



# UNIVERSIDAD DEL MAR

---

CAMPUS PUERTO ESCONDIDO

## EVALUACIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL PARA LA CAMPYLOBACTERIOSIS INDUCIDA POR *Campylobacter fetus* SUBSP *fetus*

TESIS

PRESENTADA POR

SERGIO AYALA DÍAZ

PARA OBTENER EL TITULO DE LICENCIADO EN ZOOTECNIA

DIRECTOR

Dr. JAIME ARROYO LEDEZMA

Puerto Escondido, Oaxaca, Enero de 2014



## UNIVERSIDAD DEL MAR CAMPUS PUERTO ESCONDIDO

Puerto Escondido, Oaxaca, Enero de 2014

### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

Después de realizar una revisión detallada de la tesis “**EVALUACIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL PARA CAMPYLOBACTERIOSIS INDUCIDA POR *Campylobacter fetus* SUBSP *fetus***”, presentada por el pasante de la LICENCIATURA EN ZOOTECNIA, **SERGIO AYALA DÍAZ**, se considera que cumple con los requisitos y calidad para ser defendida en el examen profesional.

**COMISIÓN REVISORA**

Dr. Jaime Arroyo Ledezma  
Universidad del Mar  
Director de Tesis

Dr. Daniel Martínez Gómez  
Universidad Autónoma  
Metropolitana, Unidad Xochimilco  
Revisor

M. C. Julieta Kariha Cruz Vázquez  
Universidad del Mar  
Revisor

M.C. José Ramírez Lezama  
Universidad Nacional Autónoma  
de México  
Revisor

M.C. Mónica Alicia Calderón Oropeza  
Universidad del Mar  
Revisor

## **DEDICATORIA**

A mis padres, Teresa Díaz y Andres Ayala, por estar a mi lado y motivarme a seguir siempre adelante. A mis hermanos y sobrinos que hacen de mi vida una aventura llena de felicidad. Los amo son mi razón de ser.

*Once we have a firm practice of compassion our state of mind becomes stronger which leads to inner peace, giving rise to self-confidence, which reduces fear. This makes for constructive members of the community. Self-centredness on the other hand leads to distance, suspicion, mistrust and loneliness, with unhappiness as the result (Dalai Lama 2013).*

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad del Mar, campus Puerto Escondido, por las facilidades para llevar a cabo este proyecto.

Al departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de México y al Laboratorio de Microbiología Agropecuaria de la Universidad Autónoma Metropolitana por su colaboración y apoyo para la realización de este proyecto educativo y de investigación científica.

Un agradecimiento especial a los doctores Jaime Arroyo, José Ramírez y Daniel Martínez, quienes me asesoraron y de los cuales he aprendido mucho.

A mis amigos y compañeros, Aldo A. Salazar, Ulises Cortes y Diego A. Ramos, por sus consejos y apoyo incondicional.

A la MC Julieta K. Cruz, gracias por compartir sus conocimientos y guiarme en el presente trabajo.

A la MC Mónica A Calderón, por sus consejos y apoyo al presente trabajo.

A la MC Angélica Ruiz, MMVZ Natalia Villafuerte y a la MVZ Blanca Valladares por su amistad, consejos y por su apoyo, muchas gracias.

A F. Daniel Rodríguez, gracias por ser mi mejor amigo y compañero, por todo el apoyo en esta tesis y en mi vida.

A mis amigos Félix y Freddy, gracias amigos por siempre estar a mi lado.

A todas las personas que participaron e hicieron posible este proyecto, muchas gracias por su apoyo y enseñanza.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	PÁGINA
RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Características del género <i>Campylobacter</i> .....	3
2.2 Morfología bacteriana .....	4
2.3 Factores de virulencia.....	4
2.4 Patogénesis y patogenia .....	5
2.5 Diagnóstico de laboratorio .....	8
2.6 Cultivo bacteriano.....	9
2.7 Diagnóstico inmunológico .....	10
2.8 Diagnóstico molecular.....	11
2.9 Tratamiento .....	13
2.10 Modelos experimentales.....	13
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
4 JUSTIFICACIÓN.....	16
5 OBJETIVOS .....	18
5.1 Objetivo general.....	18
5.2 Objetivos específicos .....	18
6 HIPÓTESIS .....	18
7 MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
7.1 Animales experimentales .....	19
7.2 Diseño experimental .....	20
7.3 Inoculación experimental.....	22
7.4 Eutanasia .....	22
7.5 Necropsia.....	22
7.6 Estudio histopatológico.....	23
7.7 Biología molecular .....	23
7.7.1 Selección de iniciadores.....	23

7.7.2	Extracción de DNA .....	25
7.7.3	Prueba de iniciadores con cepas aisladas de casos clínicos previos .....	25
7.7.4	Amplificación del DNA de las cepas control por PCR .....	25
7.7.5	Amplificación del DNA del contenido duodenal por PCR.....	26
7.7.6	Electroforesis de los productos de PCR .....	27
8	RESULTADOS.....	28
8.1	DIAGNOSTICO HISTOPATOLÓGICO .....	28
8.1.1	Necropsia, examen macroscópico.....	28
8.1.2	Examen microscópico de los tejidos .....	28
8.2	DIAGNÓSTICO MOLECULAR .....	34
8.2.1	DNA genómico de <i>Campylobacter fetus</i> subsp <i>fetus</i> .....	34
8.2.2	Estandarización de condiciones para la PCR .....	35
8.2.3	Cepas aisladas de casos clínicos .....	36
8.2.4	Productos de la amplificación del DNA del contenido duodenal por PCR ....	37
9	DISCUSIÓN.....	38
10	CONCLUSIÓN .....	43
11	REFERENCIAS .....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Células de <i>Campylobacter</i> .....	4
Figura 2. Pulmón e hígado de un feto abortado .....	6
Figura 3. Placenta de borrega, cotiledón hinchado .....	7
Figura 4. Carúncula de borrega .....	8
Figura 5. Cultivo bacteriano .....	10
Figura 6 Ratones hembras isogénicos de la línea Balb/c.....	19
Figura 7. Cultivo de células de <i>Campylobacter fetus</i> subsp <i>fetus</i> .....	20
Figura 8. Inoculación vía oral.....	21
Figura 9. Homología del iniciador sapA-Forward.....	24
Figura 10. Homología del iniciador sapA-Reversel. ....	24
Figura 11. Sección histológica de cerebro .....	28
Figura 12. Sección histológica de cerebelo. ....	29
Figura 13. Sección histológica de pulmón.....	29
Figura 14. Sección histológica de corazón.....	30
Figura 15. Sección histológica del esfínter esofágic.....	30
Figura 16. Sección histológica de estómago .....	31
Figura 17. Sección histológica de duodeno. ....	31
Figura 18. Sección histológica de intestino grueso.....	32
Figura 19. Sección histológica de hígado.....	32
Figura 20. Sección histológica de bazo .....	33
Figura 21. Sección histológica de riñón .....	33
Figura 22. DNA de células de <i>Campylobacter fetus</i> subsp <i>fetus</i> .....	34
Figura 23. Amplificación mediante PCR de un fragmento del gen sapA.....	35
Figura 24. PCR para <i>Campylobacter fetus</i> subsp <i>fetus</i> de cepas aisladas de casos clínicos .....	36
Figura 25. PCR para <i>Campylobacter fetus</i> subsp <i>fetus</i> de contenido duodenal.....	37

## **ÍNDICE DE CUADROS**

Cuadro 1. Secuencia de iniciadores sapA-Forward y sapA-Reverse .....	23
Cuadro 2. Master Mix 2X, mezcla de reacción.....	26

## RESUMEN

*Campylobacter fetus* subsp *fetus* es una bacteria que afecta principalmente al ganado ovino, provocando abortos e infertilidad, afectando con ello la economía ganadera. El objetivo del presente trabajo fue establecer un modelo biológico experimental con el propósito de describir los procesos involucrados en la patogenia de la campilobacteriosis. La primera etapa consistió en probar los iniciadores sapA-Forward y sapA-Reverse para *C. fetus* subsp *fetus* con cepas aisladas de casos clínicos y la cepa de *C. fetus* subsp *fetus* (ATCC 27374). En la segunda etapa se desafió a ratones hembras isogénicos de la línea Balb/c categorizados sanitariamente como gnotobióticos e inmunocompetentes, con peso corporal aproximado de 12 g, con células vivas de *C. fetus* subsp *fetus* (ATCC 27374). En la tercer etapa se recolectaron muestras de los ratones para su estudio histopatológico y una porción de duodeno para la búsqueda de células de *C. fetus* subsp *fetus* por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se logró la amplificación del fragmento del gen sapA de *C. fetus* subsp *fetus* en las cepas aisladas de casos clínicos consistentes con *C. fetus* subsp *fetus*, así mismo, se observó la amplificación en la cepa de *C. fetus* subsp *fetus* (ATCC 27374) visualizándose un producto de amplificación de 466 pb, para ambas cepas, que corresponde a un segmento conservado de la proteína de superficie SapA de *C. fetus* subsp *fetus*. En el estudio histopatológico de los órganos analizados no se observaron cambios patológicos aparentes y para el caso del contenido duodenal de los ratones no se visualizó amplificación. No se encontraron alteraciones patológicas en los tejidos de ratones inoculados con *C. fetus* subsp *fetus* analizados por histopatología y tampoco se identificó la bacteria en el contenido duodenal. Por lo tanto, cinco días de incubación post inoculación no son suficientes para el establecimiento del microorganismo.

**Palabras clave:** *Campylobacter fetus* subsp *fetus*, ganado ovino, aborto, modelo murino, eutanasia, necropsia, gen, PCR.

## ABSTRACT

*Campylobacter fetus* subsp *fetus* is a bacterium that mainly affects sheep causing stillbirths and infertility thereby undermining a livestock-based economy. The aim of this study is to establish an experimental biological model to evaluate the pathological process of campylobacteriosis. The first stage consisted of testing initiators SapA-SapA-Forward and Reverse for *C. fetus* subsp *fetus* with isolated strains from clinical cases and the strain of *C. fetus* subsp *fetus* (ATCC 27374). At the second stage, female mice isogenic line Balb/c categorized as gnotobiotic were challenged sanitarily and immunocompetently with an approximate body weight of 12 g, with living cells of *C. fetus* subsp *fetus* (ATCC 27374). During the third stage the mice were euthanized and samples for histopathology and a portion of the duodenum for cell search *C. fetus* subsp *fetus* were collected through the Chain Reaction Polymerase (PCR) technique. The expression of gene fragment sapA was achieved in *C. fetus* subsp *fetus* strains isolated from clinical cases consistent with *C. fetus* subsp. Likewise, amplification was observed of *C. fetus* subsp *fetus* (ATCC 27374) strain and visualizing an amplification product of 465 bp for both strains, the region corresponding to a conserved segment of the surface array protein SapA of *C. fetus* subsp *fetus* were achieved. There were no pathological changes in mice tissues inoculated with *C. fetus* subsp *fetus* analyzed by histopathology nor were any bacteria identified in the duodenal contents. Therefore it was determined that a five-day incubation period post inoculation is not long enough for the establishment of the microorganism.

**Keywords:** *Campylobacter fetus* subsp *fetus*, sheep, abortion, mouse model, euthanasia, necropsy, gene, PCR.