



UNIVERSIDAD DEL MAR

CAMPUS PUERTO ESCONDIDO

**EVALUACIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL PARA LA
CAMPILOBACTERIOSIS 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



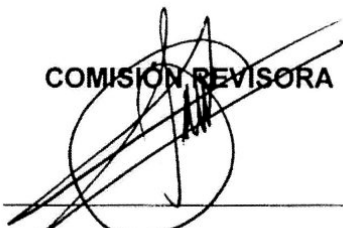
UNIVERSIDAD DEL MAR CAMPUS PUERTO ESCONDIDO

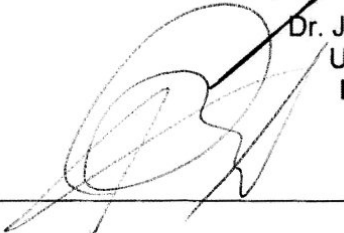
Puerto Escondido, Oaxaca, Enero de 2014


ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

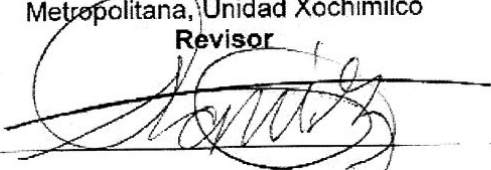
Después de realizar una revisión detallada de la tesis “**EVALUACIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL PARA CAMPILOBACTERIOSIS INDUCIDA POR *Campylobacter fetus* SUBSP *fetus***”, presentada por el pasante de la **LICENCIATURA EN ZOOTECNIA, SERGIO AYALA DÍAZ**, se considera que cumple con los requisitos y calidad 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 Karina 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 <i>sapA</i>	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 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.