territorios. La temporada de partos en el Golfo de California se verifica de mayo hasta finales de julio (King 1983). La lactancia dura aproximadamente un año (Folkens *et al.*, 2002).

#### *Distribución geográfica*

El lobo marino de California es un animal costero, su distribución abarca desde las costas de la Columbia Británica hacia el sur de la península de Baja California en México en el Pacífico Norte, incluyendo el Golfo de California (Hernández-Camacho *et al.*, 2008). Las colonias reproductoras para el Pacífico Norte Mexicano y el Golfo de California son 21 y se localizan sobre la plataforma continental, excepto la colonia de la Isla Guadalupe, BC. (Aurioles-Gamboa *et al.*, 2010). El lobo marino de California es la especie más abundante de pinnípedos en México, y con la distribución más amplia, es por ello que durante varias décadas ha sido objeto de estudio, por lo que han sugerido que es una especie con características relevantes para el monitoreo de cambio climático y de otros cambios en el ambiente (Aurioles-Gamboa *et al.*, 2010).

Debido a que su distribución es en la plataforma continental y es donde también se desarrolla la mayor parte de las pesquerías artesanales en el noroeste de México, las interacciones con pescadores y mallas son de forma frecuente, por lo que existe evidencia de una alta tasa de enmalle que puede variar en cada lobera, y alcanzar hasta el 10% de la población total (Aurioles-Gamboa & Trillmich, 2011), afectando directamente a la población de lobos marinos.

### *Situación legal en México*

La preocupación por la conservación de los mamíferos marinos en México se puede ver reflejada en la Ley General de Vida Silvestre y en las normas oficiales mexicanas que a continuación se refieren:

- **Ley General de Vida Silvestre.** En el Título VI Conservación de la vida silvestre, capítulo I. Especies y poblaciones en riesgo y prioritarias para la conservación. En el Artículo 60 Bis, se menciona que queda prohibido el aprovechamiento extractivo, ya sea de subsistencia o comercial, de cualquier ejemplar de mamífero marino, incluyendo al lobo marino *Zalophus californianus* como parte de la fauna silvestre en nuestro país, pero se pueden expedir permisos especiales ya sea para su investigación científica u otros propósitos educativos. En el año 2006 fue anexado en esta ley en el Artículo 55 bis del Título V Disposiciones comunes para la conservación y el aprovechamiento sustentable de la vida silvestre, en el capítulo X Legal procedencia, donde mencionan que queda prohibida la importación, exportación y reexportación de ejemplares de cualquier especie de mamífero marino y primate, así como de sus partes y derivados, con excepción de aquéllos destinados a la investigación científica, previa autorización de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales SEMARNAT, la cual es el conducto del Ejecutivo Federal por la cual se ejerce la aplicación de este reglamento.
- **NOM-059-SEMARNAT-2010.** Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión cambio-Lista de especies en riesgo. Incluye al lobo marino (*Zalophus californianus*) en la clasificación de protección especial, en la categoría Pr, que se refiere a aquellas especies o poblaciones que podrían llegar a encontrarse amenazadas por factores que inciden negativamente en su viabilidad, por lo que se determina la necesidad de propiciar su recuperación y conservación de esta especie o de las poblaciones de especies asociadas. Su distribución la menciona como: no endémica, con lo cual se refiere a aquélla cuyo ámbito de distribución natural no se encuentra circunscrito únicamente al territorio nacional y las zonas donde la nación ejerce su soberanía y jurisdicción.

- **NOM-135-SEMARNAT-2004.** Para la regulación de la captura para investigación, transporte, exhibición, manejo y manutención de mamíferos marinos en cautiverio.
- **NOM-EM-136-ECOL-2002.** Norma oficial mexicana de emergencia, protección ambiental- Especificaciones para la conservación de mamíferos marinos en cautiverio. Específica las regulaciones existentes para los mamíferos marinos en cautiverio.
- **NOM-024-SEMARNAT-1993.** Por la que se establecen medidas para la protección de las especies de totoaba y vaquita en aguas de jurisdicción Federal del Golfo de California. Donde especifica la veda total e indefinida de estas especies y otras, como el delfín (*T. truncatus*), el delfín común (*Delphinus delphis*), la ballena piloto (*Globicephala macrorhynchus*), el cachalote (*Physeter macrocephalus*), la ballena de aleta (*Balaenoptera physalus*), la ballena azul (*Balaenoptera musculus*), la ballena gris (*Eschrichtius robustus*), la ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*) y el lobo marino (*Zalophus californianus*).

#### *Situación poblacional actual*

La evaluación de los censos en los lobos marinos han mostrado que la población en el Golfo de California y el Océano Pacífico va en disminución en las últimas décadas cerca del 20%, sin embargo, no todas las loberas han sido afectadas (Aurioles-Gamboa *et al.*, 2010; French *et al.*, 2011), aunque esta situación pueda ser multifactorial es importante contar con la evaluación continúa de patógenos emergentes que puedan tener un impacto negativo en la reproducción y salud de estos animales es de suma importancia para el manejo y conservación de estas especies.

#### **Brucelosis en mamíferos marinos**

Dentro de los patógenos bacterianos emergentes en mamíferos marinos, se encuentra el género *Brucella*, un grupo de cocobacilos Gram negativos, intracelulares facultativos, capaces de infectar a una gran variedad de mamíferos domésticos y silvestres, incluyendo al humano (Moreno *et al.*, 2002; Foster *et al.*, 2007; Cloeckert *et al.*, 2011). Hasta el momento se han identificado 11 especies distintas (*Brucella melitensis*, *B.*

*abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. canis*, *B. pinnipedialis*, *B. ceti*, *B. microti*, *B. inopinata* y *B. papionis*) (Nymo *et al.*, 2016).

La brucelosis es una zoonosis de distribución mundial, se caracteriza por su persistencia en el sistema reticuloendotelial y su replicación en el sistema reproductivo, ocasionando en su huésped primario abortos e infertilidad (Nymo *et al.*, 2016).

A partir de los años noventa fue aislada de cadáveres de diversos mamíferos marinos en América, Europa, Japón, Nueva Zelanda, Islas Salomón y la Antártica (Foster *et al.*, 2002; Godfroid *et al.*, 2005; Bourg *et al.*, 2007). La caracterización de estas cepas mostraron que son genéticamente distintas a las cepas de animales terrestres y que tienen como hospederos preferidos a los pinnípedos y cetáceos, por lo que se propusieron dos nuevas especies: *B. pinnipedialis* y *B. ceti* (Cloeckaert *et al.*, 2011). En cetáceos se ha descrito que ocasiona trastornos reproductivos y neurológicos, debido a que *B. ceti* tiene afinidad por el sistema nervioso central, lo que conlleva al varamiento de estos animales, siendo esto un foco de infección para las personas que entran en contacto con ellos en las playas (Moreno *et al.*, 2002). Estas especies poseen el potencial para ocasionar mortalidades masivas, contrarrestar el crecimiento de las poblaciones de animales en vida libre, incrementar el riesgo de extinción en poblaciones pequeñas, provocar la pérdida de la biodiversidad, además de tener un fuerte potencial epizootico (Moore *et al.*, 2008; Van Bresseem *et al.*, 2009; Bossart, 2011). El número de aislamientos a nivel mundial de las cepas de *Brucella* de mamíferos marinos es limitado, sin embargo, hay una fuerte evidencia serológica que sugiere que la infección está globalmente distribuida y que tiene una alta prevalencia (Nielsen *et al.*, 2005; Dawson *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2009; Bossart, 2011).

En México, se han llevado a cabo estudios serológicos en lobos marinos en el área del Golfo de California para la detección de anticuerpos contra *Brucella* spp., los cuales evidenciaron que los lobos marinos de esta región han estado en contacto con este patógeno; sin embargo, hasta el momento no se ha confirmado por medio del aislamiento en ningún mamífero marino de este país (Mena *et al.*, 2001; López, 2005; Godínez *et al.*, 2006), este trabajo es el primero que realiza su detección por técnicas moleculares.

El aislamiento e identificación microbiológica de las especies de *Brucella* utilizando características fenotípicas requiere de al menos dos semanas, de personal calificado así como de áreas de trabajo que cubran con cierto grado de bioseguridad. Por lo que es mejor utilizar técnicas de diagnóstico molecular, las cuales ofrecen ventajas en cuanto al tiempo y una menor manipulación de la muestra (McDonald *et al.*, 2006). Es por ello que en este trabajo se realizó la detección por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la secuencia de inserción IS711, la cual está insertada corriente arriba del gen bp26, gen conservado, que codifica para una proteína inmunogénica (Cloeckert *et al.*, 2000). La región IS711 ha sido descrita como una herramienta útil para la caracterización molecular de especies de *Brucella* y biovariedades, basado en el número y distribución de copias dentro del genoma bacteriano. Esta región se considera como estable y específica en cuanto a especie (Cloeckert *et al.*, 2000).

En las cepas de origen de mamíferos marinos se observó que contienen más copias de IS711 que las clásicas especies de *Brucella* a excepción de *B. ovis*, por lo que el PCR utilizado en este estudio tiene la ventaja de discriminar entre aislamientos de cepas terrestres incluyendo *B. ovis* (1029 pb) de los aislamientos de mamíferos marinos (1900pb) (Cloeckert *et al.*, 2000).

### **Bacterias con Resistencia a antibióticos**

La adquisición y diseminación de genes que codifican para la resistencia a antibióticos entre las bacterias es un fenómeno global que ha ocurrido mayormente en los últimos 50 años debido a la presión selectiva como resultado de un extenso uso de antibióticos para el uso humano y animales (Martínez y Baquero, 2002). La resistencia más frecuentemente encontrada es hacia los antibióticos del tipo  $\beta$ -lactámicos, y la más importante a nivel de salud pública es la adquirida a través de plásmidos, los cuales pueden contener genes que codifican para enzimas como las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), asimismo, estos plásmidos frecuentemente llevan además otros genes de resistencia a otro grupo de antibióticos (Paterson, 2006). Los antibióticos betalactámicos es el grupo de antimicrobianos más extenso, se clasifican en penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos e inhibidores de las betalactamasas. Las beta lactamasas son enzimas que hidrolizan el enlace amida del anillo betalactámico, inactivan a los antibióticos de este tipo, constituyen el mecanismo de

resistencia más difundido entre la población bacteriana (Yin *et al.*, 2013). Las BLEE's se describieron primeramente en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* y en menor medida en otras enterobacterias, principalmente en brotes hospitalarios, confieren resistencia a cefalosporinas de espectro extendido (Cefotaxima, ceftazidima y cefepima) y monobactámicos, y constituyen un grupo heterogéneo de enzimas (Diestra, 2010). La adquisición de resistencia a antimicrobianos, puede ser de forma natural o intrínseca, y adquirida, ya sea por transformación, transducción o por conjugación (Salysers & Witt 1994; Martínez & Baquero 2002). La diseminación de los genes productores de enzimas betalactamasas, están asociados a transposones y plásmidos conjugativos entre las distintas bacterias, y ha dado lugar a una alta prevalencia a la resistencia hacia los betalactámicos.

La continua aparición de nuevas betalactamasas ha generado diferentes clasificaciones y nomenclaturas diversas. Primeramente el nombre se asignaba con referencia a diferentes aspectos como el sustrato sobre el que actúa (CARB, OXA), sus propiedades bioquímicas (SHV), la bacteria que la produjo por primera vez (PSE descrita por primera en *Pseudomonas aeruginosa*), el paciente del que procedía la muestra (TEM, ROB) o el hospital donde estaba ingresado el paciente (MIR, RHH) y el estado al que pertenecía (OHIO), y las iniciales de los que la describieron (HSM) (Diestra, 2010). Las primeras BLEE's reportadas fueron TEM y SHV, posteriormente se han descrito una serie de mutaciones puntuales en estas enzimas y se han descrito más de 100 subtipos de estas enzimas, las cuales varían en las diferentes regiones geográficas. Una de las BLEE's más importante en la actualidad es CTX-M, que fue descrita inicialmente en enterobacterias. El incremento en la prevalencia de microorganismos con BLEE's ha sido descrito por diferentes autores a nivel mundial; estos no solo están presentes en el comportamiento nosocomial, o urbano, también en los ecosistemas naturales y marinos, y han sido detectados como una consecuencia de contaminación antropogénica (Yin *et al.*, 2013; Jobbins & Alexander, 2015).

Por otra parte, la localización de genes de resistencia en bacterias de animales silvestres ha sido una herramienta importante para estimar el grado de contaminación ambiental (Dolejska *et al.*, 2007; Stedt *et al.*, 2014; Carol *et al.*, 2015; Jobbins & Alexander, 2015). Gradualmente se ha ido considerando a la resistencia a antibióticos en bacterias y genes asociados como contaminantes ambientales y como un problema ecológico (Yin

*et al.*, 2013; Jobbins & Alexander, 2015). En los mamíferos marinos poco se conoce sobre cepas con resistencia a antibióticos y su posible origen (Greig *et al.*, 2007; Brownstein *et al.*, 2011). Sin embargo, se cree puedan provenir de los desechos de los asentamientos humanos en las zonas costeras (Brownstein *et al.*, 2011), considerando las características de los mamíferos marinos como centinelas es posible emplearlos para la detección de estas cepas bacterianas con genes con resistencia a antibióticos.

## **Leptospirosis en lobos marinos**

### *Descripción General*

Otra enfermedad bacteriana reconocida a nivel mundial como causa de muerte en los lobos marinos es la leptospirosis causada por la espiroqueta *Leptospira*, además de la importancia en la salud pública de las poblaciones humanas (Acha & Szyfres, 2001). Existen más de 200 serovariedades de *Leptospira* reconocidas que se clasifican en 23 serogrupos. Las pruebas serológicas constituyen el medio más utilizado para el diagnóstico y la prueba de aglutinación microscópica (MAT) es la prueba serológica estándar (OIE, 2014).

La leptospirosis en lobos marinos se reportó por primera vez en 1970, en un brote epidémico en el centro y costas del norte del estado de California, EUA, por *Leptospira interrogans* serovar Pomona, y se han repetido estos eventos de mortalidad cíclicamente cada 3-5 años desde 1984, por lo que es considerada una enfermedad emergente en lobos marinos (Lloyd-Smith *et al.*, 2007). La epidemiología no ha sido esclarecida, así como tampoco el mantenimiento de este patógeno en estos animales. Diversos factores pueden ocasionar este evento cíclico, incluyendo cuestiones ambientales, cambios en la densidad del hospedero, cambio antigénico en la bacteria, o cambios en la proporción de la población del hospedero que es inmune a la enfermedad, esto está relacionado con el concepto de inmunidad silenciosa “Herd immunity” (Lloyd-Smith *et al.*, 2007). La leptospirosis es una enfermedad de distribución mundial, sin embargo su prevalencia difiere entre las poblaciones de lobos marinos; si bien en México no se han reportado brotes epizooticos en la zona, se han reportado hallazgos serológicos (Godínez *et al.*, 1999; Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2003), que son importantes seguir monitoreando por algún cambio en la presencia, frecuencia, y tipo de serotipo presente en esta zona, que

nos permita contar con información fehaciente al momento de una contingencia de este tipo.

La infección por *Leptospira* se caracteriza por colonizar el hígado y los riñones, causando insuficiencia renal aguda y la muerte (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2003). Esta bacteria afecta a todos los grupos etarios, en los lobos marinos, se cree que su transmisión se produce por contacto directo o indirecto con la orina infectada o agua contaminada con orina de animales portadores (Zuerner & Bolin, 1997). La detección molecular de *Leptospira* es de gran ayuda para descartar especies saprófitas y se puede realizar mediante el análisis del ADNr 16S (OIE, 2014). Es por ello que en este trabajo además de la determinación del serotipo mediante la técnica de MAT se realizó la PCR para diferenciar cepas saprófitas de cepas patógenas a partir de ADN de muestras de sangre.



## CAPÍTULO 2

### Infección de *Brucella* spp. en lobos marinos (*Zalophus californianus*) con cepas terrestres.

Reimpresión autorizada.

Artículo Publicado:

The Veterinary Journal 202 (2014) 198–200



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

The Veterinary Journal

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/tvjl](http://www.elsevier.com/locate/tvjl)



Short Communication

### Infection of California sea lions (*Zalophus californianus*) with terrestrial *Brucella* spp.



Rosalía Ávalos-Téllez <sup>a</sup>, Carlos Ramírez-Pfeiffer <sup>b,\*</sup>, Rigoberto Hernández-Castro <sup>c</sup>,  
Efrén Díaz-Aparicio <sup>d</sup>, Carlos Sánchez-Domínguez <sup>e</sup>, Alan Zavala-Norzagaray <sup>f</sup>,  
Beatriz Arellano-Reynoso <sup>a</sup>, Francisco Suárez-Güemes <sup>a</sup>, A. Alonso Aguirre <sup>g,h</sup>,  
David Aurióles-Gamboa <sup>i</sup>



## Short Communication

Infection of California sea lions (*Zalophus californianus*) with terrestrial *Brucella* spp.

Rosalía Ávalos-Téllez<sup>a</sup>, Carlos Ramírez-Pfeiffer<sup>b,\*</sup>, Rigoberto Hernández-Castro<sup>c</sup>, Efrén Díaz-Aparicio<sup>d</sup>, Carlos Sánchez-Domínguez<sup>e</sup>, Alan Zavala-Norzagaray<sup>f</sup>, Beatriz Arellano-Reynoso<sup>a</sup>, Francisco Suárez-Güemes<sup>a</sup>, A. Alonso Aguirre<sup>g,h</sup>, David Auriolos-Gamboa<sup>i</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, Mexico

<sup>b</sup> Campo Experimental Río Bravo, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias Río Bravo, Tam 88900, Mexico

<sup>c</sup> Dirección de Investigación, Hospital General Dr. Manuel Gea González, Tlalpan 14080, Mexico

<sup>d</sup> Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Animal, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, Cuajimalpa 05110, Mexico

<sup>e</sup> Chicago Zoological Society/Brookfield Zoo, Chicago, IL 60513, USA

<sup>f</sup> Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional de Sinaloa, Unidad Guasave, Sin 81101, Mexico

<sup>g</sup> Department of Environmental Science and Policy, George Mason University, Fairfax, VA 22030, USA

<sup>h</sup> Smithsonian-Mason School of Conservation, Front Royal, VA 22630, USA

<sup>i</sup> Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, La Paz, Baja California Sur 23096, Mexico

## ARTICLE INFO

## Article history:

Accepted 26 June 2014

## Keywords:

California sea lion

*Brucella* spp.

Agar gel immunodiffusion

Fluorescence polarization

PCR

Rose Bengal test

## ABSTRACT

Infections with *Brucella ceti* and *pinnipedialis* are prevalent in marine mammals worldwide. A total of 22 California sea lions (*Zalophus californianus*) were examined to determine their exposure to *Brucella* spp. at San Esteban Island in the Gulf of California, Mexico, in June and July 2011. Although samples of blood, vaginal mucus and milk cultured negative for these bacteria, the application of rose Bengal, agar gel immunodiffusion, PCR and modified fluorescence polarization assays found that five animals (22.7%) had evidence of exposure to *Brucella* strains. The data also suggested that in two of these five sea lions the strains involved were of terrestrial origin, a novel finding in marine mammals. Further work will be required to validate and determine the epidemiological significance of this finding.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

There is serological evidence of the widespread exposure of marine mammals to both *Brucella ceti* and *B. pinnipedialis*, and infection is associated with reproductive, respiratory and neurological disease (Godfroid et al., 2012). The objective of this study was to determine the exposure of California sea lions (CSL) (*Zalophus californianus*) from San Esteban Island (28° 41' 31.82" N, 112° 34' 14.33" W) in the Gulf of California, Mexico, to *Brucella* spp. between 20 June and 15 July 2011. The research was conducted as part of the Proyecto de la Red del Medio Ambiente "Estado de salud, uso sustentable y conservación del Golfo de California" of the Centre of Interdisciplinary Marine Sciences (CICIMAR) with the permission of the Secretaries of Environment and Natural Resources (SEMARNAT; SGPA/DGVS/02012/11) and of the Interior (SEGOB, SATI/PC/006/111) of Mexico.

The sampled CSLs were physically restrained with a hoop net, chemically anesthetized using isoflurane (Isothesia, Butler Animal Health Supply) and then sampled following injection with 1 mL oxytocin containing 10 mg/2 mL metoclopramide (Ceva Animal Health). Blood was obtained from the jugular vein of 22 animals into EDTA and serum separator tubes (BD, Vacutainer). In addition, vaginal swabs from 10 adult females were taken using Amies medium with activated charcoal (Copan), and milk was sampled from eight nursing females, using sterile milk suction pumps. The CSLs were released back into the ocean once they had fully recovered from the anesthesia.

The samples were held in coolers with 'blue ice' until their arrival at the laboratory based at the Francisco de Ulloa Research Vessel. Here, vaginal swabs, milk and whole blood were kept at 4 °C and serum samples at –20 °C. At the end of the sampling trip, the samples were air-transported to the Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Animal of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias in Mexico City for further analysis.

\* Corresponding author. Tel.: +52 899 9464220.

E-mail address: [carlosrami@gmail.com](mailto:carlosrami@gmail.com) (C. Ramírez-Pfeiffer).

<sup>1</sup> Current address: Coordinación de Investigación, Universidad México Americana del Norte AC, Reynosa, Tam 88630, Mexico.

**Table 1**Results of a range of diagnostic tests to detect exposure to *Brucella* spp. carried out on California sea lions sampled on San Esteban Island in the Gulf of California, Mexico.

Animal	ID	Bacterial culture	RBT	AGID	PCR	FPA	
						Standard	Modified
Adult females	F1	–	+	+	T	65.7	69.1
	F2	–	–	–	–	21.7	63.6
	F3	–	–	–	–	83.7	87
	F4	–	+	+	T	81.1	80.9
	F5	–	–	–	–	–126	60.55
	F6	–	–	–	–	69.5	66
	F7	–	–	–	–	61.5	65.3
	F8	–	–	–	–	–76.6	9.5
	F9	–	–	–	–	–455	61.95
	F10	–	–	–	–	16.2	168.2
Juveniles	J1	–	–	–	–	31.7	60.95
	J2	–	–	–	–	56.5	58.85
	J3	–	–	–	–	125.6	122.4
	J4	–	–	–	–	64.4	61.8
	J5	–	–	–	–	48.4	62.55
	J6	–	–	–	M	–0.35	133.2
	J7	–	–	–	–	62	61.9
	J8	–	–	–	–	55.2	64.7
	J9	–	–	–	–	68.9	66.75
	J10	–	–	–	–	69.8	65.5
Pups	C1	–	–	–	–	74.7	64.15
	C2	ND	–	–	–	70.2	63.8
Controls	Negative <sup>a</sup>	–	–	–	–	74.7	64.45
	Positive <sup>a</sup>	–	–	–	–	248.8	252.7
	Negative <sup>b</sup>	–	–	–	–	61.9	64.75
	Positive <sup>b</sup>	–	–	–	–	172.4	195.3

RBT, rose Bengal test; AGID, agar gel immunodiffusion test; FPA, fluorescence polarization assay in which the mean of two replicate determinations  $\geq 96$ mP was considered significant (Nielsen et al., 2005); T, PCR amplified for terrestrial *Brucella* spp.; M, PCR amplified for marine *Brucella* spp.

<sup>a</sup> Diachemix FPA kit controls.

<sup>b</sup> FPA goat controls.

Vaginal swabs and milk samples were cultured on Columbia, Farrell, and *Brucella* agar (Oxoid) and blood samples in Ruiz-Castañeda biphasic culture medium: samples where no growth had occurred after 15 days incubation at 37 °C, with and without CO<sub>2</sub>, were considered culture negative. Rose Bengal (RBT) and agar gel immunodiffusion (AGID) tests were performed (Díaz-Aparicio et al., 1991) using *B. abortus* 1119–3 strain (ABA Test Tarjeta, Pronabive) and *B. melitensis* 16M native hapten (produced in-house) as antigens, respectively. Positive and negative bovine serum samples were used as test controls.

A modified fluorescence polarization assay (FPA) procedure was performed as 'outliers' were detected on preliminary FPA (*Brucella* Antibody Test Bovine, Diachemix). In brief, 40  $\mu$ L of serum were added to 1 mL test tubes containing EDTA-Tris dilution buffer (Nielsen et al., 1996a). Following mixing and incubation at room temperature for 60 min, basic fluorescence polarization was measured (FP Sentry 1000 reader, Diachemix). Subsequently, 10  $\mu$ L of *Brucella abortus* tracer were added, mixed, and incubated, and a final measurement carried out. Reader parameters were adjusted to 20 readings/period instead of the 10/period used initially. The mean value of two FPA repetitions was used in antibody evaluation: the cut-off of  $\geq 90$  millipolarization (mP) units suggested by Nielsen et al. (2005) was taken as a positive antibody level. The reading acceptance range was between 60 and 250 mP. Kit controls and known FPA positive and negative goat sera were used as controls, and all outlier data were excluded.

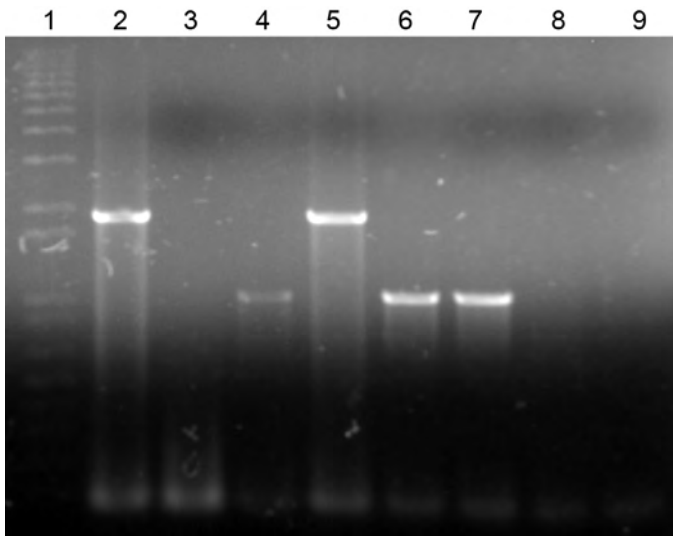
Genomic DNA was extracted from blood and milk samples using the DNeasy blood and tissue kit (Qiagen). PCR primers 26A: 5'GCCCTGACATAACCCGCTT 3' and 26B: 5'GAGCGTGACATTTGCCGATA 3' (Cloekaert et al., 2000) designed on the polymorphism of the *bp26* gene and its flanking regions, in which amplification of 1029 and 1900 bp fragments was anticipated in the case of 'terrestrial' and 'marine' strains of *Brucella* spp. respectively, were used. *Brucella abortus* 2308 and *B. pinnipedialis* B2/94 were used as positive controls. To confirm

PCR products, they were sequenced, using the same primers, and submitted to GenBank databases using the Blast-n program.

Clinical examinations did not reveal evidence of disease or injuries in any of the 22 sampled CSL (10 adult females; 10 juveniles; 2 pups), and anesthesia was successful in all cases. Although all 22 animals were negative on culture, five (22.7%) were positive to at least one of the other diagnostic tests (Table 1). Two animals (9.1%), F1 and F4, were RBT/AGID/PCR positive (Table 1), and amplified for 'terrestrial' *Brucella* spp. (Fig. 1). Animals F10, J3 and J6 (14%), were FPA positive, and J6 amplified for marine *Brucella* spp. The obtained sequences, which do not differentiate between strains of *Brucella* spp., displayed 100% identity with *B. pinnipedialis* B2/94 and *B. ceti* B1/94, for marine strains, and with *B. abortus* 2308, among others, for terrestrial strains, in BLAST analyses.

Preliminary results obtained using the standard FPA found 10 outlier samples (data not shown), possibly caused by the presence of serum lipid (Lucero et al., 2007), and this number was reduced to 2 when the modified assay was applied. Although not previously validated for CSLs, the FPA, along with a cELISA have been proposed as the screening tests of choice for seals (Nielsen et al., 1996a, 1996b, 2005; Aguirre et al., 2007; Lynch et al., 2011). Nevertheless, it would seem prudent to test a greater number of CSL samples to validate the FPA cut-off. Despite the fact that the RBT has a higher sensitivity but lower specificity than the AGID, when used in cattle and goats (Díaz-Aparicio et al., 1991), both of these assays showed a similar sensitivity to that achieved by PCR in our hands.

Although *Brucella* spp. were not isolated on culture of the various samples taken in the current study, the relatively high seroprevalence found, taken together with the three PCR-positive results, suggests that the sampled CSLs had been exposed to these organisms as previously reported (Nielsen et al., 1996b, 2005; Aguirre et al., 2007; Goldstein et al., 2009; Godfroid et al., 2012). Although considered quite host specific, cross-species infection of terrestrial mammals with *Brucella* spp. have been reported (Samaha et al.,



**Fig. 1.** PCR amplification of 1029 and 1900 bp fragments of *bp26* gene to identify 'terrestrial' and 'marine' strains of *Brucella* spp., respectively. *Brucella abortus* 2308 and *B. pinnipedialis* B2/94 were used as positive controls. To confirm, PCR products were sequenced, using the same primers, and submitted to GenBank databases using the Blast-n program. Lane 1, 1 kb plus DNA ladder; lane 2, *B. pinnipedialis* B2/94 (1900 bp) – control for 'marine' species; lane 3, negative control; lane 4, *B. abortus* 2308 (1029 bp) – control for 'terrestrial' species; lane 5, California sea lion J6 (1900 bp) – negative on serological tests; lane 6, California sea lion F1 (1029 bp) – positive on RBT, AGID and FPA; lane 7, California sea lion F4 (1029 bp) – positive on RBT and AGID; lane 8, California sea lion F10 – negative on RBT and AGID and positive on FPA; and lane 9, California sea lion F2 – negative on RBT, AGID and FPA. RBT, Rose Bengal test; AGID, agar gel immunodiffusion test; FPA, fluorescence polarization assay.

2008). Following experimental infection, terrestrial mammals seroconverted to marine strains (Perrett et al., 2004); conversely, the evidence suggests such strains are not pathogenic to livestock (J. Godfroid, personal communication). To our knowledge, this is the first evidence of a terrestrial strain of *Brucella* spp. infecting CSLs, but further research will be required to validate this finding and to ascertain the source of the infection.

#### Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

#### Acknowledgements

This study was supported by REDMA-IPN – Estado de Salud, 'Uso Sustentable y Conservación del Golfo de California', and SIP-20120061 granted to D.A.G. We thank the crew of the Francisco de Ulloa Research Vessel for their support, and Dr. Daniel Ortega-Ochoa from Megafarma S.A. de C.V., for kindly supplying the *Brucella abortus* FPA test kit. In addition, we acknowledge the financial support of EcoHealth Alliance, and both the Marisla and Panaphil Foundations. Furthermore, we are grateful to Dr. Ricardo Gomez-Flores for his help in revising the manuscript.

#### References

- Aguirre, A.A., Keefe, T.J., Reif, J.S., Kashinsky, L., Yochem, P., Saliki, J.T., Stott, J.L., Goldstein, T., Dubey, J.P., Braun, R., et al., 2007. Infectious disease monitoring of the endangered Hawaiian monk seal. *Journal of Wildlife Diseases* 43, 229–241.
- Cloekaert, A., Grayon, M., Grepinet, O., 2000. An IS711 element downstream of the *bp26* gene is a specific marker of *Brucella* spp. isolated from marine mammals. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology* 7, 835–839.
- Díaz-Aparicio, E., Marin, C., Aragón, V., Perez, S., Blasco, J.M., Moriyon, I., 1991. Evaluation of serological tests for diagnosis of *B. melitensis* infection in goats. *Journal of Clinical Microbiology* 32, 1159–1165.
- Godfroid, J., Nymo, I.H., Tryland, M., Cloekaert, A., Jauniaux, T., Whatmore, A.M., Moreno, E., Foster, G., 2012. *Brucella ceti* and *Brucella pinnipedialis* infections in marine mammals. In: Aguirre, A.A., Ostfeld, R.S., Daszak, P. (Eds.), *New Directions in Conservation Medicine: Applied Cases of Ecological Health*, Oxford University Press, New York, pp. 257–269.
- Goldstein, T., Zabka, T.S., DeLong, R.L., Wheeler, E.A., Ylitalo, G., Bargu, S., Silver, M., Leighfield, T., Van Dolah, F., Langlois, G., et al., 2009. The role of domoic acid in abortion and premature parturition of California sea lions (*Zalophus californianus*) on San Miguel Island, California. *Journal of Wildlife Diseases* 45, 91–108.
- Lucero, N.E., Ayala, S.M., Escobar, I.E., Jacob, N.R., 2007. The value of serologic tests for diagnosis and follow up of patients having brucellosis. *American Journal of Infectious Diseases* 3, 27–35.
- Lynch, M., Duignan, P.J., Taylor, T., Nielsen, O., Kirkwood, R., Gibbens, J., Arnould, J.P.Y., 2011. Epizootiology of *Brucella* infection in Australian fur seals. *Journal of Wildlife Diseases* 47, 352–363.
- Nielsen, K., Gall, D., Jolley, M., Leishman, G., Balsevicus, S., Smith, P., Nicoletti, P., Thomas, F., 1996a. A homogeneous fluorescence polarization antibody assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. *Journal of Immunology Methods* 195, 161–168.
- Nielsen, O., Nielsen, K., Stewart, R.E.A., 1996b. Serologic evidence of *Brucella* spp. exposure in Atlantic walruses (*Odobenus rosmarus rosmarus*) and ringed seals (*Phoca hispida*) of Arctic Canada. *Arctic* 49, 383–386.
- Nielsen, O., Nielsen, K., Braun, R., Kelly, L., 2005. A comparison of four serologic assays in screening for *Brucella* exposure in Hawaiian monk seals. *Journal of Wildlife Diseases* 41, 126–133.
- Perrett, L.L., Brew, S.D., Stack, J.A., MacMillan, A.P., Bashiruddin, J.B., 2004. Experimental assessment of the pathogenicity of *Brucella* strains from marine mammals for pregnant sheep. *Small Ruminant Research* 51, 221–228.
- Samaha, H., Al-Rowaily, M., Khoudair, R.M., Ashour, H.M., 2008. Multicenter study of brucellosis in Egypt. *Emerging Infectious Diseases* 14, 1916–1918.

## CAPÍTULO 3

**Serovariedades de *Leptospira* patógenas en lobos marinos (*Zalophus californianus*) en vida libre en el Golfo de California y costas de Baja California.**

Reimpresión autorizada.

Artículo Publicado:

---

DOI: 10.7589/2015-06-133

*Journal of Wildlife Diseases*, 52(2), 2016, pp. 000-000  
© Wildlife Disease Association 2016

### **PATHOGENIC *LEPTOSPIRA* SEROVARS IN FREE-LIVING SEA LIONS IN THE GULF OF CALIFORNIA AND ALONG THE BAJA CALIFORNIA COAST OF MEXICO**

Rosalía Avalos-Téllez,<sup>1,6,7</sup> Erika M. Carrillo-Casas,<sup>2,6</sup> Daniel Atilano-López,<sup>1</sup> Carlos R. Godínez-Reyes,<sup>3</sup> Efrén Díaz-Aparicio,<sup>4</sup> David Ramírez-Delgado,<sup>3</sup> María F. Ramírez-Echenique,<sup>1</sup> Margarita Leyva-Leyva,<sup>2</sup> Gerardo Suzán,<sup>5</sup> and Francisco Suárez-Güemes<sup>1,8</sup>

## PATHOGENIC *LEPTOSPIRA* SEROVARS IN FREE-LIVING SEA LIONS IN THE GULF OF CALIFORNIA AND ALONG THE BAJA CALIFORNIA COAST OF MEXICO

Rosalía Avalos-Téllez,<sup>1,6,7</sup> Erika M. Carrillo-Casas,<sup>2,7</sup> Daniel Atilano-López,<sup>1</sup> Carlos R. Godínez-Reyes,<sup>3</sup> Efrén Díaz-Aparicio,<sup>4</sup> David Ramírez-Delgado,<sup>3</sup> María F. Ramírez-Echenique,<sup>1</sup> Margarita Leyva-Leyva,<sup>2</sup> Gerardo Suzán,<sup>5</sup> and Francisco Suárez-Güemes<sup>1,8</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, 04510, México

<sup>2</sup> Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad, Dirección de Investigación, Hospital General Dr. Manuel Gea González, Tlalpan, 14080, México

<sup>3</sup> APFF Islas del Golfo de California BC, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas SEMARNAT, Avenida del Puerto #375, Fracc, Playa Ensenada, Ensenada, Baja California, 22880, México

<sup>4</sup> Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Animal, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, Cuajimalpa, 05110, México

<sup>5</sup> Departamento de Etología, Fauna Silvestre y Animales de Laboratorio, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, 04510, México

<sup>6</sup> Current address: APFF Islas del Golfo de California BC, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas SEMARNAT, Avenida del Puerto #375, Fracc, Playa Ensenada, Ensenada, Baja California, 22880, México

<sup>7</sup> These authors contributed equally to this manuscript.

<sup>8</sup> Corresponding author (email: fsg@unam.mx)

**ABSTRACT:** The California sea lion (*Zalophus californianus*), a permanent inhabitant of the Gulf of California in Mexico, is susceptible to pathogenic *Leptospira* spp. infection, which can result in hepatic and renal damage and may lead to renal failure and death. During summer 2013, we used the microscopic agglutination test (MAT) to investigate the prevalence of anti-*Leptospira* antibodies in blood of clinically healthy sea lion pups from seven rookery islands on the Pacific Coast of Baja California (Pacific Ocean) and in the Gulf of California. We also used PCR to examine blood for *Leptospira* DNA. Isolation of *Leptospira* in liquid media was unsuccessful. We found higher antibody prevalence in sea lions from the rookery islands in the gulf than in those from the Pacific Coast. Antibodies against 11 serovars were identified in the Gulf of California population; the most frequent reactions were against serovars Bataviae (90%), Pyrogenes (86%), Wolffi (86%), Celledoni (71%), and Pomona (65%). In the Pacific Ocean population, MAT was positive against eight serovars, where Wolffi (88%), Pomona (75%), and Bataviae (70%) were the most frequent. Serum samples agglutinated with more than one *Leptospira* serovar. The maximum titer was 3,200. Each island had a different serology profile, and islands combined showed a distinct profile for each region. We detected pathogenic *Leptospira* DNA in 63% of blood samples, but we found no saprophytic *Leptospira*. Positive PCR results were obtained in blood samples with high and low MAT titers. Together, these two methods enhance the diagnosis and interpretation of sea lion leptospirosis. Our results may be related to human activities or the presence of other reservoirs with which sea lions interact, and they may also be related to sea lion stranding.

**Key words:** California sea lions, *Leptospira*, leptospirosis, marine mammal, microscopic agglutination test (MAT), PCR, *Zalophus californianus*.

### INTRODUCTION

The California sea lion (*Zalophus californianus*) is a protected marine mammal worldwide. The genus *Zalophus* contains three species of sea lions: *Zalophus japonicus*, which has been extinct since 1950 but once inhabited the Japanese archipelago; *Zalophus wallebaeki*, which inhabits the Galapagos Islands; and *Z. californianus*, which is distributed in the western part of the Northern

Hemisphere. *Zalophus californianus* is the most abundant pinniped species in Mexico and a permanent inhabitant of the Gulf of California (Aurioles-Gamboa 1993). Its distribution extends from British Columbia, Canada (51°N), to the Mary Islands (19°N), and the Pacific Coast and Gulf of California, Mexico (King 1983). These mammals are under special protection by Mexican federal regulation NOM-059-ECOL-2010 (SEMARNAT



2010). Nevertheless, the population has decreased in recent decades (Hernández-Camacho et al. 2008). The genus *Leptospira* (phylum Spirochaetes) causes leptospirosis worldwide, and it is a cause of sea lion deaths in the northern Pacific Ocean (Gulland et al. 1996; Greig 2005). In mammals, the disease is transmitted through direct or indirect contact with infected urine or with water contaminated by the urine of animal reservoirs (Monahan et al. 2009). However, in sea lions, the mode of transmission is unknown.

*Leptospira* infection in sea lions affects all ages and is characterized by bacterial colonization of the liver and kidneys, causing acute renal failure and death. In adult sea lions, *Leptospira* is one of the most frequent causes of stranding (Mancia et al. 2012). Its prevalence differs among populations: In Southern California, leptospirosis was formerly considered a rare disease in sea lions stranded between 1970 and 1981 (Trillmich et al. 1991), but its prevalence has increased and is now considered epizootic (Gulland et al. 1996). The only serovar that has been isolated from sea lions is *Leptospira interrogans* serovar Pomona (Zuerner and Alt 2009; Prager et al. 2013). In contrast, in New Zealand, leptospirosis is not considered a health threat due to its low prevalence (Roe et al. 2010). It is not known whether recurring epidemics in sea lion populations are due to external sources of infection, such as contact with wildlife or other carrier animal species, or due to internal epidemic cycles related to the population's changing immunity. The latter cause may involve the protection of individuals due to previous infections, or offspring and individual migration between groups, resulting in a higher percentage of susceptible individuals leading to outbreaks (Lloyd-Smith et al. 2007).

Sea lions are distributed along the Pacific Ocean coasts and the Gulf of California, and their populations have been threatened by several *Leptospira* serovars (Gulland et al. 1996; Godinez et al. 1999; Acevedo-Whitehouse et al. 2003). We assessed the antibody prevalence and the presence of *Leptospira* in sea lion pups from seven reproductive islands in this area.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals and blood samples

Under the Mexican government authorization SGPA/2897/12, we sampled sea lion pups during June 2013 in the Pacific Ocean islands of Asuncion (27°06'N, 114°17'W), Natividad (27°52'N, 115°11'W), and Cedros (28°11'N, 115°13'W), and during July 2013 in the Gulf of California islands Granito (29°33'N, 113°32'W), Coloradito (24°18'N, 110°21'W), Los Cantiles (29°32'N, 113°29'W), El Partido (28°54'N, 113°02'W), and Roca Consag (31°06'N, 114°27'W) (Fig. 1).

We collected 91 blood samples using 18-gauge, 38-mm needles from the jugular vein of manually restrained California sea lion pups. If needed, inhaled anesthesia was applied with induction of 5% isoflurane and maintenance at 3% (Haulena and Heath 2001). Blood samples were taken in a minimally invasive manner from 51 pups from rookeries of five islands in the Gulf of California and from 40 pups from three rookeries in the Pacific Ocean. The samples were deposited in sterile tubes for serum separation and into tubes with sodium citrate. Blood samples were refrigerated and transported to the laboratory, and serum aliquots were frozen at -20 C until used. Additionally, each animal was examined for clinical signs of disease, and weight, measurements, and body temperature were recorded (Luque-Flores and Auriolos-Gamboa 2001).

### Bacterial culturing

Three drops of each blood sample were placed into semisolid Fletcher medium at the moment of sampling and transported to the laboratory. Each sample was subcultured in Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) liquid medium and maintained at 30 C. Cultures were periodically observed by dark field microscopy to detect spirochaetal forms. Cultures were maintained for 6 mo before being considered negative.

### DNA extraction

We extracted DNA from blood samples with the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Valencia, California, USA), according to the manufacturer's recommendations and suspended in 50 µL of nuclease-free water. The DNA was quantified using an Epoch microplate spectrophotometer (Biotek, Winooski, Vermont, USA) and stored at 4 C until used for PCR.

### PCR targets

The PCR targets were the 23S rDNA, which identifies DNA from the genus *Leptospira*, the IS1500 insertion sequence, which identifies only *L.*

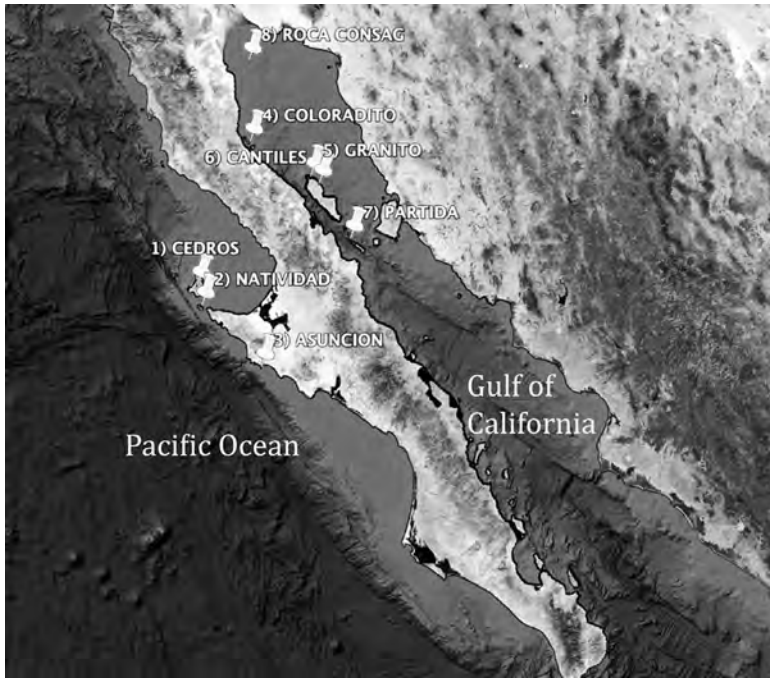


FIGURE 1. Locations of seven islands along the Pacific Coast of California and the Gulf of California, Mexico, where California sea lions (*Zalophus californianus*) were tested for *Leptospira* infection.

*interrogans* (sensu lato), and the 16S rRNA, which identifies only saprophytic *Leptospira*. The *Leptospira* genus-specific primers L737 (5'-GACCC-GAAGCCTGTCGAG-3') and L1218 (5'-GCCATGCTTAGTCCCGATTAC-3'), based on the 23S rDNA (Woo et al. 1998), were used to amplify a 482-base-pair (bp) fragment in a final volume of 50  $\mu$ L with 0.5  $\mu$ g of DNA, 1.2  $\mu$ M of each primer, 0.2 mM of each deoxyribonucleotides (dNTP), 10  $\mu$ L of 5X GoTaq Flexi Buffer, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mg/mL of bovine serum albumin (BSA), and 2.5 U GoTaq (Promega, Madison, Wisconsin, USA). The PCR protocol was an initial denaturation at 94 C for 5 min, followed by 45 cycles of denaturation at 94 C for 15 s, annealing at 59 C for 40 s, and extension at 74 C for 1 min and 20 s, and a final extension at 74 C for 10 min. To specifically amplify the IS1500 insertion sequence of *L. interrogans* (sensu lato) (Zuerner and Bolin 1997), the primers P1 (5'-TCGCTGAAATRGWGTTTCGT-3') and M16 (5'-CGCCTGGYTCMCCGATT-3') were used in a final volume of 50  $\mu$ L with 0.5  $\mu$ g of DNA, 1  $\mu$ M of each primer, 0.2 mM of each dNTP, 10  $\mu$ L of 5X GoTaq Flexi Buffer, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mg/mL of BSA, 1% Triton X-100, and 2.5 U GoTaq (Promega). The same PCR conditions were used to identify saprophytic *Leptospira* species, with the primers (5'-AGAAATTTGTGCTAATAACCAATGT-3') and (5'-GGCGTCGCTGCTTCAGCCTTCG-3'), based on the *rrs* gene of the 16S

rRNA (Murgia et al. 1997), which amplified a 240-bp fragment. Reactions with a final volume of 50  $\mu$ L contained 0.5  $\mu$ g of DNA, 0.6  $\mu$ M of each primer, 0.2 mM of each dNTP, 10  $\mu$ L of 5X GoTaq Flexi Buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1 U GoTaq (Promega). The PCR protocol was an initial denaturation at 94 C for 5 min, followed by 40 cycles of denaturation at 94 C for 30 s, annealing at 60 C for 45 s, and extension at 74 C for 1 min with an increment of 5 s/cycle and a final extension at 74 C for 10 min. Control amplification templates included water as a negative control and genomic DNA of serovars Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Canicola, Celledoni, Grippothyphosa, Hardjoprajitno, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes, Tarassovi, Wolffi, and Biflexa serovar Patoc strain Patoc. Amplified products were visualized by electrophoresis on 1.6% agarose gels and staining with ethidium bromide.

**Microscopic agglutination test**

The microscopic agglutination test (MAT) was performed as described by the Panamerican Health Organization (Myers 1985). Four to 7-d cultures of 12 *Leptospira* serovars—Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Canicola, Celledoni, Grippothyphosa, Hardjoprajitno, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes, Tarassovi, and Wolffi, grown in EMJH—were used as antigens. These serovars are part of the collection of the Microbiology and



TABLE 1. Prevalence (by microscopic agglutination test) of antibodies to *Leptospira* serovars in 91 serum samples from California sea lion (*Zalophus californianus*) pups (51 from the Gulf of California and 40 from the Pacific Ocean sites), June–July 2013. The maximum titer represents the reciprocal of the highest dilution with positive agglutination.<sup>a</sup>

Serovar	Gulf of California (%)	Maximum titer	Pacific Ocean (%)	Maximum titer	Combined result (%)
Wolffi	86	200	88	400	87
Celldoni	71	200	0	N/A	40
Bataviae	90	800	70	1,600	81
Pyrogenes	86	800	18	800	56
Pomona	65	400	75	200	69
Icterohaemorrhagiae	39	200	0	N/A	22
Canicola	41	800	10	200	27
Tarassovi	43	1,600	3	800	25
Grippotyphosa	37	1,600	18	200	29
Autumnalis	29	3,200	8	1,600	20
Bratislava	16	400	0	N/A	9
Hardjoprajitno	0	N/A	0	N/A	0

<sup>a</sup> N/A = no agglutination observed.

Immunology Department, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Serum samples were diluted 1:50 for screening, and 50- $\mu$ L aliquots of the 12 serovars were added to Nunc 96-well flat-bottom microtiter plates (Nalge Nunc International, Rochester, New York, USA). A negative control was included for each serovar. The plate was gently stirred and incubated at room temperature for 1 h. Plates were read by dark field microscopy (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). A serial dilution of each serum sample (1:50 to 1:3,200) was used to determine the titer for each serovar, with the final titer representing the reciprocal of the maximum dilution at which agglutination was observed.

### Statistical analysis

Descriptive statistics were applied to the MAT results, and statistical analysis of the PCR results was performed using Graphpad Prism software (GraphPad Software, La Jolla, California, USA). Spearman's rank correlation was used to assess the correlation among the three PCRs. Analysis of variance and Tukey's tests were applied to each serovar, and Student's *t*-test was used to compare between regions (Pacific vs. Gulf of California).

## RESULTS

### Bacterial culture

No spirochaetal forms were observed, and all blood samples were considered negative after 6 mo.

### Serology of *Leptospira* spp.

For the interpretation of MAT results, a cutoff titer was not established given that sea lions are not vaccinated. Serum antibodies against at least one *Leptospira* serovar were detected in all serum samples.

In the Pacific Ocean samples, positive MAT reactions were observed against eight serovars. No reactions occurred against four serovars (Table 1). In the Gulf of California samples, there were MAT reactions against 11 of the 12 serovars (Table 1). Each island showed a unique MAT pattern to the serovars tested (Table 2).

There was a statistically significant difference in frequency among serovars ( $P < 0.0001$ ). A significant difference in frequency was found between samples from the Gulf of California and the Pacific Coasts for serovars Bataviae ( $P < 0.0001$ ), Canicola ( $P = 0.0009$ ), Pomona ( $P = 0.0336$ ), Pyrogenes ( $P < 0.0001$ ), Tarassovi ( $P < 0.0001$ ), and Autumnalis ( $P = 0.0128$ ). The only serovar with prevalences that were not significantly different between sampling areas was Wolffi ( $P = 0.9045$ ). A statistical analysis of the remaining serovars were not conducted because they were not present in the Pacific Ocean samples.

### PCR analysis

We analyzed 91 DNA samples by PCR. Amplification of the 23S rRNA identified *Leptospira* in 47 samples (52%). The PCR based on the IS1500 insertion sequence detected DNA of pathogenic *L. interrogans* (sensu lato) in 28 samples (31%). The IS1500 PCR identified 10 blood samples positive for *Leptospira* that had previously been negative to the 23S rRNA PCR. Despite the low correlation between them ( $r_s=0.117$ ), we assumed that the identification with IS1500, which is only present in pathogenic *Leptospira*, indicated the general presence of the genus *Leptospira*. Therefore, the combined result of both PCRs indicated that 63% ( $n=57$ ) of samples were positive, and 37% ( $n=34$ ) of samples were negative. By the 16S-based PCR, none of the samples tested was identified as a carrier of saprophytic serovars.

In comparison to the MAT results, 48 PCR-positive samples had their highest titers to *L. interrogans* (sensu stricto), including serovars Autumnalis, Bataviae, Canicola, Wolffi, Icterohaemorrhagiae, Pomona, and Pyrogenes. Ten PCR-positive samples had maximum titers to *Leptospira borgpetersenii*, namely, serovar Tarassovi, and seven PCR-positive samples had their maximum titer to *Leptospira kirschneri*, represented by serovar Grippytyphosa. Of those samples with highest titer to more than one serovar, seven had titers corresponding to more than one *Leptospira* species (Table 3). Samples with high (1,600) and low (50) titers were positive by PCR.

### DISCUSSION

Our MAT results indicate that the Gulf of California has a higher prevalence of pathogenic *Leptospira* serovars than the Pacific Ocean. In the serum samples from the Gulf of California, positive agglutination was observed to 11 serovars from the 12 tested in MAT, while in the Pacific Ocean samples, agglutination was observed to only eight serovars. Additionally, the serum samples tested by MAT from the Pacific Ocean were positive to at least one serovar, and up to five serovars,

while samples from the Gulf of California were positive to at least two, and up to nine serovars. However, MAT results cannot rule out cross-reactive antibodies. Previous studies report asymptomatic carriage of *Leptospira* in sea lions (Cameron et al. 2008; Prager et al. 2013), consistent with our observations of no signs of leptospirosis during sampling. Regarding the maximum titers in sea lions, the rookeries in the Gulf of California had higher titers compared to those of the Pacific islands, and only one sample had titers of 3,200. A similar titer was reported previously for serovars Wolffi, Pomona, and Bataviae (Pedernera-Romano 2004). However, animals that developed disease had higher titers (Prager et al. 2013).

The serovars we report differ from those reported by Godinez et al. (1999); the main difference is that we report serovar Celledoni in the area. Also, Godinez et al. (1999) reported a low frequency of serovar Icterohaemorrhagiae, while in our study, the frequency of serovar Icterohaemorrhagiae was higher in four islands. The *Leptospira* serovars varied among sea lion rookeries (Table 2), highlighting the changes in *Leptospira* prevalence, and the relevance of epidemiologic surveillance (SEMARNAT 2014).

Serovars Pyrogenes, Ballum, Wolffi, Celledoni, and Pyrogenes had been previously reported in the Gulf of California (Pedernera-Romano 2004), and we found a high prevalence of these serovars, in addition to serovars Pomona and Bataviae, with Bataviae being the most frequent. This high prevalence was observed in geographically distant rookeries with different characteristics. For example, Coloradito and El Partido are small islands rarely visited by humans. El Coloradito, El Partido, and Consag are occasionally used by fishermen as a refuge during unfavorable weather or as a journey station, but this is not frequent or for prolonged periods, making it difficult to invoke anthropogenic contamination as a source of *Leptospira*.

The islands in the Pacific Ocean were highly uniform with respect to antibody prevalence. Serovars found with high frequency were Wolffi, Pomona, and Bataviae,

TABLE 2. Frequent *Leptospira* serovars in each California sea lion (*Zalophus californianus*) rookery or island, the number of microscopic agglutination test (MAT)-positive serum samples, percentage positive, and the maximum MAT titer at which agglutination was observed.

Rookery/Island	Frequent serovar	No. positive sera	% Positive	Maximum titer	
Asunción	Bataviae	8	80	200	
	Canicola	1	10	100	
	Pomona	7	70	100	
	Pyrogenes	2	20	800	
	Wolffi	10	100	200	
	Autumnalis	1	10	800	
Natividad	Bataviae	5	45	400	
	Grippotyphosa	3	27	200	
	Pomona	6	55	100	
	Pyrogenes	2	18	400	
Cedros	Wolffi	10	91	400	
	Bataviae	15	79	1,600	
	Canicola	3	16	200	
	Grippotyphosa	4	21	200	
	Pomona	17	90	200	
	Pyrogenes	3	16	800	
	Tarassovi	1	5	800	
	Wolffi	15	79	200	
Coloradito	Autumnalis	2	11	1,600	
	Bataviae	10	100	400	
	Bratislava	1	10	200	
	Canicola	10	100	200	
	Grippotyphosa	7	70	600	
	Icterohaemorrhagiae	6	60	100	
	Pomona	7	70	200	
	Pyrogenes	10	100	200	
	Tarassovi	7	70	1,600	
	Wolffi	7	70	200	
	Autumnalis	4	40	1,600	
	Celledoni	3	30	100	
	Granito	Bataviae	5	50	400
		Canicola	3	30	200
Grippotyphosa		1	10	100	
Icterohaemorrhagiae		5	50	200	
Pomona		1	10	100	
Pyrogenes		3	30	200	
Tarassovi		3	30	800	
Wolffi		8	80	200	
Autumnalis		3	30	1,600	
Celledoni		7	70	100	
Cantiles	Bataviae	10	100	400	
	Canicola	1	10	200	
	Grippotyphosa	1	10	50	
	Icterohaemorrhagiae	3	30	200	
	Pomona	8	80	200	
	Pyrogenes	10	100	400	
	Tarassovi	1	10	800	
	Wolffi	10	100	200	
	Autumnalis	3	30	800	
	Celledoni	9	90	100	

TABLE 2. Continued.

Rookery/Island	Frequent serovar	No. positive sera	% Positive	Maximum titer
El Partido	Bataviae	10	100	800
	Bratislava	3	30	400
	Canicola	3	30	200
	Grippotyphosa	3	30	200
	Icterohaemorrhagiae	5	50	100
	Pomona	6	60	400
	Pyrogenes	10	100	800
	Tarassovi	5	50	800
	Wolffi	8	80	200
	Autumnalis	2	20	3,200
Roca Consag	Celledoni	8	80	200
	Bataviae	11	100	800
	Bratislava	4	36	400
	Canicola	4	36	800
	Grippotyphosa	7	64	800
	Icterohaemorrhagiae	1	9	50
	Pomona	11	100	200
	Pyrogenes	11	100	400
	Tarassovi	6	55	1,600
	Wolffi	11	100	200
Autumnalis	3	27	400	
Celledoni	9	82	200	

and prevalences for serovars Celledoni and Pyrogenes were low. Four serovars were not identified in the Pacific Ocean islands, and most of the serum samples had low antibody titers (Table 2). Asuncion and Natividad islands do not have recent reports of feral mice, dogs, or rats. In contrast, Cedros is populated by humans, and sea lion contact with feral dogs, cats, mice, and rats is more likely. In fact, feral dogs are common predators of sea lions (Gallo-Reynoso and García-Aguilar 2008). On Cedros, we found titers of 1,600 and 800 in two and four sea lions, respectively. On Asunción and Natividad, we found low titers (100). These differences may be explained by contact with carrier animals in Cedros and in two more islands, and due to migration of juveniles and males among these three nearby islands.

The serovars frequently found in the Pacific Ocean samples were Pomona, Wolffi, and Bataviae. This agrees with work on the California coast by Vedros et al. (1971), who identified serovar Pomona as the most frequent

*L. interrogans* serovar, which was later isolated by Prager et al. (2013). This observation might be also related to the sea lions' migration behavior, which may influence the distribution of *Leptospira* among islands, even in the absence of a classic carrier of this pathogen.

Our PCR protocols were chosen to identify the genus *Leptospira* and *L. interrogans* (sensu lato), mainly because, to our knowledge, only *L. interrogans* serovar Pomona has been isolated from sea lions (Prager et al. 2013). We detected *Leptospira* DNA in 63% of the sea lions and measured antibody prevalence in these samples. A positive PCR did not always correspond with higher titers, which were as low as 50. *Leptospira* DNA was present in the blood of healthy sea lion pups in which antibody titers varied from 50 to 1,600 without clinical signs of disease. However, bacterial viability cannot be assessed by PCR.

These results, and the fact that the sampling was during the breeding season, suggest that leptospires were likely transmitted between adults and pups by close contact. It is

TABLE 3. PCR result of each positive California sea lion (*Zalophus californianus*) sample, rookery, or island, to the 23S-, IS1500-, and 16S-based PCRs, paired to the *Leptospira* serovar(s) and the maximum microscopic agglutination test titer.

Sample	Rookery/ Island	PCR <sup>a</sup>			Serovar <sup>b</sup>	Highest titer
		23S	IS1500	16S		
1	Coloradito	P	P	N	AUT	1,600
2	Coloradito	P	P	N	GRI	1,600
3	Coloradito	P	P	N	PYR	200
5	Coloradito	P	P	N	GRI	800
6	Coloradito	N	P	N	GRI/BAT	1,600
7	Coloradito	P	P	N	GRI	800
9	Coloradito	P	P	N	AUT	800
10	Coloradito	P	N	N	AUT	1,600
12	Granito	P	N	N	AUT	1,600
13	Granito	P	N	N	TAR	400
15	Granito	P	N	N	WOL	200
17	Granito	P	N	N	CAN	200
18	Granito	P	N	N	WOL	100
19	Granito	P	P	N	WOL	50
20	Granito	P	N	N	AUT	800
21	Cantiles	P	N	N	TAR	800
22	Cantiles	P	N	N	CAN	200
23	Cantiles	P	N	N	PYR	400
24	Cantiles	P	N	N	PYR	400
26	Cantiles	P	N	N	ICT/POM/WOL	200
28	Cantiles	P	N	N	AUT	800
30	Cantiles	N	P	N	AUT	800
31	Partida	P	P	N	AUT	1,600
33	Partida	P	N	N	BAT/PYR/TAR	200
35	Partida	P	P	N	BRA/PYR	400
36	Partida	P	P	N	TAR	800
Gy	Partida	P	P	N	BAT	800
40	Partida	P	N	N	BAT/PYR	400
41	Consag	P	N	N	PYR	400
42	Consag	P	P	N	GRI	800
43	Consag	P	N	N	BAT/CAN/TAR	800
44	Consag	P	P	N	BAT/CAN/TAR	800
45	Consag	P	N	N	GRI	800
46	Consag	P	N	N	TAR	1,600
47	Consag	P	P	N	BAT/TAR	800
49	Consag	P	P	N	BAT/PYR	400
50	Consag	N	P	N	BAT/PYR	400
51	Consag	N	P	N	TAR/PYR	1,600
52	Asuncion	N	P	N	AUT	800
53	Asuncion	P	N	N	BAT	200
54	Asuncion	P	N	N	BAT/WOL	50
55	Asuncion	P	N	N	BAT	100
56	Asuncion	P	N	N	BAT	100
59	Asuncion	P	N	N	PYR	800
60	Asuncion	P	N	N	WOL	100
63	Natividad	P	N	N	WOL	200
64	Natividad	P	N	N	WOL	100

TABLE 3. Continued.

Sample	Rookery/ Island	PCR <sup>a</sup>			Serovar <sup>b</sup>	Highest titer
		23S	IS1500	16S		
67	Natividad	N	P	N	GRI/WOL	200
70	Natividad	N	P	N	BAT	200
72	Natividad	P	P	N	BAT	400
73	Natividad	N	P	N	BAT	200
74	Cedros	N	P	N	POM/WOL	100
79	Cedros	P	P	N	WOL	100
80	Cedros	P	N	N	WOL	100
84	Cedros	N	P	N	WOL	100
85	Cedros	P	N	N	TAR	800
90	Cedros	P	P	N	BAT	200

<sup>a</sup> P = positive; N = negative.

<sup>b</sup> BAT = *Leptospira interrogans* serogroup Bataviae serovar Bataviae; AUT = *L. interrogans* serogroup Autumnalis serovar Autumnalis; WOL = *L. interrogans* serogroup Sejroe serovar Wolffi; CAN = *L. interrogans* serogroup Canicola serovar Canicola; ICT = *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae serovar Icterohaemorrhagiae; POM = *L. interrogans* serogroup Pomona serovar Pomona; PYR = *L. interrogans* serogroup Pyrogenes serovar Pyrogenes; GRI = *Leptospira kirschneri* serogroup Grippityphosa serovar Grippityphosa; TAR = *Leptospira borgpetersenii* serogroup Tarassovi serovar Tarassovi.

possible that some environmental factors, such as “El Niño,” cause behavior changes in adults and pups. In addition, changes in host population susceptibility rather than pathogen availability may cause outbreaks, such as the northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*) strandings on the coast of California (Colegrove et al. 2005) and the epidemic outbreak in California sea lions on the California coast (Gulland et al. 1996).

Antibodies against the saprophytic serovar, *Leptospira* Patoc, were previously reported by MAT in 53.8% of sea lion pups on 11 breeding islands in the Gulf of California (Pedernera-Romano 2004). However, saprophytic serovars were not included in our MAT, and we found no positive samples using the 16S PCR.

Our data suggest a threat to the health of these protected sea lions. We encourage further study of human activities and other conditions that promote the presence of *Leptospira* serovars in sea lions, as well as how their asymptomatic carrier status can change into a health condition leading to stranding.

**ACKNOWLEDGMENTS**

This study was supported by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tec-

nológica (PAPIIT) grants IN221314 and IN229111, Universidad Nacional Autónoma de México. We thank Hugo Moreno Prado, Rito Vale Navarro, Eduardo Guillén Díaz, and Joel Prieto Ceseña, rangers in the Área de Protección de Flora y Fauna Islas del Golfo de California, Baja California, National Commission for Natural Protected Areas, DVM; Osvaldo Martínez Rey from the African Safari Zoo; and personnel of Exportadora de Sal Sociedad Anónima de Capital Variable for their logistical support. Rosalía Avalos received Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología scholarship 201527. We thank Eloísa Reyes for statistical assistance and Michael F. Dunn for critical review of the manuscript.

**LITERATURE CITED**

Acevedo-Whitehouse K, De La Cueva H, Gulland FM, Auriolos-Gamboa D, Arellano-Carbajal F, Suarez-Guemes F. 2003. Evidence of *Leptospira interrogans* infection in California sea lion pups from the Gulf of California. *J Wildl Dis* 39:145–151.

Auriolos-Gamboa D. 1993. Biodiversidad y estado actual de los mamíferos marinos en México. *Rev Soc Mex Hist Natur* XLIV:397–412.

Cameron CE, Zuerner RL, Raverty S, Colegrove KM, Norman SA, Lambourn DM, Jeffries SJ, Gulland FM. 2008. Detection of pathogenic *Leptospira* bacteria in pinniped populations via PCR and identification of a source of transmission for zoonotic leptospirosis in the marine environment. *J Clin Microbiol* 46:1728–1733.

Colegrove KM, Lowenstine LJ, Gulland FM. 2005. Leptospirosis in northern elephant seals (*Mirounga*



- angustirostris*) stranded along the California coast. *J Wildl Dis* 41:426–430.
- Gallo-Reynoso JP, García-Aguilar MC. 2008. Análisis preliminar de la presencia de perros ferales en la isla de cedros, Baja California. *Rev Mex Mastozool* 12:130–140.
- Godínez CR, Zelaya De Romillo B, Aurióles-Gamboa D, Verdugo-Rodríguez A, Rodríguez-Reyes EA, De La Pena-Moctezuma A. 1999. Antibodies against *Leptospira interrogans* in California sea lion pups from Gulf of California. *J Wildl Dis* 35:108–111.
- Greig DJ. 2005. A decade of live California sea lion (*Zalophus californianus*) strandings along the central California coast: Causes and trends, 1991–2000. *Aquat Mammals* 31:11–22.
- Gulland FM, Koski M, Lowenstine LJ, Colagross A, Morgan L, Spraker T. 1996. Leptospirosis in California sea lions (*Zalophus californianus*) stranded along the central California coast, 1981–1994. *J Wildl Dis* 32:572–580.
- Haulena M, Heath RB. 2001. Marine mammal anesthesia. In: *Handbook of marine mammal medicine: Health, disease, and rehabilitation*, 2nd Ed., Dierauf LA, Gulland FM, editors. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 662–670.
- Hernández-Camacho CJ, Aureoles-Gamboa D, Laake J, Gerber LR. 2008. Survival rates of the California sea lion, *Zalophus californianus*, in Mexico. *J Mammal* 89:1059–1066.
- King JE. 1983. *Seals of the world*. Cornell University Press, Ithaca, New York, 240 pp.
- Lloyd-Smith JO, Greig DJ, Hietala S, Ghneim GS, Palmer L, St Leger J, Grenfell BT, Gulland FM. 2007. Cyclical changes in seroprevalence of leptospirosis in California sea lions: Endemic and epidemic disease in one host species? *BMC Infect Dis* 7:125.
- Luque-Flores SP, Aurióles-Gamboa D. 2001. Sex differences in body size and body condition of California sea lion (*Zalophus californianus*) pups from the Gulf of California. *Mar Mamm Sci* 17:147–160.
- Mancia A, Ryan JC, Chapman RW, Wu Q, Warr GW, Gulland FM, Van Dolah FM. 2012. Health status, infection and disease in California sea lions (*Zalophus californianus*) studied using a canine microarray platform and machine-learning approaches. *Dev Comp Immunol* 36:629–637.
- Monahan AM, Miller IS, Nally JE. 2009. Leptospirosis: Risks during recreational activities. *J Appl Microbiol* 107:707–716.
- Murgia R, Riquelme N, Baranton G, Cinco M. 1997. Oligonucleotides specific for pathogenic and saprophytic *Leptospira* occurring in water. *FEMS Microbiol Lett* 148:27–34.
- Myers DM. 1985. Manual de métodos para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis. *Nota Técnica No. 30*. Centro Panamericano de Zoonosis, OPS/OMS, Buenos Aires, Argentina, 46 pp.
- Pedernera-Romano C. 2004. *Regionalización de la presencia de anticuerpos contra Leptospira spp, niveles de cortisol y valores hemáticos en once colonias de lobos marinos Zalophus californianus en el Golfo de California*. Maestría en Ciencias de la Salud y la Producción Animal, Wildlife, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, México, 73 pp.
- Prager KC, Greig DJ, Alt DP, Galloway RL, Hornsby RL, Palmer LJ, Soper J, Wu Q, Zuerner RL, Gulland FM, et al. 2013. Asymptomatic and chronic carriage of *Leptospira interrogans* serovar Pomona in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Vet Microbiol* 164:177–183.
- Roe WD, Rogers LE, Gartrell BD, Chilvers BL, Duignan PJ. 2010. Serologic evaluation of New Zealand sea lions for exposure to *Brucella* and *Leptospira* spp. *J Wildl Dis* 46:1295–1299.
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2010. *Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, 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, Gobierno Federal Mexicano, México DF, México, 38 pp.
- SEMARNAT. 2014. Protocolo de monitoreo no 2: Monitoreo de la población y condición de salud del lobo marino de California (*Zalophus californianus californianus*) en las colonias de reproducción del Golfo de California, en los Estados de Baja California, Sonora, Baja California Sur y Sinaloa. Programa de monitoreo Biológico (PROMOBI) Ejercicio Fiscal 2015. In: CNANP-SEMARNAT, editor, *Anexo 2*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México DF, México, 7 pp.
- Trillmich F, Ono KA. 1991. *Pinnipeds and El Niño: Responses to environmental stress*. Springer, Berlin, Germany, 293 pp.
- Vedros NA, Smith AW, Schonewald J, Migaki G, Hubbard RC. 1971. Leptospirosis epizootic among California sea lions. *Science* 172:1250–1251.
- Woo TH, Patel BK, Smythe LD, Norris MA, Symonds ML, Dohnt MF. 1998. Identification of pathogenic *Leptospira* by TaqMan probe in a LightCycler. *Anal Biochem* 256:132–134.
- Zuerner RL, Alt DP. 2009. Variable nucleotide tandem-repeat analysis revealing a unique group of *Leptospira interrogans* serovar Pomona isolates associated with California sea lions. *J Clin Microbiol* 47:1202–1205.
- Zuerner RL, Bolin CA. 1997. Differentiation of *Leptospira interrogans* isolates by IS1500 hybridization and PCR assays. *J Clin Microbiol* 35:2612–2617.

Submitted for publication 1 June 2015.

Accepted 10 November 2015.

## CAPÍTULO 4

**Bacterias Gram negativas con resistencia a antibióticos en lobos marinos (*Zalophus californianus*) en vida libre en el Golfo de California y Pacífico Mexicano.**

Artículo en Preparación:

**Antibiotic resistance in gram-negative bacteria isolated from free-living sea lions in the Pacific Coast of Baja California and the Gulf of California, Mexico**

*Rosalía Avalos-Téllez<sup>1, 2</sup>, Rigoberto Hernández-Castro<sup>3</sup>, David Ramírez-Delgado<sup>2</sup>, Gerardo Suzán<sup>4</sup>, Elena Solana-Arellano<sup>5</sup>, and Francisco Suárez-Güemes<sup>1,\*</sup>*

<sup>1</sup> *Departamento de Microbiología e Inmunología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Coyoacán, 04510, México.*

<sup>2</sup> *APFF Islas del Golfo de California BC. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas SEMARNAT, Av. Del Puerto #375, Frac. Playa Ensenada, Ensenada. Baja California. 22880, México.*

<sup>3</sup> *Departamento de Ecología de Agentes Patógenos. Hospital General Dr. Manuel Gea González. Tlalpan, 14080, México.*

<sup>4</sup> *Departamento de Etología, Fauna Silvestre y Animales de Laboratorio. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Coyoacán, 04510, México.*

<sup>5</sup> *Departamento de Oceanología. Laboratorio de Ecología Matemática. CICESE. Carretera Ensenada Tijuana 3918. Zona Playitas. Ensenada, Baja California. 22860, México.*

*\*Corresponding author e-mail: [fsg@unam.mx](mailto:fsg@unam.mx), Tel.: + 52 55 56225884/Fax + 52 55 56162342*



## **Abstract**

Antibiotic resistant bacteria are gradually being considered environmental pollutants and an ecological problem. The California sea lion (*Zalophus californianus californianus*) is a resident of the Gulf of California and the North Pacific and could potentially be used as sentinel for environment alterations. The aim of this study was to identify antibiotic resistant bacteria from sea lions in the Gulf of California and the Pacific Coast of Baja California. From 2011 to 2013, a total of 123 samples from rectal swabs and feces were obtained from 9 rookeries in these two locations. Bacterial identification and antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) were performed using the VITEK 2 system (bioMérieux, France). The *bla*-SHV, *bla*-TEM and *bla*-CTX-M beta-lactamases genes were detected by PCR. A total of 147 bacterial isolates were obtained, with 35 isolates from both locations showing resistance to a variety of antibiotics as follows: ampicillin (12 strains), nitrofurantoin (11 strains), cefazolin, ampicillin/sulbactam (10 strains), and cefoxitin (8 strains), aztreonam and trimethoprim/sulfamethoxazole (5 strains). From the Pacific Coast isolates, we identified  $\beta$ -lactamases genes sequences congruent to blaSHV-33 in *Klebsiella oxytoca* and *Klebsiella pneumoniae* strains; blaTEM-1 in three strains (*K. pneumoniae*, *Yakonella regensburgei* and *Serratia marcescens*), KPC-1 in *Edwardsiella tarda* strain. Considering these results, it is likely that Pacific rookeries and the adjacent coastal water are more commonly affected by the anthropogenic activities than other areas in the Gulf of California, and that the sea lion population may serve as a good sentinel for antibiotic resistance as an environmental pollutant and contaminant. To the author's knowledge, this is the first study to report these findings in Mexico and in the California sea lion population of the Gulf of California and the North Pacific coast.

**Keywords:** antibiotic bacterial resistant, California sea lion, *Zalophus californianus*, zoonotic.

## **Introduction**

Acquisition and dissemination of genes coding for antibiotic resistance in bacteria is a global phenomenon that has occurred in the last 50 years, mostly due to selective pressure, and likely the result of extensive use of antibiotics in humans and animals (McManus *et al.*, 2002, Smith *et al.*, 2002, Singer *et al.*, 2003, Cabello, 2006). The most common antibiotic resistance reported is to  $\beta$ -lactams. Of utmost importance and of public health concern, is the resistance acquired through plasmids which may contain genes encoding enzymes such as  $\beta$ -lactamases (ESBL) (Paterson, 2006). Antibiotic resistance in bacteria and genes associated with resistance, have been increasingly considered as environmental contaminants of ecological concern (Yin *et al.*, 2013; Jobbins & Alexander 2015). Thus, the presence of resistance genes in bacteria identified in wild-life species is potentially an important tool for estimating the degree of environmental contamination (Dolejska *et al.*, 2007; Stedt *et al.*, 2014, Carrol 2015, Jobbins & Alexander 2015).

Marine mammals are considered good environmental sentinels because they are at the top of the food chain, share common habitats with humans, are relatively long-lived, are susceptible to the processes of environmental deterioration and as such, certain modifications in the ecosystem can be inferred from them (Bossart, 2011; Arellano-Peralta and Medrano-González, 2015).

The Gulf of California and the Mexican Pacific north coast line are considered highly productive and biodiverse regions of conservation importance due to the high number of refuge sites and endemism of priority species such as the breeding and resting colonies of sea lions (*Z. californianus*) (Arriaga-Cabreara *et al.* 1998; Arriaga *et al.*, 2000). The aim of this study was to evaluate the presence of antibiotic resistant bacteria and ESBLs from bacteria isolated from rectal swabs obtained from sea lions in the Gulf of California and the Pacific coast of Baja California.

## **Material and methods**

### **Sample collection**

Samples were obtained from 9 different rookeries located at the east and west of the Baja California peninsula between 2011 and 2013. Geographical locations for pup samples obtained from rookeries located in the Gulf of California (GC) were: Granito (29° 33' N, 113° 32' W), Machos (29°18' N, 113°29' W), Partido (28° 54' N, 113° 02' W), and Roca Consag (31° 06' N, 114° 27' W). Samples from juveniles and adults were obtained from a rookery in the North of San Esteban Island (28° 41' 31.82"N, 112° 34'14.33"). Geographical locations for pup samples obtained from rookeries located in the Pacific Ocean (OP) were: Asunción Island (27° 06'N, 114° 17' W), and Natividad Island (27° 52' N, 115° 11'W). Samples from juveniles and adults were obtained from rookeries in Magdalena Island (24°48'16.55 N, 112°17'59.39 W) and Santo Domingo (24°14'33.79 N, 114°6'49.81) (Fig. 1).

Free-ranging sea lions were manually restrained and chemically anaesthetized using inhaled isoflourane (Isothesia, Butler Animal Health Supply, Dublin, OH, USA). Anesthesia, respiratory and cardiac rates were monitored throughout the procedure. Rectal swabs were collected with a sterile swab introduced directly into the anus and smoothly rubbed against the anal mucosa in a circular motion. Individual swabs were placed into AMIES with charcoal transport medium (Copan, Italy), kept at 4°C and processed for bacterial culture and isolation. Before being released back to the ocean, sampled sea lions were held in a net until fully recovered from anesthesia.



**Fig 1.** Colonies in the Gulf of California and the Pacific Ocean included in this study are: 1) Roca Consag, 2) Granito, 3) Los Machos, 4) El Partido, and 5) San Esteban. Colonies in Pacific Ocean are: 6) Santo Domingo, 7) Natividad, 8) Asuncion and 9) Magdalena.

### **Bacterial identification**

All samples were processed by conventional bacteriologic techniques. Samples were inoculated in MacConkey agar (Oxoid, England) and incubated under aerobic conditions for 24-48 h at 37°C. Each different colony was then sub-cultured in MacConkey and Trypticase soy agar (TSA), for further characterization. Bacterial identification and antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) were done using the VITEK 2 automatic system (bioMérieux, France). Susceptibility testing included a panel of 22 different antimicrobial agents: amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin/sulbactam, cefazolin, cefepime, cefoxitin, aztreonam, gatifloxacin, piperacillin, ticarcillin/clavulanic acid, ceftazidime, ceftriaxone, ciprofloxacin, imipenem, levofloxacin, piperacillin/tazobactam, amikacin, ampicillin, cefotaxime,

gentamicin, tobramycin, trimethoprim/sulfamethoxazole, and nitrofurantoin in accordance with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines.

In addition, disk diffusion test for tetracycline (30 mg) was determined. Disks were placed on Muller-Hinton Agar (Oxoid) and incubated at 37°C for 18 to 20 h. *E. coli* ATCC 25922 was used as reference strain for susceptibility testing. All isolates were stored at -70°C in brain heart infusion broth (Oxoid, England) containing 50% glycerol.

#### **Detection of *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> genes**

Plasmid DNA was extracted using a Plasmid plus Midi Kit (Qiagen, Chatsworth, CA, USA) following the manufacturer's protocol. Detection of antibiotic resistance genes (*bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub>) was performed by polymerase chain reaction (PCR) as previously described (Paterson, 2003). All PCRs were performed in a final volume of 25 µl consisting in 6 µl of H<sub>2</sub>O, 12 µl of master mix (Invitrogen, USA), 1 µl (25 pmol) of each primer, and 5 µl of DNA (50 ng). All gene amplifications were performed using the following PCR protocol: initial denaturation at 94°C for 5 min followed by 30 cycles of 92°C for 30 sec, 52°C for 40 sec, and 72°C for 50 sec, and final extension at 72°C for 5 min. The amplification products were purified using a QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, La Jolla, CA, USA) as recommended by the manufacturers. Nucleotide sequence was determined in both directions with Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing and analyzed on an Applied Biosystems 3730 DNA sequencing system (Foster City, CA, USA). The consensus sequence was submitted to the GenBank database for homology search using Blastn program.

## Results

### Description of the bacterial isolates

A total of 123 bacteriological samples were obtained from 9 rookeries, 43 from the GC and 80 from the PO rookeries. A total of 147 bacterial isolates were obtained from both locations, including 17 bacterial genera and 22 different bacterial species. Of these isolates, 35 strains showed resistance to at least one antibiotic tested (Table 1).

#### *Pacific Ocean isolates*

From the PO samples, 88 strains (88/100) were isolated, 26 of them were antibiotic resistance bacteria (ARB) (29.5%, n=88), and 6 strains of ABR had evidence for the  $\beta$ -lactamase genes tested. Of all ARB in the PO, 9 different bacterial genera and 10 different species were found. The ARB frequency found was: *Escherichia coli* (53.8%), *Edwardsiella tarda*, *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens* (7.69%) and *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Yokenella regensburgei* (3.85%). The main antibiotic resistance found was against ampicillin/sulbactam (9 strains), nitrofurantoin (6 strain); ampicillin, aztreonam, cefazolin, trimetropim/sulfamethoxazole (4 strains); cefoxitin (3 strains); tobramycin, piperacillin, amoxicillin/clavulanic acid (2 strains); ticarcilin/clavulanic acid, cefotaxime, ceftriaxone and amikacin (1 strain) (Table 2 and Graphic 1).

No AMR to tetracycline, cefepime, ceftazidime, ciprofloxacin, gatifloxacin, gentamicin, imipenem, levofloxacin, piperacillin were detected in PO strains isolated.

**Table 1.** Distribution of bacteria resistant to antibiotics of sea lions in the Gulf of California and the Pacific Ocean

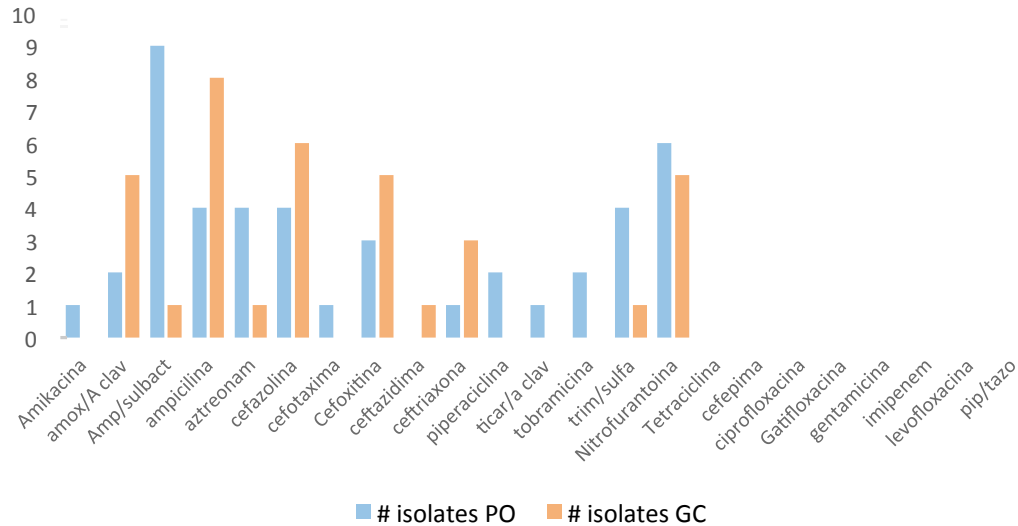
<b>Zone</b>	<b>Genera</b>	<b>specie</b>	<b># Isolates</b>
PO	<i>Acinetobacter</i>	<i>baumanni</i>	1
	<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>	1
	<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	1
	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	14
	<i>Edwarsella</i>	<i>tarda</i>	2
	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	2
		<i>oxytoca</i>	1
	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	1
	<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>	2
	<i>Yokenella</i>	<i>regensburgei</i>	1
	<b>9 genera</b>	<b>10 species</b>	<b>26 strains</b>
GC	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	1
	<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	1
	<i>Vibrio</i>	<i>alginolyticus</i>	1
	<i>Raoutella</i>	<i>planticola</i>	1
	<i>Proteus</i>	<i>vulgaris</i>	1
	<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i>	1
	<i>Hafnia</i>	<i>alvei</i>	3
		<b>7 genera</b>	<b>7 species</b>

#### *Gulf of California isolates*

From the Gulf of California, 59 strains were isolated; 9 of them showed ARB (15.25%). No  $\beta$ -Lactamases genes were identified in any of the strains. ARB detected included 7 different genera and 7 species. The frequencies of ARB were: *Hafnia alvei* (33.3%), *E. cloacae*, *Vibrio alginolyticus*, *Raoutella planticola*, *Proteus vulgaris* and *Pseudomonas putida*, all of them with 11.11%. The resistance for antibiotic was against to: ampicillin (8 strains), cefazolin (6 strains), cefoxitine, amoxicillin/clavulanic acid (5 strains), nitrofurantoin (5 strain), ceftriaxone (3 strains) and ampicillin/sulbactam, aztreonam, ceftazidime, trimethoprim/sulfamethoxazole (1 strain). In most cases, one strain showed resistance for more than one antibiotic.

The highest ABR isolates came from Magdalena Island in the PO, with 9 strains (Table 2). In the GC, Granito was the rookery with more ABR species detected; the rest of the GC rookeries showed only one resistant strain per site (Table 1).

## Distribution of antibiotic resistance in GC and PO



**Graphic 1.** Distribution of the number of bacterial isolates with resistance found in each antibiotic tested in the Pacific Ocean and Gulf of California.

### Molecular analyses

The analysis for antibiotic resistance genes  $bla_{SHV}$ ,  $bla_{TEM}$  and  $bla_{CTX-M}$  and  $bla_{KPC}$  from the PO antibiotic resistant strains, showed the presence of genetic sequences congruent to:  $bla_{TEM-116}$  in *E. coli* (ampicillin/sulbactam resistance);  $bla_{SHV-33}$  in *K. oxytoca* (ampicillin and piperacillin resistance), and  $bla_{SHV-33}$  and  $bla_{TEM-1}$  in *K. pneumoniae* resistant to ampicillin/sulbactam, ampicillin and piperacillin. The  $bla_{TEM-1}$  sequence was found in and *Y. regensburgei* with ampicillin/sulbactam and aztreonam resistance; and  $bla_{TEM-1}$  in *S. marcescens* with resistance to cefazolin and nitrofurantoin. A  $bla_{KPC-1}$  was detected in *E. tarda* with resistance to aztreonam and tobramycin. All strains with  $\beta$ -lactamases genes were isolated from Magdalena Island, except *S. marcescens* that was recovered from Asuncion Island. No CTXM or SHV-1 was detected. (Table 2)



**Table 2.** Relationship of Bacteria with resistance to antibiotics and presence of Betalactamasas type genes and their resistance profile in VITEK 2. R= resistant

Island	<i>Bacteria specie</i>	Betalactamasas type genes	Ampicillin	Amp/sulbact	Aztreonam	Cefazolin	Piperacillin	Tobramycin	Nitrofurantoin
Magdalena	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> <sub>TEM-116</sub>	-	R	-	-	-	-	-
	<i>E. tarda</i>	<i>bla</i> <sub>KPC-1</sub>	-	-	R	-	-	R	-
	<i>K. oxytoca</i>	<i>bla</i> <sub>SHV-33</sub>	R	-	-	-	R	-	-
	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> <sub>SHV-33</sub> <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	R	R	-	-	R	-	-
	<i>Y. regensburgi</i>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	-	R	-	-	-	-	-
Asunción	<i>S. marcescens</i>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	-	-	-	R	-	-	R

## Discussion

In this work were found differences for ABRs between PO and GC rookeries (Table 1). The bacterial isolates identified in our study are similar to those detected in pinnipeds in previous studies (Johnson *et al.*, 1998; Lockwood *et al.*, 2006; Bogomolni *et al.*, 2008, González-Fuentes *et al.*, 2010, Wallace *et al.*, 2013). Similar to previously report, we found that in PO samples, *E. coli* was a common bacterial isolate. For the GC samples, *H. alvei* was the most common bacteria isolated.

In the present study, we isolated *Yokenella regensburgi* from a PO sample. *Y. regensburgi* is considered a rarely encountered member of family *Enterobacteriaceae* that has been infrequently isolated from humans and is considered an opportunistic pathogen (Aziz, 2015). *Y. regensburgi* has been isolated from insects' tracts, well-water, and a number of anatomic sites in humans, including wounds, limbs, the upper respiratory tract, urine, feces, and knee fluid (Aziz, 2015). Biochemically, *Yokenella regensburgi* has a similar profile to *Hafnia alvei* (Hickman-Brenner *et al.*, 1985).

Azis (*op. cit.*) found *Y. regensburgi* in urine samples from patients with urine tract infections, this one was Nitrofurantoin, tetracycline and trimethoprim /sulfamethoxazole resistant; our results shows that *Y. regensburgi* strain was resistant to ampicillin/sulbactam.

Some of the bacterial species isolated in this study have the potential to cause serious clinical disease in humans and in other animal species. *E. coli* is a good example of this, as it can cause intestinal and genitourinary infections in wildlife, domestic animals and humans (Browenstein *et al.*, 2011). Similarly, *Klebsiella spp.* has been described as causing infections and death in sea lions pups in New Zealand (*Phocarctos hookeri*) (Castinel *et al.*, 2007) and *Proteus spp.* have been associated with skin lesions on other pinnipeds (González-Fuentes, *op. cit.*). *H. alvei* is a bacterium that has not been reported in pinnipeds, although it has been isolated in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) (Buck *et al.*, 2006). Infections with *H. alvei* have been reported in fish without clinical signs of disease (Padilla *et al.*, 2005), and there is a suggestion that this may be the source of infections for sea lions (González-Fuentes *op. cit.*). Wallace *et al.* (*op. cit.*) reported the presence of genera *Raoultella* in pinnipeds; they isolated *R. ornitholytica* from an ear sample. In the present study, we isolated *R. planticola* from the rectal swab samples. *R. planticola* has been also isolated in rivers and lakes in Switzerland, and in some cases, the bacterium showed resistance for few  $\beta$ -lactam antibiotics and carrying TEM and CTX-M-15 carbapenemases (Zurfluh *et al.*, 2013).

We found  $\beta$ -lactamases gene sequences in PO samples. The sequences *bla*-SHV-33, *bla*-SHV-1, *bla*-TEM-1, *bla*-TEM-116 and KPC-1 protein was detected in samples obtained from PO rookeries. The presence of these sequences confers resistance against  $\beta$ -lactam antibiotics and 1<sup>st</sup> generation cephalosporin and piperacillin. *bla*-SHV-33 has been detected in *K. pneumoniae* in others studies (Ogutu *et al.*, 2015). In our findings, we only found *bla*-SHV-33 gen in *K. oxytoca* that shows only ampicillin resistance and in *K. pneumoniae* that showed ampicillin, ampicillin/sulbactam and piperacillin resistance. In the same strain *bla*-TEM-1 was detected too. Previous studies found *K. pneumoniae* strains with the same plasmid combination (Oguto *et al.* 2015). Nevertheless, and despite this congruency, the strains isolated in the present study were not resistant to all cephalosporins and monobactamic tested, as previously reported by Oguto.

*bla*-KPC (no type defined) was detected in an *E. tarda* strain that was tobramycin and aztreonam resistant, but carbapenem sensitive. *E. tarda* is a common and important pathogen of marine fish; further it possesses similar virulence factors of many enteric pathogens (Leung *et al.*, 2012). KPC-1  $\beta$ -lactamases was initially reported from a *K. pneumoniae* strain recovered in North Carolina (Arnold *et al.*, 2011). Soon afterwards, KPC-type  $\beta$ -lactamases were reported in the northeastern United States among *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *S. enterica*, and *Enterobacter spp.* isolates (Arnold *et al.*, 2011). Recently, *K. pneumoniae* and *E. coli* isolates producing KPC-2 were reported in Medellin, Colombia, upstate New York and Israel (Wei *et al.*, 2007). Villegas *et al.*, (2006) isolated aztreonam resistant strains of *K. pneumoniae* (strain KPN633 clinical), but they didn't test for tobramycin, so there is evidence for aztreonam resistance when KPC-type plasmids are present. The presence of KPC proteins confers resistance against aztreonam and it has been associated to *tn4401* transposon presence (Curiao *et al.*, 2010).

Of clinical significance is the finding of a nitrofurantoin resistant *S. marcescens* strain. Nitrofurantoin is the first antibiotic prescribed for urogenital infections around the world. Even more, this antibiotic is use when treatment with the  $\beta$ -lactams fails (Sandegren *et al.*, 2008). The frequency of this resistance plasmid mediated is low and the mechanism is not very well understood, but some studies have demonstrated that strains with nitrofurantoin resistance have mutations on *nfs A* and *nfs B* genes, which are codified for non-sense oxygen nitroreductases (Sandegren *et al.*, 2008).

This study was performed to evaluate the presence of ABR and antibiotic resistance plasmids in wildlife, and the correlation between their presence and anthropogenic activities. With this in mind, it is important and necessary to considerer that the wide dissemination of genes frequently present in human pathogens in places without a high antibiotic usage load may indicate that, once those elements are present in gene-transfer platforms, the probability for their maintenance in natural ecosystems can be high (Pallecchi *et al.*, 2008). For this reason, antibiotic resistance genes are being considered as pollutants themselves (Martínez, 2009). Since antibiotic resistance genes are naturally located in the chromosomes of environmental bacteria (D'Acosta *et al.*, 2006; Wright, 2007; Martinez, 2009), only those elements that are present in gene-transfer

elements and thus can be transferred and enriched under antibiotic selection should be considered as “bona fide pollutants”.

It has been theorized that antibiotic resistance in bacterial strains in sea water and coastal waters, is coming from wastewater, farming and aquaculture (Brownstein *et al.* 2011). Allen *et al.* (2010) consider that it is more appropriate to consider the type of region where the isolates originate. Parameters such as the natural preservation state, livestock, and human density or the remoteness area are of utmost importance. Overall, the level of resistant bacteria observed in wild animals seems to correlate well with the degree of association with the human activity (Skurnik *et al.* 2006).

The two regions studied in the present study have different urban development; for example the rookeries found in the Pacific Ocean, on the western coast of the Baja California Peninsula, such as Magdalena and Santo Domingo, are close by to human settlements where there are agricultural and aquaculture activities, so they are more likely to be affected by human activities (Arellano-Peralta and Medrano González 2015).

On the other hand, the Gulf of California has been considered an almost pristine ecosystem, with few urban centers on this side of the Peninsula (Arellano-Peralta and Medrano González 2015). In these areas, the discharges are in septic tanks, agriculture and farm activities are minimal or non-existent, so the likelihood of human waste reaching the sea and coming into contact with sea lions is much lower than in the Pacific Ocean.

Our results show that the number of isolates and variety of species with antibiotic resistance was greater in the PO, almost three times more than in the Gulf of California.

Similar to previously reported in other studies with other wild animals species surveilled (Skurnik *et al.*, 2006; Kummer, 2009; Martínez, 2009; Maravic, 2012), we suggest that it is possible to assume that colonies of sea lions in the PO are more likely to be exposed to bacteria with resistance to antibiotics due to the anthropogenic activities.

The main objective of this study was to detect antibacterial resistant strains in sea lion rookeries in two locations with different levels of human activities, and use this as an indicator of anthropogenic contamination, and whether sea lions can be used as sentinels for marine ecosystems. This information is important for the reinforcement of conservation politics and the necessary monitoring for ecosystem preservation.

#### **Conflict of interest statement**

The authors declare that they have no competing interests. Authorization for Mexican government: SGPA/DGVS/2897/12.

#### **ACKNOWLEDGEMENT**

This study was supported by **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica** (PAPIIT) grants IN221314 and IN229111, UNAM. Rosalía Avalos received CONACyT (Mexican National Council for Science and Technology) Scholarship No. 201527. We thank the monitoring personal of the Área de Protección de Flora y Fauna Islas del Golfo de California, Baja California-CONANP (Carlos Godínez, Hugo Moreno Prado, Rito Vale Navarro, Eduardo Guillén Díaz, and Joel Prieto Ceseña), Africam Safari Zoo (MVZ. Osvaldo Rey Martinez Gonzalez), Exportadora de Sal SA de CV., and Liliana Suárez, Octavio López, Jesús Sotomayor and María Fernanda Ramírez, for their assistance in field work.

## References

1. Allen H, Donato J, Wang H. H., Cloud-Hansen, K.A: Davies, J and Handselman, J. (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat. Rev. Microbiol.*, 8, 251-259.
2. Arriaga-Cabrera L, Vázquez-Domínguez E, González-Cano J, Hernández S, Jiménez-Rosenberg R, Muñoz-López E, Aguilar-Sierra V. (1998). Regiones Marinas Prioritarias de México CONABIO, <http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/regionalizacion/doctos/marinas.html>.
3. Arriaga L, Espinoza JM, Aguilar C, Martínez E, Gómez L, Loa E. (2000). Regiones Prioritarias Terrestres de México CONABIO. <http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/regionalizacion/doctos/terrestres.html>
4. Arellano-Peralta V., Medrano-González L. (2015). Ecology, conservation and human history of marine mammals in the Gulf of California and Pacific coast of Baja California, Mexico. *Ocean & Coastal management*. 104, 90-105.
5. Arnold R, Thom K, Sharma S, Phillips M, Johnson K, Morgan DJ. (2011) Emergence of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-Producing bacteria. *South Med J*. 104(1), 40-45.
6. Azis ZS. (2015). Emerging of *Yokenella regensburgei* as Uropathogen: First report. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*. 5(7), 74-77.
7. Bogomolni AL, Gast RJ, Ellis JC, Dennet M, Pugliares KR, Lentell BJ, *et al.* (2008). Victims of vectors: a survey of marine vertebrate zoonoses from coastal waters of Northwest Atlantic. *Diseases of Aquatic Organisms*. 81: 13-38
8. Bossart GD. (2011). Marine Mammals as Sentinel Species for Oceans and Human Health. *Vet. Pathol*, 48 (3), 676-690.
9. Brownstein D, Millar MA, Oates SC, Byrne BA, Jang S, Murray MJ, Gill VA, Jessup DA. (2011). Antimicrobial susceptibility of bacterial isolates from sea otters (*Enhydra lutris*). *J Wildl Diseases*. 47(2): 278-292.
10. Buck J, Wells R, Rinehart H and Hansen L. (2006). Aerobic microorganisms associated with Free-ranging bottlenose dolphins in coastal Gulf of Mexico and Atlantic Ocean waters. *Journal of Wildlife Diseases*, 42, 536-544.
11. Cabello FC. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ Microbiol*. 8, 1137-1144.
12. Carrol D, Wang J; Fanning S., McMahon J. (2015). Antimicrobial resistance in wildlife: Implications for public health. *Zoonoses and Public health*.
13. Castinel A, Duignan PJ, Pomroy WE, Lopez-Villalobos N, Gibbs NJ, Chilvers BL & Wilkinson IS. (2007). Neonatal mortality in New Zealand sea lions (*Phorcactos hookeri*) at Sandy Bay, Ederby Island, Aukland Islands from 1998 to 2005. *Journal of Wildlife Diseases*, 43, 461-467.
14. Curiao T, Morosini M.I, Garbajosa P.R, Robustillo A, Baquero F, Coque T. M, & Cantón R. (2010). Emergence of bla kpc-3- Tn4401a associated with a pKPN3-/4-Like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 65(8), 1608-1614.
15. D'Acosta V.M, McGrann K.M, Hughes D.W & Wright G.D. (2006). Sampling the antibiotic resistome. *Science*. 311(5759), 374-377.
16. Dolejska M., Cizek A. and Literak I. (2007). High prevalence of antimicrobial resistant genes and integrons in *Escherichia coli* isolates form Black-headed gulls in the Czech Republic. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 11-19.

17. González-Fuentes M, Latif F, Fernandez F, Villanueva MP, Ulloa J, Fernandez H. (2010). Especies de la familia Enterobacteriaceae en heces de lobo marino común, *Otaria flavescens* establecido en el río Valdivia. *Revista de biología Marina y Oceanografía*, 45 (2), 331-334.
18. Hickman-Brenner FW, Huntley-Carter GP, Fannig GR, Brenner DJ and Farmer HJJ. (1985). *Koserella trabulsii*, a new genus and species of Enterobacteriaceae formerly known enteric group 45. *J. Clin. Microbiol.* 2, 39-42.
19. Jobbins SE and Alexander K. A. (2015). From whence they came antibiotic-resistant *Escherichia coli* in African wildlife. *J Wildl Diseases.* 51 (4), 811-820
20. Johnson SP, Nolan S., Gulland FM. (1998). Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from pinnipeds stranded in central northern California. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 29(3), 288-294.
21. Kummer K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment – a review – part I. *Chemosphere* 75, 417–434.
22. Lockwood SK, Chovan JL, Gaydos JK. (2006). Aerobic bacterial isolations from harbor seals (*Phoca vitulina*) stranded in Washington: 1992-2003. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 37(3), 281-291.
23. Leung KY, Siame BA., Tenkink BJ, Noort RJ & Mok YK. (2012). *Edwardsiella tarda*-Virulence mechanisms of an emerging gastroenteritis pathogen. *Microbes and Infection*, 14(1), 26-34.
24. Maravic A, Skocibusic M, Sprung M, Samanic I, Puizina J & Pavela-Vrancic M. (2012). Occurrence and antibiotic susceptibility profiles of *Burkholderia cepacia* complex in coastal marine environment. *International Journal of Environmental Health Research*, 22 (6), 531-542.
25. Martínez JL. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental pollution.* 157(4), 2893-2902.
26. McMannus PS, Stockwell VO, Sundin GW & Jones AL. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 443-465.
27. Ogutu JO, Zhang Q, Huang Y, Yan H, Su L, Gao B, Zhang W, Zhao J, Cai W, Li W, Zhao H, Chen Y, Song W, Chen X, Fu Y, & Zhang F. (2015). Development of a multiplex PCR system and its application in detection of bla SHV, blaTEM, bla CTX-M-1, bla CTX-M-9 and bla OXA-1 group genes in *Escherichia coli* strains. *The Journal of Antibiotics.* 68, 725-733.
28. Padilla D, Real F, Gómez V, Sierra E, Acosta B, Deniz S, Acosta F. (2005). Virulence factors and pathogenicity of *Hafnia alvei* for gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Journal of Fish Diseases.* 28(7), 411-417.
29. Pallechi L, Bartoloni A, Paradisi F, Rossolini GM. (2008). Antibiotic resistance in the absence of antimicrobial use: mechanism and implications. *Expert Rev. Anti Infect Ther.* 6(5), 725-732.
30. Paterson DL. (2003). Extended-Spectrum B-Lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread Prevalence of SHV- and CTX-M-Type B-Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47 (11), 3554-3560
31. Paterson DL. (2006). Resistance in Gram-Negative Bacteria: Enterobacteriaceae. *The American Journal of Medicine*, 119 (6), 1: S20-S28.
32. Sandegren L, Lindqvist, Kahlmeter G & Anderson D.I. (2008). Nitrofuranoine resistance mechanism and fitness cost in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 62, 495-503.

33. Smith DL, Harris AD, Johnson JA, Silbergeld EK, Morris Jr, JG. (2002). Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 6434-6439.
34. Singer RS, Finch R, Wegener HC, Bywater R, Walters J, Lipsitch M. (2003). Antibiotic resistance-the interplay between antibiotic use in animals and humans beings. *Lancet Infect. Dis.* 3, 47-51.
35. Skurnik D, Ruimy R, Andremont A., Amorin C., Rouquet P., Picard B., Denamur E. (2006). Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal fecal *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 1215-1219.
36. Stedt J., Bonnedahl J., Hernandez J., McMahon BJ., Hasan B., Olsen B., Drobni M., Waldenström J. (2014). Antibiotic Resistance patterns in *Escherichia coli* from gulls in nine European countries. *Infection Ecology and epidemiology*, 4, 215-265
37. Villegas M-V, Lolans K, Correa A, Suárez CJ, López JA, Vallejo M & Quinn JP. (2006). First Detection of the Plasmid-Mediated Class A Carbapenemase KPC-2 in Clinical Isolates from South America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 50(8), 2880-2882.
38. Wallace CC, Yund PO, Ford TE, Matassa KA, Bass AL. (2013). Increase in Antimicrobial Resistance in Bacteria Isolated from Stranded Marine Mammals of the Northwest Atlantic. *Ecohealth* 10, 201- 210.
39. Wei Z-Q, Du X-X, Yu Y-S, Shen P, Chen Y-G, & Li L-J. (2007). Plasmid-Mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* Isolated from China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 51(2), 763-765.
40. Wright GD. (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat. rev. Microbiol.* 5(3), 175-186.
41. Yin Q, Yue D, Peng Y, Liu Y, and Xiao L. (2013). Occurrence and Distribution of antibiotic-resistant bacteria and transfer of resistance genes in Lake Taihu. *Microbes Environ.*; 28,479-486
42. Zurfluh K, Hächler H, Nüesch-Inderbinen M & Stephan R. (2013). Characteristics of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase- and Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* Isolates from Rivers and Lakes in Switzerland. *Applied and Environmental Microbiology.* 79(9), 3021-3026.



## DISCUSIÓN GENERAL

Algunas poblaciones de mamíferos marinos se han recuperado después de las acciones de protección que se han realizado a lo largo de 20 años, después de su extensa explotación en el mundo (Arellano-Peralta & Medrano-González, 2015). Sin embargo, en la mayoría de ellos sus hábitats están en riesgo de destrucción, introducción de especies exóticas, entre ellas de patógenos emergentes, de los cuales se ha mencionado anteriormente que las enfermedades infecciosas son considerables para el riesgo de extinción (Arellano-Peralta & Medrano-González, 2015). Los mamíferos marinos son vulnerables a los disturbios antropogénicos que se realizan en el ecosistema marino, haciendo de estos animales una primera opción para los estudios del ecosistema en el concepto de especies centinelas (Arellano-Peralta & Medrano-González, 2015).

La población de lobos marinos en la región del Golfo de California ha disminuido en las últimas décadas como lo expresa Aurióles-Gamboa *et al.* (2010), este fenómeno es multifactorial, pero la presencia de agentes bacterianos infecciosos y contaminantes antropogénicos pueden jugar un papel importante en esta disminución poblacional; es por esto que este trabajo es de suma importancia debido a que provee información acerca de las enfermedades bacterianas emergentes y reemergentes que pueden tener un papel importante en las poblaciones de estos pinnípedos. Este trabajo es de los primeros en mostrar resultados en resistencia a antibióticos en estos animales, así como la detección de patógenos emergentes en mamíferos marinos por técnicas moleculares y serológicas, proveyendo además la comparación entre estas dos regiones importantes para los mamíferos marinos en México, el Golfo de California y el Norte del Océano Pacífico, donde convergen las colonias reproductivas de lobos marinos.

Con los estudios de detección de bacterias en mucosa anal y de heces de lobos marinos en ambas regiones se aislaron diferentes especies bacterianas antibiótico-resistentes, se observó que existe mayor diversidad bacteriana y cantidad de cepas resistentes en las loberas del Océano Pacífico y costa occidental de la Baja California con un total de 26 especies bacterianas distintas, mientras que en las loberas del Golfo de California la diversidad bacteriana y resistencia fue menor con sólo 9 especies bacterianas; aunado a ello se detectó la presencia de genes que codifican para enzimas que generan resistencia a los beta-lactámicos: *bla*<sub>SHV-33</sub>, *bla*<sub>SHV1</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub> y *bla*<sub>TEM-116</sub>, presentes en 6 cepas

bacterianas provenientes de lobos marinos de las loberas del Océano Pacífico (3 en Isla Magdalena y 1 isla Asunción). La enzima SHV-1  $\beta$ -lactamasas se describió desde 1972, su espectro de actividad es similar a TEM-1 con una mejor actividad para ampicilina, ha sido identificada en varias especies de enterobacterias y esta generalmente considerada como una enzima que se codifica en plásmido, su origen proviene del cromosoma de *Klebsiella pneumoniae* (Chaves *et al.*, 2001). Estos genes pueden conferir altos niveles de resistencia bajo presión de antibióticos, a partir de mutaciones puntuales como se ha observado a lo largo de la aparición de diversas variedades de BLEE's, y como se observó también con TEM-116, que en *Shigella flexneri* se ha reportado en aislados de pollos en China, esta variante confiere resistencia a cefalosporinas de tercera generación (Gong-Zheng *et al.*, 2008), así como en *E. coli* provenientes de perros en Polonia (Rzewuka *et al.*, 2015), esta enzima se ha reportado en varias especies de enterobacterias aisladas de humanos y es la primera vez que se reporta en lobos marinos en vida libre. Por otra parte, la enzima SHV-33 se ha reportado en *K. pneumoniae* de aislamientos en humanos en China, este también es el primer reporte en estos animales (Ogutu *et al.*, 2015).

Otros autores han mencionado al respecto, que la detección de genes de resistencia en bacterias de animales silvestres es una herramienta importante para estimar el grado de contaminación ambiental y que la resistencia más importante a nivel de salud pública es la adquirida a través de plásmidos que puedan contener genes que codifican para enzimas como las BLEE's, entre otros (Paterson, 2006). La detección de estos genes y los patrones de resistencia a antibióticos detectados en muestras de lobos marinos puede ser un indicador fiable de que existe mayor exposición a contaminación antropogénica; esta puntualización se apoya en la teoría del origen de la resistencia a antibióticos, y especialmente en las enterobacterias potencialmente patógenas, las cuales pueden provenir de varias fuentes incluyendo las aguas residuales, una intensa operación agrícola cerca de las áreas costeras, la producción acuícola, y el contacto con los desechos de los asentamientos humanos, siendo esto más frecuente a lo largo de las costas urbanizadas y cerca del desembocadura de los ríos al mar, como también se ha observado en otros mamíferos marinos en las costas del Pacífico Norte de EUA (Brownstein *et al.*, 2011), y en las costas de Florida, EUA con cepas de *E. coli* aisladas

de delfines (*Tursiops truncatus*), donde encontraron resistencia hacia a los antibióticos del grupo de  $\beta$ -lactámicos (Greig *et al.*, 2007), coincidente esta situación con la lobera de Magdalena, donde se hallaron los genes de resistencia, la cual esta cercana a centros urbanos importantes de la Península de Baja California.

Este estudio se realizó en dos zonas marinas separadas por la península de Baja California con cantidad y diversidad de actividades humanas diferentes. En la costa occidental de la Península de Baja California y las islas situadas frente a ella existen comunidades pesqueras importantes, varios campamentos pesqueros aledaños semipermanentes, turismo, mayor actividad industrial como la existencia de una planta sardinera, además de estar cerca de centros poblacionales relativamente importantes como las comunidades de Guerrero Negro, Vizcaíno, el Rosario e incluso de San Quintín, sitios en donde existen actividades, agrícolas, acuícolas y ganaderas, además de contar con centros hospitalarios de importancia para la región; centros que no existen en la costa Baja californiana en el lado del Golfo de California cercana a las loberas trabajadas; las actividades agrícolas y acuícolas son incipientes en esa zona.

Considerando esta información, al analizar la frecuencia y diversidad de cepas con resistencia a antibióticos en ambas zonas: en las loberas del Golfo de California se detectó una menor frecuencia de resistencia y diversidad bacteriana que en el Océano Pacífico. Esta diferencia es posiblemente multifactorial, pero un hecho importante a destacar es que las loberas en el Golfo de California se encuentran en una zona considerada prístina, en una región que no presenta centros urbanos importantes, ni una alta densidad humana. A diferencia de lo anterior, en isla Magdalena (Océano Pacífico), se obtuvo el mayor número de aislamientos con resistencia a antibióticos y la presencia de 5 de las 6 cepas con plásmidos de resistencia, estos datos aportan solidez a la premisa de que la presencia de cepas con resistencia a antibióticos puede relacionarse con la perturbación de esta área y la cercana influencia con los humanos y sus desechos (Schroeder *et al.*, 2004; Baquero *et al.*, 2008; Simoes *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2014).

Es importante puntualizar que en este estudio la resistencia encontrada fue principalmente hacia cefazolina y ampicilina; al respecto algunos géneros de la familia *Enterobacteriaceae* producen resistencia intrínseca en su cromosoma a los antibióticos tipo  $\beta$ -lactámicos, en géneros como *Enterobacter* spp., y *Citrobacter freundii*, se

producen pequeñas cantidades de la  $\beta$ -lactamasa tipo AmpC que confieren resistencia a ampicilina y amoxicilina y a la primera generación de cefalosporinas (Susic, 2004; Stock & Wiedeman, 2001), por lo que estos resultados pueden deberse a ésta situación, sin embargo al observar resistencia a ampicilina/sulbactam, cefalosporinas de 2da y 3era generación, piperacilina, y tobramicina, todo parece indicar que la resistencia observada está más relacionada a la presencia de BLEE's que a una situación intrínseca. Otra resistencia que se observó en bacterias en el océano pacifico fue la resistencia a nitrofurantoína la cual ha sido observada en varias especies bacterianas con muy poca frecuencia y son mediadas por genes en *E. coli* (Sandegren *et al.*, 2008; Cunha *et al.*, 2011).

La resistencia hacia a aztreonam, es importante debido a que se puede asociar al plásmido que contiene el gen para la metalo-beta lactamasa del tipo NDM-1, aztreonam es un antibiótico de última generación y encontrar bacterias resistentes en estos animales debe evaluarse más profundamente (Pereira *et al.*, 2011). La producción de BLEE's del tipo TEM-1, TEM-2, SHV-1, y OXA-1 proporcionan resistencia a ampicilina, ticarcilina, y la primera generación de cefalosporinas y piperacilina. Los plásmidos que median la expresión estos (BLEE) han ido en aumento (Susic, 2004), por lo que el análisis en vida libre es de suma importancia para conocer el impacto y distribución de estos genes. Estos resultados nos indican que más estudios de este tipo se requieren realizar para trazar el origen de esta resistencia, y evaluar el impacto hacia la salud pública, esta teoría la describe Carroll *et al.*, (2015) quien puntualiza “la ruta ambiental por la cual las bacterias con resistencia a antibióticos se transmiten entre animales y humanos debe de continuar siendo explorada”.

Por otra parte, los resultados encontrados hacia la detección del patógeno emergente en mamíferos marinos, *Brucella* spp., en una de las loberas de reproducción más importantes en el Golfo de California, la Isla San Esteban, es de suma importancia ya que confirma la presencia de anticuerpos contra este microorganismo en estos animales y es el primero en su tipo que detecta la bacteria por técnicas moleculares. Durante este trabajo se ha realizado la detección de este patógeno por medio de técnicas serológicas como Rosa de Bengala al 4 y al 8%, inmunodifusión radial y fluorescencia polarizada mostrando un 22.7% de animales (hembras y juveniles) positivos a la detección de este

patógeno (Avalos-Téllez *et al.*, 2014, asimismo se realizó PCR para la detección de la secuencia de inserción IS711, a partir de ADN de sangre de 22 lobos marinos (*Z. californianus*) provenientes de Isla San Esteban (Avalos-Téllez *et al.*, 2014). El estudio realizado en esta isla se centró en hembras y juveniles, este hallazgo es contrario a lo reportado por Nymo *et al.*, 2016, el cual muestra evidencia bacteriológica y serológica dependiente de la edad donde la probabilidad de encontrar animales seropositivos es menor en crías, mayor en juveniles y con la edad disminuye. Sin embargo, existe evidencia de la presencia de anticuerpos anti-*Brucella* spp., en crías de lobos marinos en las loberas de reproducción del GC en BC (Santos del Prado *et al.*, 2008) debido a esto también se colectaron muestras de crías para este trabajo en las 7 loberas de reproducción del Golfo de California en BC, y en 3 del O. Pacífico, desde el 2011 hasta la fecha donde también se han observado animales seropositivos en 5 islas del GC y 1 isla del OP (datos no publicados). Este patógeno ha sido detectado en abortos y partos prematuros de lobos marinos en las costas de EUA en el Océano Pacífico (Goldstein *et al.*, 2009), esto evidencia la posibilidad de que este patógeno pueda ocasionar abortos como lo realiza en otros mamíferos, y que pueda mermar las poblaciones de estos pinnípedos. Los resultados por PCR indican la presencia de ADN de *Brucella* spp., de origen terrestre, este hallazgo también es el primero que se reporta, y se cree que pueda provenir de ganado caprino que habitó las islas en décadas pasadas, que pudieron haberse adaptado a este nuevo nicho. En este estudio se evidenció que la detección de *Brucella* spp., por la técnica de fluorescencia polarizada presentó una mayor sensibilidad con respecto a la detección de *Brucella* por la técnica de Rosa de Bengala (Avalos-Téllez *et al.*, 2014). Actualmente no se cuenta con una técnica serológica comercial específica para la detección de *B. ceti* y *B. pinnipedialis*, por lo que esta prueba puede ser una buena herramienta para ello. La presencia de este patógeno en los lobos marinos de California debe continuar con un monitoreo en todas las clases etarias, para descartar la posibilidad de que este patógeno este ocasionando trastornos reproductivos y de fertilidad en la zona, además del posible riesgo zoonótico para las personas que entran en contacto con ellos.

Hasta el momento en México no existen casos reportados de Brucelosis en mamíferos marinos, este dato quizás puede deberse a que no haya sido detectado por diversos

factores, entre ellos a la falta de personal capacitado para la toma de muestras, la falta de información sobre este patógeno en las personas que atienden los varamientos, la falta de infraestructura en las áreas donde existen reportes de varamientos de forma regular de cetáceos, donde la mayoría de estos animales llegan en estado avanzado de descomposición a las playas por lo que la toma de muestras en óptimas condiciones es sumamente difícil, y por si mismo la dificultad que representa esta bacteria intracelular para el aislamiento.

Algunos cetáceos y pinnípedos realizan largas migraciones y pueden ser vectores en la transmisión de este patógeno, por lo que es un riesgo latente y es necesario reforzar el conocimiento sobre el manejo de estos ejemplares y la detección oportuna de esta bacteria con potencial zoonótico.

De igual forma, *Leptospira* spp., fue otro patógeno de importancia que fue detectado serológicamente y por técnicas moleculares en sangre de crías de lobo marino en el Golfo de California y el Océano Pacífico, esto obedece a la importancia de la vigilancia epidemiológica que esta bacteria ha obtenido desde los eventos de mortandad masiva en la década de 1970 en lobos marinos de vida libre frente a la costa de California y Oregón atribuidos a este patógeno, posteriormente se han observado brotes esporádicos a intervalos regulares (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2003), a pesar de que se ha realizado seguimiento y estudios continuos para determinar la fuente de infección y el mecanismo de transmisión de este patógeno, estos continúan siendo desconocidos (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2003). A la fecha no se tiene registro de eventos masivos de mortandad en el Golfo de California, sin embargo, hallazgos de serología e histopatológicos evidencian su presencia en loberas reproductivas de esta zona, sin embargo no se ha logrado el aislamiento microbiológico de este patógeno (Godínez *et al.*, 1999). En este estudio los resultados muestran que existe una mayor seroprevalencia para especies patógenas de *Leptospira* spp., en las muestras provenientes del Golfo de California que en aquellas provenientes del Océano Pacífico (Avalos-Tellez *et al.*, 2016). Estudios previos como Vedros *et al.* (1971), Godínez *et al.*, (1999) y Acevedo-Whitehouse *et al.* (2003), han evidenciado la presencia de anticuerpos contra serovariedades de *Leptospira* spp., con diferencias en el mosaico de seroprevalencia en cada estudio, incluso cuando hay loberas comunes entre los estudios citados. Con respecto a la situación de este estudio es interesante señalar que se observa un cambio

en los resultados de seroprevalencia para la serovariedad *Icterohaemorrhagiae* en las loberas del GC con respecto al estudio realizado por Godínez *et al.* (1999), él encontró títulos bajos para la serovariedad citada, mientras que este estudio muestra títulos altos; por otro lado en este estudio se encontraron reacciones positivas al serovar Celledoni, mientras que en la obra citada no hubo reacciones positivas a este serovar.

Es necesario remarcar que el hecho de haber encontrado perfiles de seroprevalencia diferentes entre las muestras del Océano Pacífico y las del Golfo de California, y que estos perfiles muestren una mayor gama de serovariedades en el Golfo de California, abre la discusión sobre el origen de las mismas, considerando que *Leptospira* spp. esta asociada también a actividades humanas, contaminación y presencia de animales de compañía y ganadería (Vinetz *et al.*, 2005), sería de esperar que en la misma zona donde hubo alta incidencia de cepas bacterianas resistentes a antibióticos y que se ha correlacionado con precisamente una mayor contaminación por actividades antropogénicas, *Leptospira* spp., tuviera también alta incidencia y por lo tanto la seroprevalencia detectada sería alta. Los datos obtenidos no muestran esto, la cantidad de serovariedades positivas, títulos altos de reacción en el MAT, y aumento de títulos en serovariedades detectados como bajos (*L. Icterohaemorrhagiae*) en los lobos marinos del Golfo de California, podría ser indicativo de que este patógeno presenta un ciclo de mantenimiento en vida silvestre, mantenido entre los lobos marinos de la región, por supuesto que esta hipótesis tiene que ser comprobada y además debe de tener otros factores ambientales intrínsecos. Por ejemplo, la temperatura ambiental es también diferente entre ambas zonas, siendo mayor en el Golfo de California, esto puede favorecer la viabilidad de las espiroquetas en las deyecciones de lobos marinos propiciando el contagio cruzado en la misma lobera, puntualizando que este contagio no ocurre por heces sino se debe a la exposición de heridas a este patógeno, pero que al estar presentes en las deyecciones de forma viable se favorece el contagio de heridas. Además es importante considerar el impacto epidemiológico y zoonótico que pueden provocar eventos relacionados al cambio climático global, que según diversos estudios podría estar correlacionado con el incremento en eventos epidémicos por esta enfermedad; así como el incremento de frecuencia e intensidad de lluvias e inundaciones (Campanella *et al.*, 1999; Barcellos *et al.*, 2001; Gaynor *et al.*, 2007; Liverpool *et al.*, 2008; Scheneider *et al.*, 2012; Weinberg *et al.*, 2014).

Debido a que la situación poblacional de los lobos marinos en México, han mostrado una baja en la población total cerca del 20% en las dos últimas 2 décadas (Auriolles-Gamboa *et al.*, 2010; French *et al.*, 2011), la evaluación continua de patógenos emergentes y re-emergentes que puedan tener un impacto negativo en la reproducción y salud de estos animales es de suma importancia para el manejo y conservación de estas especies como es el caso de *Brucella* spp., y *Leptospira*, así como su interacción en los cambios ambientales, debido a que cambios en el ambiente que generen estrés en el animal son severos o persistentes y el animal no llega a adaptarse a ellos, se genera un desequilibrio perjudicial en el animal cuyas consecuencias pueden manifestarse a nivel inmune, metabólico y reproductivo (Casedevall & Pirofski, 2001). Si el resultado culmina en una alteración en el funcionamiento del sistema inmune, entonces el animal es vulnerable a enfermedades infecciosas y puede desarrollar una condición patológica. Los mamíferos marinos tanto en cautiverio como en vida libre están sujetos a una serie de eventos que pueden ocasionarles estrés, como por ejemplo: el ambiente social, la predación, la competencia por el alimento, el parasitismo, la captura, la transportación, el aislamiento, la sobrepoblación, instalaciones inadecuadas y ruidos excesivos. La interacción del hospedero y de los microorganismos es una línea frágil que puede fluctuarse provocando la muerte del hospedero, la eliminación del microorganismo, estados de latencia de este mismo, la colonización o al comensalismo, en estas últimas situaciones se puede revertir al desarrollo de la enfermedad. De tal manera la virulencia es una variable dependiente a la susceptibilidad del hospedero, al contexto y naturaleza de la interacción hospedero- microorganismo (Casedevall & Pirofski, 2001).



## CONCLUSIONES

1. Este estudio evidenció la presencia de bacterias Gram negativas resistentes a antibióticos en muestras de lobos marinos en vida libre, así como la presencia de genes de resistencia a antibióticos en muestras de lobos marinos en loberas del O. Pacífico mexicano. Esta detección de resistencia es el primer trabajo realizado en México en lobos marinos en vida libre y puede considerarse una buena herramienta para considerar el impacto antropogénico en el ecosistema.
2. Se determinó la presencia de *Brucella* spp., mediante pruebas serológicas y por PCR de en muestras de lobos marinos en Isla San Esteban en el GC. Es el primer trabajo que realiza la detección molecular de este patógeno.
3. Este estudio demuestra que en el Golfo de California existe una mayor diversidad de serovariedades patógenas de *Leptospira* spp. con respecto al O. Pacífico; y que la detección de *Leptospira* spp. en sangre a partir de pruebas moleculares y la diferenciación de leptospiros patógenas de saprofitas puede ayudar a complementar el diagnóstico de este patógeno en estos animales.
4. El conjunto de estudios realizados, detección de cepas bacterianas con resistencia a antibióticos, detección de genes de resistencia, detección de *Brucella* spp., y *Leptospira* spp., en dos zonas de alta importancia ecológica, de conservación y económica pero con grado diferente de uso e impacto antropogénico realizados de forma integral en esta investigación muestra claras diferencias entre ambas zonas, congruente con la diferencia de uso antropogénico. Un aumento en la frecuencia y distribución de estos, puede relacionarse a cambios en el medio ambiente.

## REFERENCIAS BIBLOGRAFICAS

1. Acevedo-Whitehouse K., de la Cueva H., Gulland F.M., Auriolos-Gamboa D., Arellano-Carbajal F., Suarez-Güemes F. (2003). Evidence of *Leptospira interrogans* infection in California sea lion pups from the Gulf of California. *J. Wildl. Diss.*, 39(1), 145-151.
2. Acha PN & Szyfries B. (2000). Zoonosis y enfermedades transmisibles al hombre y los animales (Publicación científica y técnica No. 580). 3ed. Organización Panamericana de la salud. Organización Mundial de la Salud. Washington DC, EUA.
3. Arellano-Peralta V., Medrano-González L. (2015). Ecology, conservation and human history of marine mammals in the Gulf of California and Pacific coast of Baja California, Mexico. *Ocean & Coastal management*. 104, 90-105.
4. Auriolos-Gamboa D. Godínez-Reyes C, Hernández-Camacho C., Santos del Prado Gasca K. (2011). Red de monitoreo, investigación y conservación de los pinnípedos de México. Taller de análisis del estado de la población de lobo marino de California *Zalophus californianus* en México. CICIMAR, CONANP, INE. La Paz, BCS, México. 20.
5. Auriolos-Gamboa, D y F. Trillmich. (2011). *Zalophus californianus*. IUCN Red list of Threatened species. Version 11. [en línea]. <http://www.iucnredlist.org/details/41666/0>.
6. Avalos-Téllez R., Ramírez-Pfeiffer C., Hernández Castro R., Díaz-Aparicio E., Sanchez-Dominguez C., Zavala-Norzagaray A., Arellano-Reynoso B., Suárez-Güemes F., Aguirre-Alonso A., Auriolos-Gamboa D. (2014). Infection of California sea lions (*Zalophus californianus*) with terrestrial *Brucella* spp. *Vet. J*; 202 (1), 198-200.
7. Avalos-Téllez R., Carrillo-Casas EM., Atilano-López D., Godínez-Reyes CR., Díaz-Aparicio E., Ramirez Delgado D., Ramírez-Echenique MF., Leyva-Leyva M., SuzanG., Suárez-Güemes F. (2016). Pathogenic *Leptospira* serovars in free-living sea lions in the Gulf of California and along the Baja California coast of México. 52 (2), 199-208.
8. Baquero, F., J.L. Martinez, y R. Canton. (2008): Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, 260–265.
9. Barcellos, C.; Chagastelles Sabroza, P. (2001). The place behind the case: Leptospirosis risks and associated environmental conditions in a flood-related outbreak in Rio de Janeiro. *Cad. Saúde Pública, Suppl.* 17, 59–67.
10. Bossart GD. (2011). Marine Mammals as Sentinel Species for Oceans and Human Health. *Vet Pathol.* 48(3), 676-690.
11. Bourg G, O'Callaghan D, Boschioli ML. (2007). The genomic structure of *Brucella* strains isolated from marine mammals gives clues to evolutionary history within the genus. *Vet Microbiol.* 125 (3-4), 375-380.
12. Brownstein D, Millar MA, Oates SC, Byrne BA, Jang S, Murray MJ, Gill VA, Jessup DA. (2011). Antimicrobial susceptibility of bacterial isolates from sea otters (*Enhydra lutris*). *J Wildl Diseases.* 47(2), 278-292.
13. Campanella, N. 1999. Infectious diseases and natural disasters: The effects of Hurricane Mitch over Villanueva municipal area, Nicaragua. *Public Health Rev.* 27, 311–319.

14. Carrol D, Wang J; Fanning S., McMahon J. (2015). Antimicrobial resistance in wildlife: Implications for public health. *Zoonoses and Public health*.
15. Casadevall A, Pirofski L. (2001). Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *JID*. 184(3), 337-344.
16. Chavez J., Ladona M., Segura C., Coira A., Reig R., Ampurdanés C. (2001). SHV-1  $\beta$ -Lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*. 45(10), 2856-2861.
17. Cloeckaert A, Grayon M., Grepinet O. (2000). An IS711 Element Downstream of the bp26 Gene Is a Specific Marker of *Brucella* spp. isolated from Marine Mammals. *Clin Diagn Lab Immunol*. 7 (5), 835-839.
18. Cloeckaert A, Bernardet N, Koylass MS, Whatmore AM, Zygmunt. (2011). Novel IS711 chromosomal location useful for the identification of the marine mammal *Brucella* genotype ST27 with zoonotic infection. *J Clin Microbiol*. 49(11), 3954-3959.
19. Colagross-Schouten A. M., J. A. K. Mazet, F. M. D Gulland, M. A. Miller and S. Hietala. (2002). Diagnosis and seroprevalence of leptospirosis in California sea lions from coastal California. *Journal of Wildlife Diseases*. 38, 7–17.
20. Cunha B.A, Schoch P.E., Hage J.R. (2011). Nitrofurantoin: Preferred Empiric Therapy for Community-Acquired Lower Urinary Tract Infections. *Mayo Clin Proc*. 86(12), 1243-1248.
21. Dawson EC, Stubberfield EJ, Perrett LL, King CA, Whatmore MA, Bashiruddin BJ, Snack AJ, MacMillan AP. (2008). Phenotypic and molecular characterization of *Brucella* isolates from marine mammals. *BMC Microbiol*. 17, 224. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/8/224>
22. Diestra VK. (2010). Caracterización del entorno genético *bla*<sub>BLEE</sub> y plásmidos asociados en cepas circulantes de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en España. Tesis Doctoral. Univesitat Autònoma de Barcelona. 23-34.
23. Dolejska M., Cizek A. and Literak I. (2007). High prevalence of antimicrobial resistant genes and integrones in *Escherichia coli* isolates form Black-headed gulls in the Czech republic. *Journal of Applied Microbiology*. 103(1), 11-19
24. Foster G, MacMillan AP, Godfroid J, Howie F, Ross HM, Cloeckaert A, Reid RJ, Brew S, Patterson IAP. (2002). A review of *Brucella* sp. infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. *Vet Microbiol*. 90(1-4), 563–580.
25. Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jaques I, Cloeckaert A. (2007). *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred host. *Int J Syst Evol Microbiol*. 57(Pt 11), 2688-2693.
26. Folkens P., Reeves Randall R., Stewart B., Clapham P J., Powell JA. (2002) En Knopf A. (Ed). *Guide to marine mammals of the world*. 90-93. National Audubon Society.
27. French S.S., Gonzalez-Suárez M., Young J.k., Durham S., Gerber LR. (2011). Human Disturbance influence reproductive success and Grow rate in California sea Lions (*Zalophus californianus*). *PLOS ONE* 6(3): e17686. doi: 10.1371/journal.pone.0017686

28. Gaynor, K., Katz, A.R.; Park, S.Y., Nakata, M., Clark, T.A., Effler, P.V. (2007). Leptospirosis on Oahu: An outbreak associated with flooding of a university campus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 76(5), 882–885.
29. Goldstein T., Zabka Ts., DeLong RL., Wheeler EA., Ylitalo G., Bargu S., Silver M., Leighfield T., Van Doloh F., Langlois., Sidor I., Dunn JL., Gulland FMD. (2009). The role of domoic acid in abortion and premature parturition of California sea lions (*Zalophus californianus*) on San Miguel island, California. *J Wildl Dis.* 45 (1), 91-108.
30. Godfroid J., Cloeckert A., Liautard J. P., Kohler S., Fretin D., Walravens K., Garin BB, Letesson JJ. (2005). From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of marine mammals reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet Res.* 36, 313-326.
31. Godínez C. R., Zelaya de Romillo B, Aurióles-Gamboa D, Verdugo-Rodríguez A, Rodríguez-Reyes EA, De la Peña-Moctezuma A. (1999). Antibodies against *Leptospira interrogans* in California sea lion pups from Gulf of California. *J Wildl Dis.* 35(1), 108-111.
32. Godínez RC, Santos PDK, Zepeda LH, Aguirre A, Anderson AW, Páras GA, Velarde E, y Zavala GA. (2006). Monitoreo de poblaciones y condición de salud de aves marinas y lobos marinos en islas del Norte del Golfo de California, México. *Gaceta ecológica, Instituto Nacional de Ecología.* 81, 31-45.
33. Gong-Zheng Hu, Hong-Yin Chen., Hong-Bin si, Li-Xi Deng, Zhan-Yong Wei, Li Yuan, Xiu-Hua Kuang. (2008). Phenotypic and molecular characterization of TEM-116 extended-spectrum B-lactamase produced by *Shigella flexneri* clinical isolated from chickens. *FEM Microbiol Lett.* 279(2), 162-166.
34. Greig W.T., Bemiss A.J., Lyon R.B., Bossart D.G., Fair A.P. (2007). Prevalence and diversity of antibiotic resistant *Escherichia coli* in Bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the Indian River Lagoon, Florida, and Charleston Harbor Area, South Carolina. *Aquatic Mammals.* 33(2), 185-194.
35. Hernández M. G., Manire C.A., González B.R., Barquero C.E., Guzman V.C., Staggs L., Thompson, Chaves O.E., Moreno E. (2009). Serological diagnosis of *Brucella* infections in odontocetes. *Clinical and vaccine Immunology.* 16 (6), 906-915.
36. Hernández-Camacho C., Aurióles-Gamboa D., Laake J., Gerber LR. (2008). Survival rates of the California sea lions, *Zalophus californianus*, in Mexico. *Journal of Mammalogy.* 89 (4), 1059-1059.
37. King J. E (Ed). (1983). *Seals of the World.* United Kingdom. Oxford University Press. 240 p.
38. Jobbins S.E., Alexander K. A. (2015). From whence they came antibiotic-resistant *Escherichia coli* in African wildlife. *J Wildl Diseases,* 51 (4), 811-820.
39. Ley General de Vida Silvestre. (2010). *Diario Oficial de la Federación.* México, Congreso General de los Estados Unidos Mexicanos. 2010.
40. Liverpool, J.; Francis, S.; Liverpool, C.E.; Dean, G.T.; Mendez, D.D. (2008). Leptospirosis: Case reports of an outbreak in Guyana. *Am. Trop. Med. Parasitol.,* 102(3), 239–245.
41. López DO. (2005). Determinación de la presencia de *Brucella* spp. en lobos marinos del Golfo de California (*Zalophus californianus*). Tesis UNAM, México, D.F.

42. Lloyd-Smith J.O., Grieg D.J., Hietala S., Ghneim G.S., Palmer L., St Leger J., Grenfell B.T., Gulland F.M.D. (2007). Cyclical changes in seroprevalence of leptospirosis in California sea lions: endemic and epidemic disease in one host species? *BMC Infectious Diseases*, 7,125. <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/7/125>
43. MacDonald WL., Jamaludin R., Mackereth G., Hansen M., Short P., Taylor T., Swingler J., Dawson CE., Whatmore AM., Stubberfield., Perrett LL., Simmons G. (2006). Characterization of a *Brucella* sp. strain as a marine-mammal type despite isolation from a patient with spinal osteomyelitis in New Zealand. *J Clin Microbiol.* 44 (12), 4363-4370.
44. Mancia A, Ryan JC, Chapman RW, Wu Q, Warr GW, Gulland FM, Van Dolah FM. 2012. Health status, infection and disease in California sea lions (*Zalophus californianus*) studied using a canine microarray platform and machine learning approaches. *Dev Comp Immunol.* 36 (4), 629–637.
45. Martínez JL. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental pollution*, 157(11), 2893-2902.
46. Martínez J.L., Baquero F. (2002). Interaction among strategies associated with bacterial infection: Pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin Microbiol rev.* 5(4), 647.
47. Mena B.R., Alfonseca S.E., Montañó H.J., Acevedo-Whitehouse K., Aurióles D. (2001). Presencia de anticuerpos contra *Brucella* en lobos marinos del Golfo de California, México. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.
48. Moore M.J., Gast R.J., Bogomolni A.L. (2008). Marine vertebrate zoonoses: an overview of the DAO Special Issue. *Dis Aquat Org.* 81(1), 1-3.
49. Moreno E., Cloeckert A., Moriyón I. (2002). *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet Microbiol.* 90 (1-4), 209-227.
50. NOM-059-SEMARNAT-2010. Norma Oficial Mexicana 059. (2010). Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. México, Jueves 30 de diciembre de 2010.
51. NOM-135-SEMARNAT-2004. (2004). Para la regulación de la captura para investigación, transporte, exhibición, manejo y manutención de mamíferos marinos en cautiverio. Diario Oficial de la Federación. México, 27 DE AGOSTO DE 2004.
52. NOM-EM-136-ECOL-2002. (2002). Norma oficial mexicana de emergencia, protección ambiental- Especificaciones para la conservación de mamíferos marinos en cautiverio. Específica las regulaciones existentes para los mamíferos marinos en cautiverio. Diario Oficial de la Federación. México, 1 de abril 2002.
53. NOM-024-SEMARNAT-1993. (1993). Por la que se establecen medidas para la protección de las especies de totoaba y vaquita en aguas de jurisdicción Federal del Golfo de California. Diario Oficial de la Federación. México, 29 de junio 1994.
54. Nymo I.H., Arias M.A., Pardo J., Álvarez M.P., Alcaraz A., Godfroid J., Jimenez de Bagúes M.P. (2016). Marine *Brucella* reference strains are attenuated in a BALB/c mouse model. *PLOS ONE* 11(3): e0150432. doi: 10.1371/journal.pone.0150432

55. Nielsen O., Nielsen K., Braun R., Nelly L. (2005). A comparison of four serological assays in screening for *Brucella* exposure in Hawaiian Monk seals. *J Wildlif Diseas.* 41(1), 126-133.
56. Ogutu J.O., Zhang Q., Huang Y., Yan H., Su L., Gao B., Zhang W., Zhao J., Cai W., Li W., Chen Y., Song W., Chen X., Fu Y., Zhang F. (2015). Development of multiplex PCR system and its application in detection of blaSHV, blaTEM, blaCTX-M\_1, blaCTX-M-9 and blaOXA-1 group genes in clinical *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains. *The journal of antibiotics.* 68, 725-733.
57. OIE (World Organization for Animal Health). (2014). Leptospirosis. Cap. 2.1.9. *En Terrestrial Manual 2014.* París Fr.
58. Pereira E.C., Shaw K., Vagnone P. M., Harper J., Lynfield R. (2011). A review of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Minn Med.* 94(10), 44-48.
59. Paterson DL. (2006). Resistance in Gram-Negative Bacteria: Enterobacteriaceae. *The American Journal of Medicine.* 119, 6 (Suppl 1), S20-S28.
60. Roe W.D., Rogers L.E., Gartrell B.D., Chilvers B.L., Duignan P.J. (2010). Serologic evaluation of New Zealand sea lions for exposure to *Brucella* and *Leptospira* spp.; *J Wildlif Diseas.* 46 (4), 1295-1299.
61. Rzewuska M., I. Stefanska, M. Kizerwetter- Swida, D. Chrobak-Chmiel, P. Szczygielska, M. Lésniak and Marian Binek. (2015). Characterization of extended- Spectrum- $\beta$ - Lactamases Produced by *Escherichia coli* Strains Isolated from Dogs in Poland. *Polish Journal of Microbiology.* 64(3), 285-288.
62. Salyers AA y Whitt DD. (1994). *Bacterial Pathogenesis. A molecular approach.* ASM Press Washington DC. Chapter 8.
63. Sandegren L., Lindqvist A., Kahlmeter G., Andersson D.I. (2008). Nitrofurantoin resistance mechanism and fitness cost in *Escherichia coli*. *J Antimicrobial Chemoterapy.* [on line]. 62, 495-503. doi:10.1093/jac/dkn222
64. Santos del Prado Gasca K., Godínez Reyes, C., Zepeda López, H., Anderson, D. W., Parás González, A. y Zavala-González, A. (2008). Monitoreo de poblaciones y condición de salud de aves marinas y lobos marinos en islas del norte del Golfo de California, México. *Ira Bienal de la Agenda de Investigación del Programa de Ordenamiento Ecológico Marino del Golfo de California.* Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología. La Paz, BCS.
65. Schroeder, C.M., D.G. White, and J. Meng, (2004). Retail meat and poultry as a reservoir of antimicrobial-resistant *Escherichia coli*. *Food Microbiol.* 21(3), 249–255.
66. Schneider M.C., Tirado M.C., Reredy S., Dugas R., Borda M.I., Alvarez Peralta E., Aldighieri S., Cosivi O. (2012). Natural disasters and communicable diseases in the Americas: Contribution of Veterinary Public Health. *Vet. Ital.* 48 (2), 193–218.
67. Simoes R.R., L. Poirel P.M. Da Costa, and Nordmann P. (2010). Seagulls and beaches as reservoirs for multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 16 (1), 110–112.
68. Skurnik D., Ruimy R., Andremont A., Amorin C., Rouquet P., Picard B., Denamur E. (2006). Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 57(6), 1215-1219.

69. Smith, S., J. Wang, S. Fanning, and B.J. McMahon, (2014). Antimicrobial resistant bacteria in wild mammals and birds: a coincidence or cause for concern? *Ir. Vet. J.* 67(1), 8. doi:10.1186/2046-0481-67-8
70. Stedt J., Bonnedahl J., Hernandez J., McMahon B.J., Hasan B., Olsen B., Drobni M., Waldenström J. (2014). Antibiotic Resistance patterns in *Escherichia coli* from gulls in nine European countries. *Infection Ecology and epidemiology* 4, 21565. <http://dx.doi.org/10.3402/iee.v4.21565>
71. Stock I., Wiedemann B. (2001). Natural antibiotic susceptibility of *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. Planticola*, *K. ornithinolytica* and *K. terrigena* strains. *J Med Microbiol.* 50(5), 396-406.
72. Susic E. (2004). Mechanisms of resistance in Enterobacteriaceae towards beta-lactamase antibiotics. *Acta Med Croatica.* 58 (4), 307-12.
73. Van Bresse MF, Raga JA, Di Guardo G, Jepson PD, Duignan PJ, Siebert U, Barrett T, de Oliveira Santos M, Moreno IB, Siciliano S, Aguilar A, Van Waerebeek K. (2009). Emerging infectious diseases in cetaceans worldwide and the possible role of environmental stressors. *Dis Aquat Org.*, 12(86), 143–157.
74. Vedros N. A., Smith A.W., Schonewald J, Migaki G., & Hubbard R. C. (1971). Leptospirosis epizootic among California sea lions. *Science* 172, 1250-1251
75. Vinetz J.M., B.A Wilcox, A. Aguirre, L.X. Gollin, A.R. Katz, R.S. Fujioka, K. Maly, P. Horwitz, and H. Chang. (2005). Beyond Disciplinary Boundaries: Leptospirosis as a Model of Incorporating Transdisciplinary Approaches to Understand Infectious Disease Emergence. *EcoHealth.* 22(4), 91-306.
76. Weinberg D, Baroux N, Grangeon J-P, Ko A I, & Cyrille Goarant. (2014). El Niño Southern Oscillation and Leptospirosis Outbreaks in New Caledonia. *Negl Trop Dis* 8(4) PLoS. e2798. doi: 10.1371/journal.pntd.0002798
77. Yin Q., Yue D., Peng Y., Liu Y., and Xiao L. (2013). Occurrence and distribution of antibiotic-resistant bacteria and transfer of resistance genes in lake Taihu. *Microbes Environ.* 28(4),479-486
78. Zuerner R.L., and Bolin C.A. (1997). Differentiation of *Leptospira interrogans* isolates by IS1500 hybridization and PCR assays. *J Clin Microbiol.* 35(10), 2612-2617.