



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA

“PRESENCIA DE *Helicobacter pylori* EN EL AGUA DE
TORTUGAS DOMÉSTICAS”

Tesis que para obtener el título de:
BIÓLOGO

PRESENTA:
LUIS ALEJANDRO BRAVO JUÁREZ

TUTOR: D.C. MARCOS FLORES ENCARNACIÓN



MARZO 2015

Dedicado a...

Todas aquellas personas que compartieron una habitación que ha sido cada etapa a lo largo de mi formación, que han estado a mi lado sin importar las condiciones y las circunstancias, que me ayudaron a fortalecer mis convicciones y a superar mis miedos, a aquellas personas que han sacrificado todo lo querido por lograr ver este momento lleno de frutos para un futuro prometedor.

Del mismo modo pretendo recordar a aquellos que se han ido sin ver este momento lleno de nuevas esperanzas y sueños, agradezco profundamente a cada una de las personas que se han tomado la delicadeza de leer este trabajo, pues representa un compendio de personas, de ideas y de compañerismo para forjarlo...

Una gota de agua forma un mar... busca la luz...

Índice.

Resumen.....	5
Introducción.....	6
1. Antecedentes	10
1.1. <i>Helicobacter pylori</i>	11
1.2. Epidemiología.....	13
1.3. Mecanismos de patogénesis	16
1.4. Sobrevivencia de <i>H. pylori</i> en agua	21
2. <i>H. pylori</i> en mascotas	23
3. Planteamiento del problema	24
4. Justificación	25
5. Hipótesis.....	26
6. Objetivos	27
7. Esquema de trabajo	28
8. Material y métodos.....	29
8.1. Material biológico	29
8.2. Selección de los sitios de monitoreo.....	29
8.3. Recolección de agua.....	29
8.4. Recuperación de los microorganismos	30
8.5. Extracción de DNA genómico.....	30
8.6. Cuantificación de DNA.....	30
8.7. PCR del gen <i>16S RNAr</i>	31
8.8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final del gen <i>cagA</i>	33
8.9. Análisis de productos de PCR	34
9. Resultados.....	35
9.1. Condiciones de mantenimiento y posible impacto de las tortugas domésticas.....	36

9.2. Relación de estado de salud mascota-dueño	39
9.3. Identificación de bacterias a partir de las muestras del agua que se usa para las tortugas domésticas	40
9.4. Identificación de bacterias del agua de peceras de tortugas domésticas	41
9.5. Concentración de microorganismos a partir de las muestras de agua	43
9.6. Determinación de DNA genómico.....	44
9.7. Análisis de <i>H. pylori</i> por PCR	46
9.8. Búsqueda de gen <i>cagA</i> mediante PCR punto final.....	49
10. Discusión.	51
11. Conclusiones.....	56
12. Perspectivas	57
Referencias.....	58
ANEXOS	64

Resumen.

H. pylori es un bacilo Gram negativo, espirilado microerófilo, móvil debido a sus flagelos polares, posee la capacidad de generar diversas alteraciones gastrointestinales como gastritis infecciosa, úlcera gástrica y duodenal, así como adenocarcinoma gástrico muy frecuente en países en vías de desarrollo; sin embargo existen evidencias que sugieren la transmisión de persona a persona por la ingesta de alimentos o agua contaminados. Debido a que conoce poco acerca de la transmisión de *H. pylori* a través de reservorios animales es que en este trabajo se planteo realizar la búsqueda de *H. pylori* en agua proveniente de peceras de tortugas domésticas, ya que este reptil frecuentemente es adoptado como mascota en diversos hogares y probablemente constituye un foco de infección para el hombre. Mediante pruebas microbiológicas y de PCR se determinó que: 5 muestras de 20 del agua que se usa para la manutención de las tortugas resultaron positivas a *E. coli*; 12 muestras del agua residual de las peceras de tortugas resultaron positivas a: *Salmonella* sp, *E. coli*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus* sp. Al realizar la detección del gen *16S rRNA* de *H. pylori* por PCR anidado a las muestras positivas del agua residual de las peceras de las tortugas se encontró que 6 muestras de 12 resultaron positivas y para la detección del gen *cagA* a las 6 muestras positivas al gen *16S rRNA* de *H. pylori*, no se encontró muestra que resultase positiva. Este trabajo es importante pues genera un punto de partida para el análisis del agua como principal vector para la transmisión de bacterias patógenas para el hombre, especialmente de *H. pylori*.

Introducción

Las relaciones entre hombres y animales han sido transformadas a lo largo de la historia. Los animales han sido utilizados como medio de trabajo, como fuente de alimento, como protección para el hogar, como símbolo o instrumento sagrado objeto de culto, como modelos para la investigación, así como guía para personas discapacitadas y como fuente de afecto para sus dueños **(Gutiérrez et al. 2007)**.

En la actualidad han incrementado el número de animales de compañía en las grandes ciudades. Esto se debe a varios factores como: la demanda de mascotas para llenar espacios afectivos en los entornos familiares, para vigilancia, como un fenómeno de desplazamiento de poblaciones campesinas trayendo consigo la cultura de la posesión de animales, etc **(Gómez et al. 2007)**.

Este aumento desmedido de mascotas en las ciudades empieza a plantear problemas de cohabitación, a la vez que requiere de la revisión de las repercusiones en la salud pública y la salud individual, para así establecer medidas necesarias para minimizar los factores de riesgo por zoonosis **(Gómez et al. 2007)**.

Las zoonosis son causadas por diversos grupos de microorganismos **(Monsalve et al. 2009)**. Si bien la mayoría son relativamente inusuales, éstas deben ser incluidas en el diagnóstico diferencial de diversos síndromes clínicos, por tal razón el médico siempre deberá obtener información acerca de la convivencia con mascotas en la casa e informar de las posibles enfermedades que pueden provocar, y así poder prevenirlas **(Zuñiga y Caro, 2007)**. Ya que toda la población tiene el riesgo de contraer una enfermedad transmitida por animales, sin embargo su impacto es mayor en niños, personas

inmunodeprimidas y las que laboran con animales y/o productos derivados de los mismos **(Pacheco, 2003)**. En los últimos años se ha observado que han emergido y reemergido algunas zoonosis, fenómeno estrechamente relacionado a cambios ecológicos, climáticos y socioculturales.

Los mecanismos de transmisión de la zoonosis se agrupan en:

- Transmisión directa: a partir del reservorio animal, por contacto, a través de alimentos obtenidos del mismo, de sus desechos, etc.
- Transmisión por vectores: que mantienen la cadena de transmisión de la enfermedad entre los animales y el hombre.

En la actualidad se han descrito cerca de 200 enfermedades zoonóticas en los países en vías de desarrollo, debido a la ausencia de infraestructura sanitaria y el bajo nivel cultural; además de ser una importante causa de morbimortalidad, suponen cuantiosas pérdidas económicas. En algunos países desarrollados se difunden determinadas enfermedades por el tráfico de animales exóticos **(Maguiña et al. 2004)**.

Entre los agentes más frecuentes causantes de infecciones en el hombre debido a las zoonosis se encuentran: bacterias, parásitos, virus y hongos (Tabla 1). La infección puede ser transmitida por vía: cutánea, mucosa, digestiva y respiratoria, etc **(Maguiña et al. 2004)**.

Tabla 1. Agentes infecciosos frecuentes asociados a zoonosis.

Bacterias	Virus	Parásitos	Hongos
<i>Bartonella henselae</i>	<i>Flavovirus</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.	<i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Hantavirus</i>	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Microsporium canis</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Rhabdovirus</i>	<i>Taenia solium</i>	<i>Trichophyton</i>
<i>Chlamydia psittaci</i>		<i>Toxicara canis</i>	<i>mentagrophytes</i>
<i>Leptospira</i> sp.		<i>Toxocara cati</i>	
<i>Listeria</i>		<i>Toxoplasma gondii</i>	
<i>monocytogenes</i>		<i>Trichinella spiralis</i>	
<i>Salmonella enteritidis</i>			

Tomado de: Dabach *et al.* 2003.

En el año 2002 un estudio en Chile dio a conocer la frecuencia de mascotas, revelando que el 70% de los hogares donde habitan niños y el 58% de los pacientes inmunocomprometidos poseían algunas mascotas (**Pacheco, 2003**). Siendo éstas: el 54% perros, 25% gatos, 15% aves, 3% roedores y el 3% animales exóticos. En 2003, la UNAM reportó que en México aproximadamente existen 16.2 millones de aves, 13.3 millones perros, 8.3 millones de gatos y 7.8 millones de peces, reptiles y animales acuáticos dando la importancia a la presencia de mascotas (**Pacheco, 2003**).

Entre las infecciones asociadas a mascotas (zoonosis) como perros, gatos, roedores, aves y reptiles, se pueden citar a la criptosporidiosis, hidatidosis, leptospirosis, pasteurelisis, campilobacteriosis, toxoplasmosis, salmonelosis, la rabia, diversas tiñas, etc. En la Tabla 2 se resumen las infecciones asociadas a diversas mascotas.

Tabla 2. Infecciones asociadas a mascotas.

Perros	Gatos	Roedores y Conejos	Aves	Reptiles
Periodontitis	Criptosporidiosis	Criptococosis	Criptococosis	Salmonelosis
Sepsis	Pasteurellosis	Ectoparasitosis	Psitacosis	Campilobacteriosis
Criptosporidiosis	Toxoplasmosis	Rabia		
Ectoparasitosis	Tiñas	Tiñas		
Ehrlichiosis	Rabia			
Giardiosis	Ectoparasitosis			
Hidatidosis				
Leptospirosis				
Pasteurellosis				
Rabia				
Toxocariasis				
Tiñas				

Tomado de: Dabach *et al.* 2003.

El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades en Atlanta, calcula que el 7% de las infecciones por salmonelosis en Estados Unidos se asocia a posesión de reptiles. En el Reino Unido aproximadamente el 1% de las infecciones por *Salmonella* sp. son asociadas a la exposición a reptiles (**Zuñiga y Caro, 2007**). En el caso de los reptiles que se han vendido como mascotas en los últimos años, se han reportado y asociado casos de salmonelosis, sobre todo en niños pequeños (**Warwick et al., 2001**).

1. Antecedentes

En los ambientes acuáticos de agua dulce, se encuentra una gran diversidad de microorganismos que permiten el desarrollo de los ciclos biológicos y químicos; como ejemplo de microorganismos que se encuentran de manera normal en las aguas se tiene a las algas y bacterias que hacen transformaciones orgánicas. También existen otros agentes infecciosos para el hombre como protozoarios, rotíferos, crustáceos, insectos, etc. Cuando su concentración y su composición alteran la calidad del agua, esto dificulta su uso y el tratamiento del recurso **(Aurazo, 2000)**. Las aguas superficiales están expuestas a una amplia gama de factores que pueden alterar su calidad biológica y ocasionar cambios simples o complejos con diferentes niveles de intensidad. Esta alteración se puede originar en eventos naturales o actividades antropogénicas, como el uso doméstico del agua y la consiguiente producción de aguas residuales, de la industria, minería y agricultura, entre otras **(Craun et al. 1996)**.

Por otro lado, la contaminación fecal de las fuentes de aguas superficiales para abastecimiento de consumo humano es uno de los problemas más preocupantes en los países en vías de desarrollo. En las grandes ciudades esta contaminación se debe principalmente al vertimiento de los desagües sin ningún tratamiento, los lixiviados de rellenos sanitarios, infiltraciones de tanques sépticos, etc. **(Aurazo, 2000; Ashbolt, 2005)**. También se ha observado que la contaminación fecal es intensa en las zonas rurales, debido a la defecación al aire libre y por la presencia de animales domésticos y silvestres, que actúan como reservorios de agentes patógenos como bacterias, virus y protozoarios, causando enfermedades de diferente gravedad, desde gastroenteritis hasta cuadros de disentería, hepatitis o fiebre tifoidea **(Aurazo, 2000; Craun et al. 2001)**. La transmisión hídrica es sólo una de las vías, pues estos agentes patógenos también pueden transmitirse a través de los alimentos contaminados, o bien de persona a persona debido a los malos hábitos higiénicos de los animales al hombre, entre otras vías. La mala calidad del agua ha causado alrededor de 1.7 millones de muertes en el mundo en países en vías de desarrollo, principalmente a través de diarrea infecciosa, sobre todo

en niños **(Ashbolt, 2005; Craun et al. 2001)**. Se han detectado diferentes microorganismos productores de toxinas en aguas superficiales; entre ellos se pueden citar a: *Escherichia coli*, *Salmonella* sp, *Shigella* sp, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* y *Campylobacter jejuni*. Entre las especies virales se han encontrado a los enterovirus, rotavirus y adenovirus. Como ejemplo de protozoarios se pueden citar a *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp, *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, algunos helmintos como *Ascaris* sp, *Trichuris* sp y *Taenia* sp **(Aurazo, 2000)**. El agua residual usada para la agricultura, representa un foco de infección en países en vías de desarrollo, ocasionando en el ser humano enfermedades como teniasis, fasciolosis, disentería amebiana, fiebre tifoidea, salmonelosis, gastroenteritis, cólera, hepatitis infecciosa, trastornos intestinales, diarrea, etc. **(Gonzales, 2010)**. Las infecciones gastrointestinales son una de las causas importantes de morbimortalidad entre los lactantes y niños. Se estima que el 50% de los niños muere antes de los 5 años en Asia, África y Latinoamérica. En México es uno de los principales problemas de Salud Pública debido al consumo de agua y alimentos contaminados **(Hernández et al., 2011)**.

1.1. *Helicobacter pylori*

H. pylori fue descubierto en 1983 por B.J Marshall y J.R Warren que tras un cultivo de la mucosa gástrica de pacientes con gastritis crónica, obtuvieron un microorganismo Gram negativo, que inicialmente fue denominado *Campylobacter pylori*, pero tras investigación fue clasificado dentro del género *Helicobacter* en el cual se encuentran otras especies de la mucosa gástrica e intestinal de otros mamíferos (Tabla 3).

Tabla 3. Especies de *Helicobacter* sp. y microorganismos relacionados.

Microorganismo	Localización	Hospedero
<i>H. pylori</i>	Estómago	Humano, gato y monos
<i>H. felis</i>	Estómago	Gato, perro y hombre
<i>H. heimanii</i>	Estómago	Hombre, gato y perro
<i>H. mustelae</i>	Estómago	Hombre, gato y perro
<i>H. acinonyx</i>	Estómago	Leopardo
<i>H. nemestrinae</i>	Estómago	Macaco
<i>H. cinaedi</i>	Intestino	Hamster
<i>H. fennelliae</i>	Intestino	Hombre y roedores
<i>H. canis</i>	Intestino	Perros
<i>H. muridarum</i>	Intestino	Perros
<i>H. rappini</i>	Intestino, estómago, hígado	Ovejas, ratones
<i>H. hepaticus</i>	Hígado	Ratones

Tomada de: López-Brea. (1995)

La clasificación taxonómica de *H. pylori*, de acuerdo al Manual de Bergey 2004 es:

Dominio: Eubacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Epsilonproteobacteria

Orden: Campylobacterales

Familia: Helicobacteraceae

Género: Helicobacter

Especie: pylori

H. pylori es un bacilo Gram-negativo, espirilado, microaerófilo, con un tamaño de 0.5 a 1 μm de ancho y 3 μm de largo, crece a una temperatura de 37°C, aunque puede desarrollarse en un rango de 35°C a 39°C en una atmósfera reducida de oxígeno y CO₂. Presenta de 2 a 6 flagelos polares con un bulbo terminal membranoso. Se localiza en la mucosa gástrica del estómago humano con una morfología espiral. En cultivos su morfología puede ser más recta o

llegar a ser cocoide. Es ureasa, catalasa y oxidasa positivas (Fig. 1) (Amieva, 2008; Solnick y Schauer, 2001).

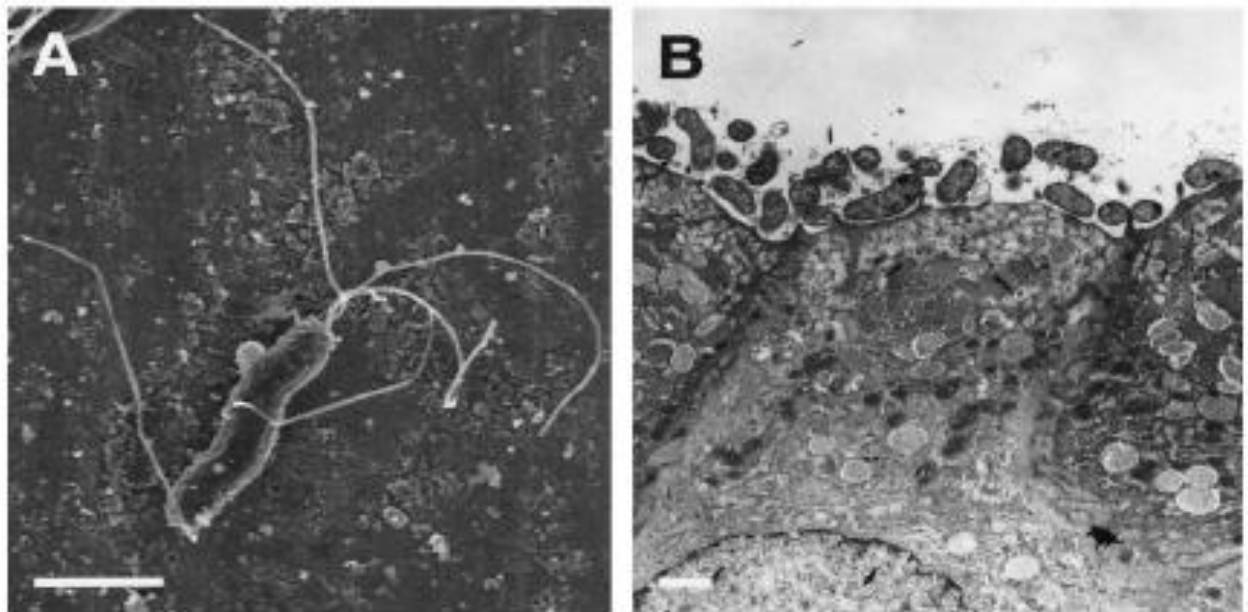


Fig. 1. (A) Micrografía electrónica de *H. pylori* mostrando una morfología espiral, los flagelos múltiples y penetrando fibras periplásmicas. (B) Micrografía electrónica de epitelio gástrico con gran número de *H. pylori* atacando la superficie (Solnick y Schauer, 2001).

1.2. Epidemiología

La infección por *H. pylori* es causa de gastritis, úlcera gástrica y duodenal. También contribuye a la etiología multifactorial del adenocarcinoma gástrico de tipo difrenciado y linfoma tipo MALT. Afecta aproximadamente al 50% de la población mundial; del 1-15% de los individuos infectados generan úlceras peptídicas y solo 1-3% desarrollan cáncer gástrico. Por lo que existe un gran interés en conocer su epidemiología, factores ambientales de riesgo y forma de transmisión (Mladenova, 2006).

La frecuencia de infección muestra un pequeño grupo de países con prevalencias del 20 al 40%, que corresponden a países desarrollados, mientras

otro grupo de países con prevalencia de 70 al 90%, que corresponden a países en vías de desarrollo (Fig.2).

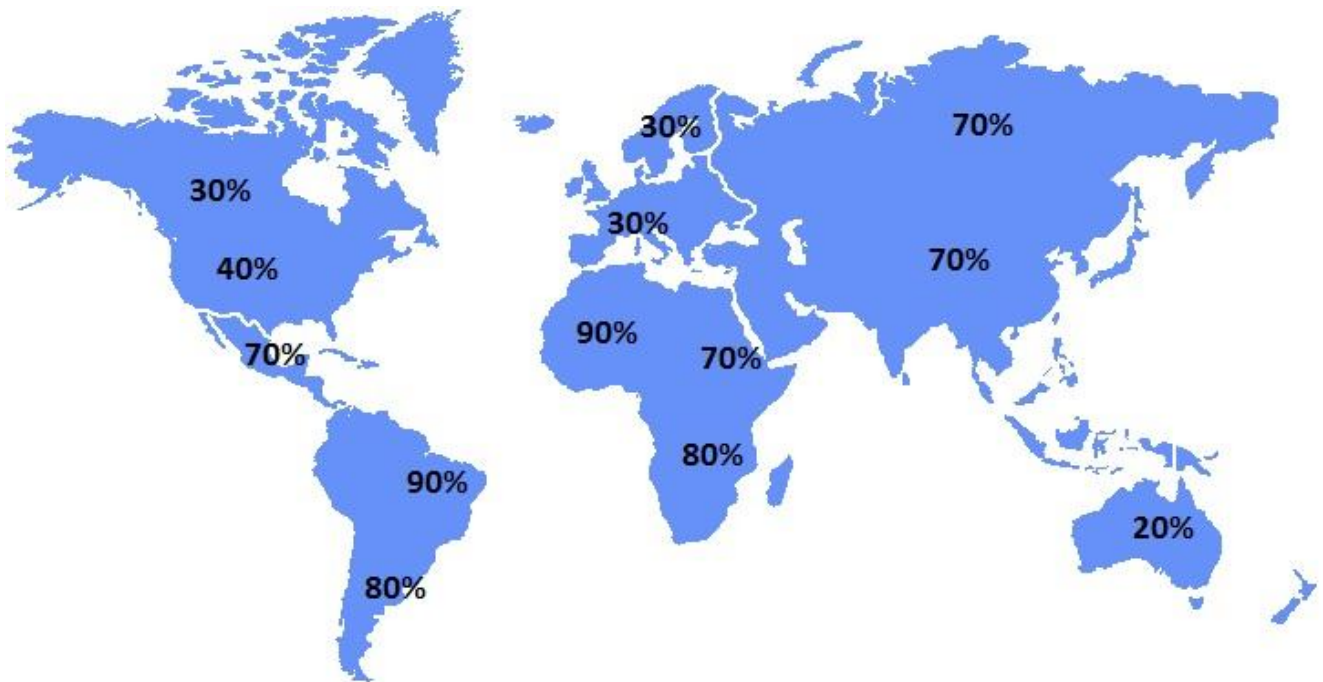
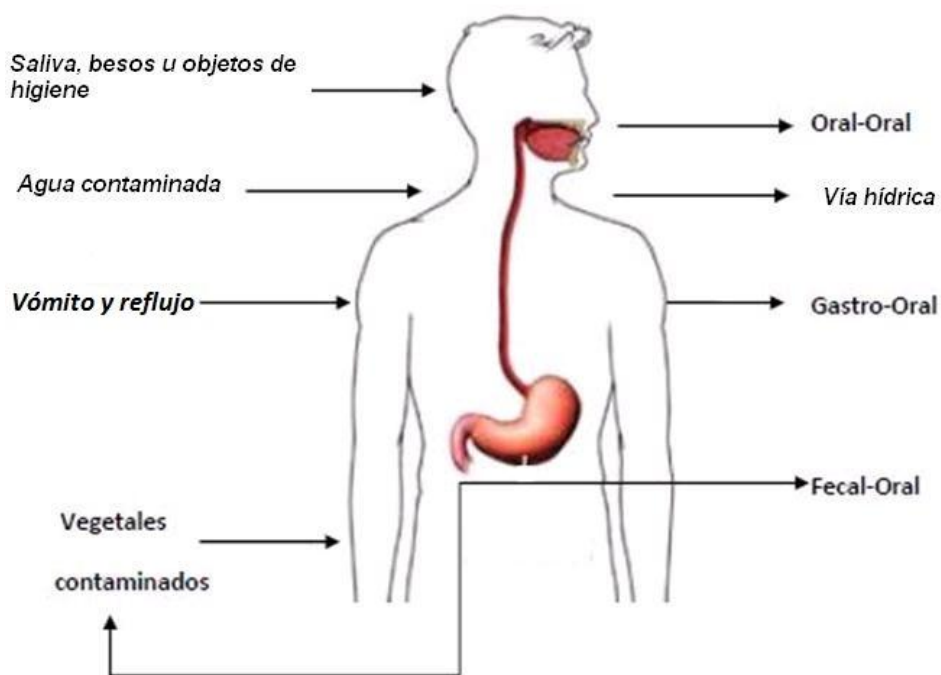


Fig. 2. Prevalencia de *H.pylori* en el mundo (Mladenova, 2006).

El modo de transmisión de *H. pylori* no está totalmente esclarecido. Se ha postulado que puede ocurrir por la vía oral-oral, gastro-oral y fecal-oral.

- 1) Transmisión oral-oral. Esta vía se produce por un contacto estrecho entre personas, ya que *H. pylori* se ha cultivado a partir de muestras obtenidas de la boca (placa dental, saliva, lengua). Se piensa que la colonización de la cavidad oral es transitoria debido al reflujo que sufren algunas personas (Poddar & Yanchha, 2007).
- 2) Transmisión oral-gástrica. Esta posible vía de transmisión se apoya en la ocurrencia de brotes asociados al manejo y desinfección inadecuada de gastroscopios, además de que una infección aguda por *H. pylori* puede causar vómitos y aclorhidria facilitando la diseminación del microorganismo. Además de que se ha cultivado esta bacteria a partir de muestras del aire tras el vómito (Macenlle, 2007).

3) Transmisión fecal-oral. Esta vía es la más importante a nivel mundial y es la que genera la prevalencia de *H. pylori* en países en vías de desarrollo, ya sea por el consumo de agua y alimentos contaminados con este microorganismo, o bien al uso de aguas no tratadas para el riego de plantas comestibles y a una infraestructura sanitaria deficiente. Además se han logrado cultivar formas viables a partir de muestras de heces, lo que apoya la hipótesis de esta vía de transmisión (Fig. 3) (Macenlle, 2007).



4) Fig.3. Vías de transmisión propuestas para *H. pylori* (Macenlle, 2007).

En países desarrollados, la vía de transmisión suele ser oral-oral por el contacto interpersonal, mientras que en países en vías de desarrollo, la transmisión es vía fecal-oral por la falta de infraestructura sanitaria, el hacinamiento y los bajos estándares socioeconómicos y educativos, que se asocian con tasas de prevalencia y de infecciones elevadas (Ahuja y Sharma, 2002).

Existen dos patrones de seroprevalencia frente a *H. pylori*. El primero de ellos, incluye aquellas poblaciones con una elevada tasa de infección durante la infancia, que se correlaciona con países en vías de desarrollo, mientras que en naciones industrializadas existe una tasa baja de infección en la niñez (menor al 30%); en personas mayores de 60 años se registró un incremento (>60%) de la

prevalencia de *H. pylori* (Bruce, 2008). En países como África existen elevados niveles de infección en individuos de todas las edades, pero las tasas de cáncer gástrico son muy bajas. La explicación a esta incógnita es el polimorfismo genético, la variación de los factores de virulencia, las diferentes entre cepas y el tipo de dieta (Graham, 2009). Sin embargo en naciones como China o Japón, los adultos mayores presentan tasas de cáncer elevadas. Una posible justificación es la virulencia de las cepas, ya que la mayoría son *cagA+*, aunque en Asia se ha documentado subtipos de cepas *cagA* positivas denominadas “variantes asiáticas Este”, que es una forma endémica asociada con mayores grados de inflamación y atrofia de la mucosa gástrica desarrollando formas clínicas de peor pronóstico. La “variable Oeste” es menos agresiva y sólo causa gastritis y úlceras pépticas.

Además se debe mencionar que existen diferentes factores implicados en el riesgo de adquirir la infección por *H. pylori*. Puede decirse que la prevalencia aumenta con la edad en la que se adquiere la infección, mayormente en la infancia y está asociada a un bajo nivel socioeconómico, a la pertenencia a determinados grupos étnicos y áreas geográficas (Go, 2002).

1.3. Mecanismos de patogénesis

De acuerdo a Rivas y Hernández (2000), a *H. pylori* se le atribuye un papel patogénico debido a que tiene la capacidad para sobrevivir en un ambiente tan hostil como el jugo gástrico y esto se debe al desarrollo de características especializadas que le permiten penetrar e invadir la mucosa gástrica. Entre los factores implicados en la virulencia de esta bacteria se encuentran:

a) Flagelos y morfología espiral: Ambas características le facilitan a la bacteria el movimiento y el paso a través de la capa mucoide, contrarrestando el peristaltismo gástrico y así adherirse a la superficie epitelial. *H. pylori* puede presentar tres tipos morfológicos durante su ciclo vital. La forma espiral cuando se encuentra en la mucosa gástrica, la forma bacilar recta cuando se encuentra en cultivos y la forma cocoide cuando se trata de cultivos viejos o muy

prolongados (estrés). *H. pylori* posee de 4 a 6 flagelos polares de 2.5 μm de largo y 30 nm de diámetro, con bulbo terminal membranoso, una placa basal de anclaje a la célula y una vaina lipídica que protege a los flagelos del ácido gástrico. Se ha comprobado que las cepas no móviles de *H. pylori* son menos virulentas y no son capaces de colonizar la superficie gástrica (Ottemann y Lowenthal, 2002).

b) Ureasa y otras enzimas. La ureasa es una enzima fundamental para la colonización de la mucosa y está implicada en la lesión que ocasiona la bacteria. Esta enzima se localiza en la membrana externa y el espacio periplásmico. Es una estructura hexamérica, con seis monómeros de 88.1 kDa y cada monómero tiene dos subunidades una de 26.5 y otra de 61.6 kDa; ésta última tiene incorporado un átomo de níquel. La ureasa desdobra la urea en amoníaco y CO_2 , que neutraliza el ácido gástrico manteniendo un microambiente cuyo pH es de 6 a 7 (que protege a la bacteria y le permite atravesar la capa de moco gástrico). Además de que tiene propiedades citotóxicas y junto con el amoníaco, lesionan la mucosa del epitelio gástrico, permitiendo la adhesión, la obtención de nutrientes y el desarrollo de la bacteria. Existen otras enzimas como mucinasas, lipasas, proteasas, catalasas y dismutasas que protegen a la bacteria de metabolitos tóxicos secundarios, resultado de procesos oxidativos de defensa de los macrófagos y neutrófilos. La bacteria también produce fosfatasa alcalina y ácida además de la gama-glutamil transpeptidasa (Fig. 4).

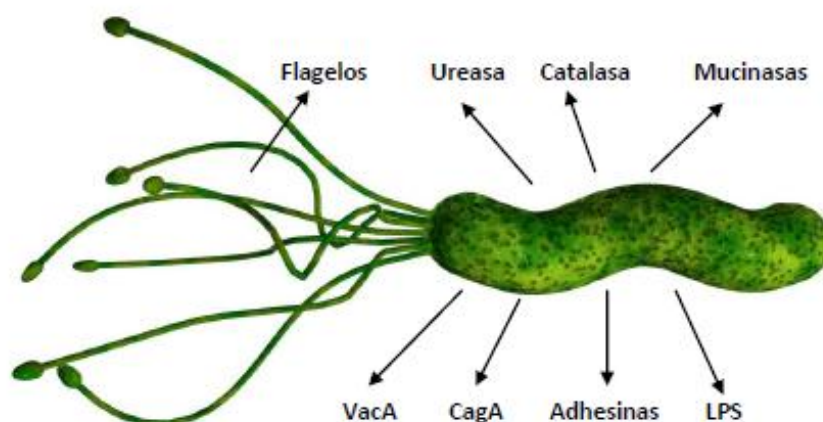


Fig. 4. Factores de virulencia presentes en *H. pylori* (Ottemann y Lowenthal, 2002).

c) Adhesinas: Son fundamentales para la adhesión al epitelio gástrico, lo cual ocurre mediante hemaglutininas, que son glicoconjugados o lípidos bacterianos involucrados en la colonización (BabA, SabA, OMP'S, Hopo, ALPA, ALPB, Hpa). Estas adhesinas al acoplarse a los receptores de las células del hospedero, inducen cambios inmediatos (transducción de señales) permitiendo la infiltración de células inflamatorias y al mismo tiempo evade el sistema inmune y se establece como infección persistente.

e) Citotoxina vacuolizante (VacA). Es considerada como un factor de virulencia de gran importancia encontrado en pacientes con cáncer gástrico y úlceras peptídicas. VacA tiene un peso molecular de 87 kDa, con capacidad de inducir la vacuolización citoplasmática en cultivo y muerte de células epiteliales. El 60% de las cepas generan vacuolización. **Pérez (2007)** señala que el gen *vacA* que codifica para esta citotoxina contiene 1200 aminoácidos y tres regiones: una región N-terminal con señal de secuencia (S1a, S1b, S1 y S2), en donde la secuencia S1 tiene la actividad vacuolizante; la región media son los tipos m1 y m2, en donde el de mayor actividad es el m1, mientras el m2 tiene menor actividad y la región C-terminal (Fig.5).

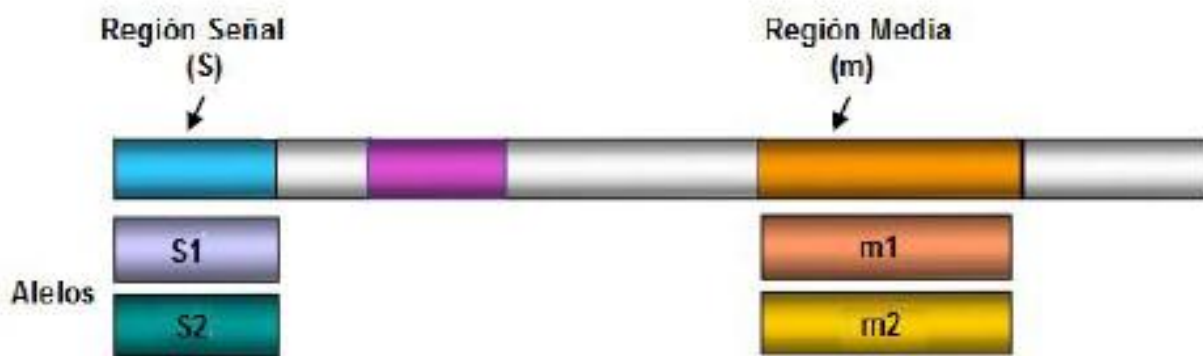


Fig.5. Regiones del gen *vacA* de *H. pylori* (**Pérez, 2007**).

El mecanismo por el cual VacA induce la vacuolización se conoce parcialmente. Esta proteína es hexamérica y su montaje es favorecido por un pH ácido, lo que resulta en un canal de aniones selectivos a través de la bicapa lipídica de la célula. Se traslada al citosol e interfiere con el tránsito vesicular de los lisosomas y de nuevo configura un canal de iones a través de la membrana

endosomal, que es responsable de la vacuolización mediante el vaciamiento del contenido celular (aniones y urea), tal como se observa en la Fig. 6.

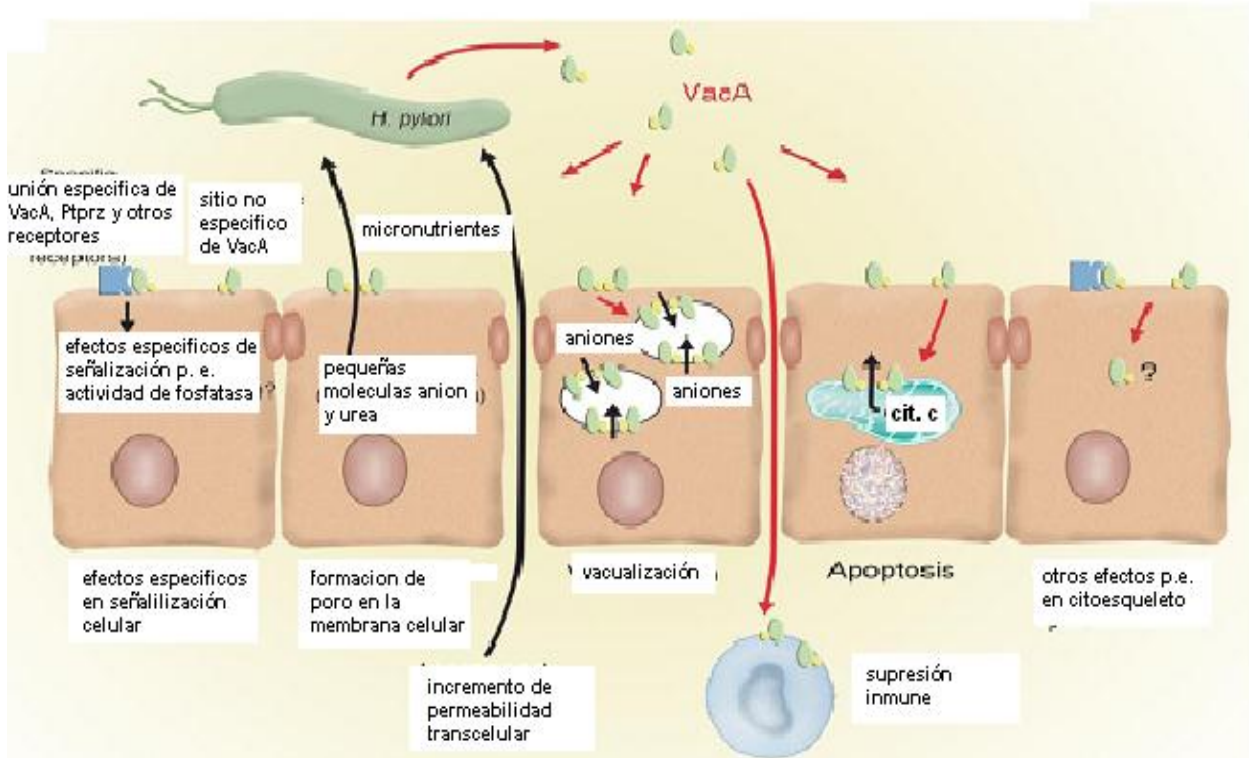


Fig. 6. Actividad biológica de Vac A de *H. pylori* (Caputo et al, 2003).

VacA además induce la pérdida de uniones epiteliales lo que facilita la corriente de nutrientes hacia la colonización. Promueve también la apoptosis por activación de Fas/CD95 a través de activación las caspasas 3 y 8, aunque no está todavía tan claro el mecanismo. También estimula la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y conduce al desarrollo de procesos tumorales (Caputo et al., 2003).

f) El gen *cagA* asociado a la citotoxina CagA. Este factor de virulencia representa un fenotipo que diferencia a ciertas cepas de *H. pylori*, ya que sólo el 60% de las mismas expresan la proteína con un peso molecular de 120 a 140 kDa denominada CagA. El gen *cagA* se localiza formando parte de una isla de DNA de 40 kb conocida como “isla de patogenicidad Cag PAI” (Fig. 7). Contiene 31 genes que estimulan las quimiocinas y MAP quinasas, con la inducción de factores pro-inflamatorios. Esta isla le confiere la capacidad de aumentar el riesgo para desarrollar enfermedades ulcerosas pépticas y neoplasias gástricas en los infectados.

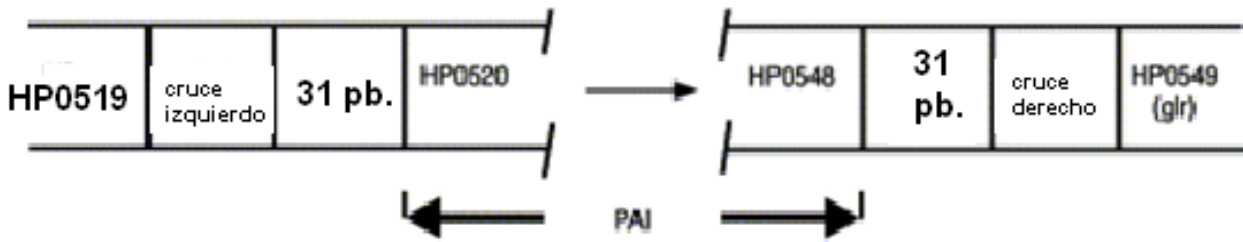


Fig.7. La isla de patogenicidad en las cepas Cag-PAI positivas (**Caputo et al., 2003**).

Algunos productos de Cag-PAI utilizan el sistema de traslocación tipo IV. La proteína CagA translocada se localiza en la superficie interior de la membrana plasmática y se somete a fosforilación de tirosina por las quinasas de la familia Src (Fig. 8).

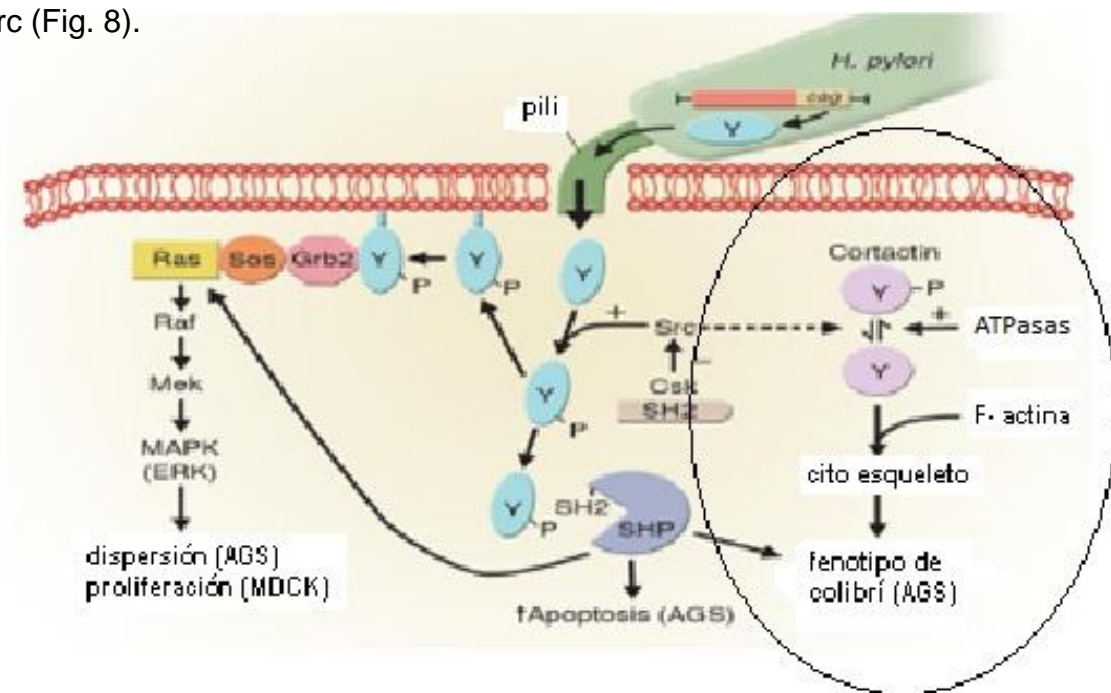


Fig.8. Interacción física y funcional de CagA de *H. pylori* (**Caputo et al., 2003**).

Tras la fosforilación de la tirosina, CagA se une específicamente a la SH2 que contiene el dominio tirosina fosfatasa SHP-2 y activa la actividad de la fosfatasa. El complejo CagA-SHP-2 activado, potencia la actividad de la quinasa MAPK (Erk), que regula tanto el crecimiento celular y la morfología celular. SHP-2 también desfosforila un sustrato celular (indicado con la elipse en la figura), que está implicado en la inducción del fenotipo “colibrí” que está asociada con la motilidad celular elevada.

1.4. Sobrevivencia de *H. pylori* en agua

Uno de los primeros ensayos que relaciona el riesgo de infección por la bacteria *H. pylori* con la procedencia del agua consumida, se llevó a cabo en poblaciones infantiles de diversas comunidades del Perú y de otras partes del mundo. En este estudio se concluyó que el agua es el factor de riesgo más importante que el *status* socioeconómico. También se ha demostrado que la bacteria *H. pylori* puede sobrevivir en microambientes acuáticos bajo la forma cocoide (forma viable no cultivable). Estas formas poseen una resistencia mayor que la forma bacteriana normal (**Adams, 2003; Klein, 1991**). Las aguas residuales, agua de pozos o ríos son ambientes hostiles y por ello, favorables para el desarrollo de las formas cocoides, por lo que su utilización para el consumo humano o para riego, las convierte por tanto en un potencial vector de transmisión de la bacteria (**Fernández, 2007**). **Ramírez et al., (2004)** evaluaron la sensibilidad y el grado de recuperación de *H. pylori* en agua potable, demostrando que la bacteria sobrevive a la cloración, sin embargo no se encontró correlación entre los niveles de cloro de las aguas tratadas con la prevalencia de la infección en la población en riesgo (**Ramírez et al., 2004**).

Adams et al., (2003) realizaron otros estudios con los que se demostró la capacidad de *H. pylori* de mantenerse viable al menos 10 horas a temperaturas mayores a 20°C. Otros autores como **Azevedo et al., (2006)**, reportaron que *H. pylori* se mantiene viable por periodos más largos en el agua (2 años a 4°C). **Oliver (2005)**, demostró la viabilidad de esta bacteria en agua hasta por 75 horas a 10°C.

Otro factor no menos importante es la adherencia de los microorganismos a las superficies como un elemento de sobrevivencia ('biofilms'). Por ejemplo, los organismos establecidos en biopelículas aumentan su capacidad para soportar y neutralizar cloraminas y estimulan la producción de catalasa. De esta forma se defienden del medio ambiente que les rodea, activando genes de respuesta al estrés y cambiando los fenotipos de estrés ambiental (**Fux et al., 2005**). Se ha estudiado la adhesión de *H. pylori* en tanques de almacenamiento de agua de acero inoxidable y de polipropileno, encontrándose que en estas superficies

la bacteria retiene su morfología espiral, comprobando de tal forma que los sistemas de distribución de agua son un reservorio para la bacteria **(Azevedo et al., 2006)**.

Existe un aumento en la frecuencia de la infección por *H. pylori* durante los meses de lluvia. Esto podría ser debido a un aumento en la densidad bacteriana o un cambio de estado latente a uno en división celular. Se ha considerado que *H. pylori* en el agua pasa a forma cocoide. Estas formas cocoides son capaces de colonizar la mucosa gástrica de ratones **(Domínguez, 2002; She et al., 2003)**.

Baker et al., (2002), presentaron evidencia de una mayor resistencia de *H. pylori* al cloro y al ozono con respecto a otras bacterias como *E. coli* en sistemas de distribución de agua; también se ha reportado la resistencia de *H. pylori* al glutaraldehído como desinfectante de instrumental **(Chiu et al., 2007)**.

En la actualidad, se cuenta con evidencia para reconocer al agua como un vehículo para la transmisión de *H. pylori*. El consumo de agua no tratada representa un factor de riesgo para la población. En Japón, la mayor parte de los casos de transmisión de *H. pylori* es de origen hídrico y su transmisión se asocia con la duración de la ingesta **(Karita et al., 2003; Mazari et al., 2001)**. Esa tolerancia en el agua de *H. pylori* tienen fuertes implicaciones en la Salud Pública. En los países desarrollados, existe un creciente control de parámetros del agua y la calidad de los alimentos, lo que puede explicar la disminución en la colonización de las personas por *H. pylori* **(Hernández et al., 2011)**.

2. *H. pylori* en mascotas

H. pylori puede tener múltiples vías de transmisión. No está claro si puede transmitirse desde un reservorio animal. En Alemania, se realizó un estudio con niños que tenían contacto con diversas mascotas y la prevalencia fue de 6.3% **(Bode, 1998)**.

En la mucosa gástrica de animales domésticos se han encontrado organismos en forma espiral, pero se consideran flora normal de éstos. Se ha descrito a *H. heilmanni* como una especie encontrada en el ser humano y en animales como gatos, perros y cerdos. Existe el reporte de una niña con gastritis crónica y presencia de *H. heilmannii*, la cual reportó tener perros (uno de ellos con vomito crónico). Los animales fueron sometidos a endoscopia y biopsia encontrándose organismos del género *Helicobacter* **(Happonen, 1996; Hernández, 2004; Van, 2005)**.

Estudios han reportado la presencia de *H. pylori* en heces, secreciones salivares y la placa dental de gatos, lo que llevó a sugerir que esta bacteria pudiera ser un agente zoonótico con transmisión de los gatos a los humanos **(Hernández, 2004)**.

En reptiles, los informes referentes a la presencia de *H. pylori* son muy limitados. Recientemente se presentó un estudio con hallazgos patológicos de una especie de *Helicobacter* asociada a la septicemia de una tortuga (*Malacochersus tornieri*) **(Brian, 2010)**.

3. Planteamiento del problema

H. pylori es una bacteria que prevalece en el 50% de la población mundial, estimándose un 70% en zonas industrializadas y un 80% en países en vías de desarrollo. Se adquiere a edad temprana y es la causa de enfermedades gastrointestinales como gastritis crónica, úlcera peptídica y duodenal. Al mismo tiempo, trae un riesgo de cáncer gástrico (incluido el linfoma). Debido a que la transmisión de *H. pylori* aún no está totalmente esclarecida, son aceptadas las vías oral-fecal y oral-oral.

Debido al aumento de la adquisición de reptiles como mascotas como lo son las tortugas (*Trachemys elegans*) y ante los estudios que la señalan como un probable foco de infección por ser portadores innatos de *Salmonella* sp (entre otros organismos) y dado que no ha evaluado la repercusión que podría traer a la salud de los humanos, en este trabajo se analizó el agua donde se mantienen las tortugas domésticas, ya que podría representarse como un vehículo para adquirir *H. pylori*: durante la manipulación del agua o bien el lavado de las peceras, generando de esta forma una zoonosis al estar en contacto directo o indirecto con el agua contaminada con *H. pylori*. El problema planteado radica en la falta de información sobre los cuidados higiénicos adecuados que se deben tener, cuando se cuenta con animales como mascotas.

4. Justificación

Diversos estudios han reportado el aislamiento de *H. pylori* desde la mucosa gástrica inflamada de diversos animales domésticos, aumentando las posibilidades de que exista una transmisión zoonótica desde los animales, que están en contacto directo con los humanos. Se ha demostrado la presencia de bacterias espirales mediante microscopía infiriendo a *H. pylori*.

En los zoológicos se han detectado animales colonizados con una amplia gama de diferentes especies del género *Helicobacter* sp. También se ha encontrado esta bacteria en el aparato digestivo, hígado y vesícula biliar en perros de diferentes edades y de ambos sexos.

En la actualidad, se conoce que *Helicobacter* sp se aloja en el estómago de animales domésticos y de compañía. En un estudio se encontró que el 70.3% de los pacientes que tuvieron contacto con uno o más animales, tenían infección concomitante por *H. pylori*. De ahí que sea de gran importancia este estudio debido a que la bacteria causa gastritis crónica en la mitad de la población mundial, además de ser el agente etiológico del 95% de las úlceras duodenales, el 70% de la úlceras gástricas y tiene un papel relevante en el 60% de los casos de cáncer gástrico distal, así como su asociación con el linfoma de la mucosa gástrica tipo MALT.

Hasta el momento no se tienen muchos datos en relación a la presencia de *H. pylori* en tortugas domésticas, por ello, este estudio es importante para poner en evidencia que la manipulación inadecuada del agua de tortugas podría representar un foco de infección para la población que tiene tortugas como mascotas.

5. Hipótesis.

H_0 = El agua de peceras de tortugas domésticas está contaminada con la bacteria *H. pylori*.

H_1 = El agua de peceras de tortugas domésticas no está contaminada con la bacteria *H. pylori*.

6. Objetivos

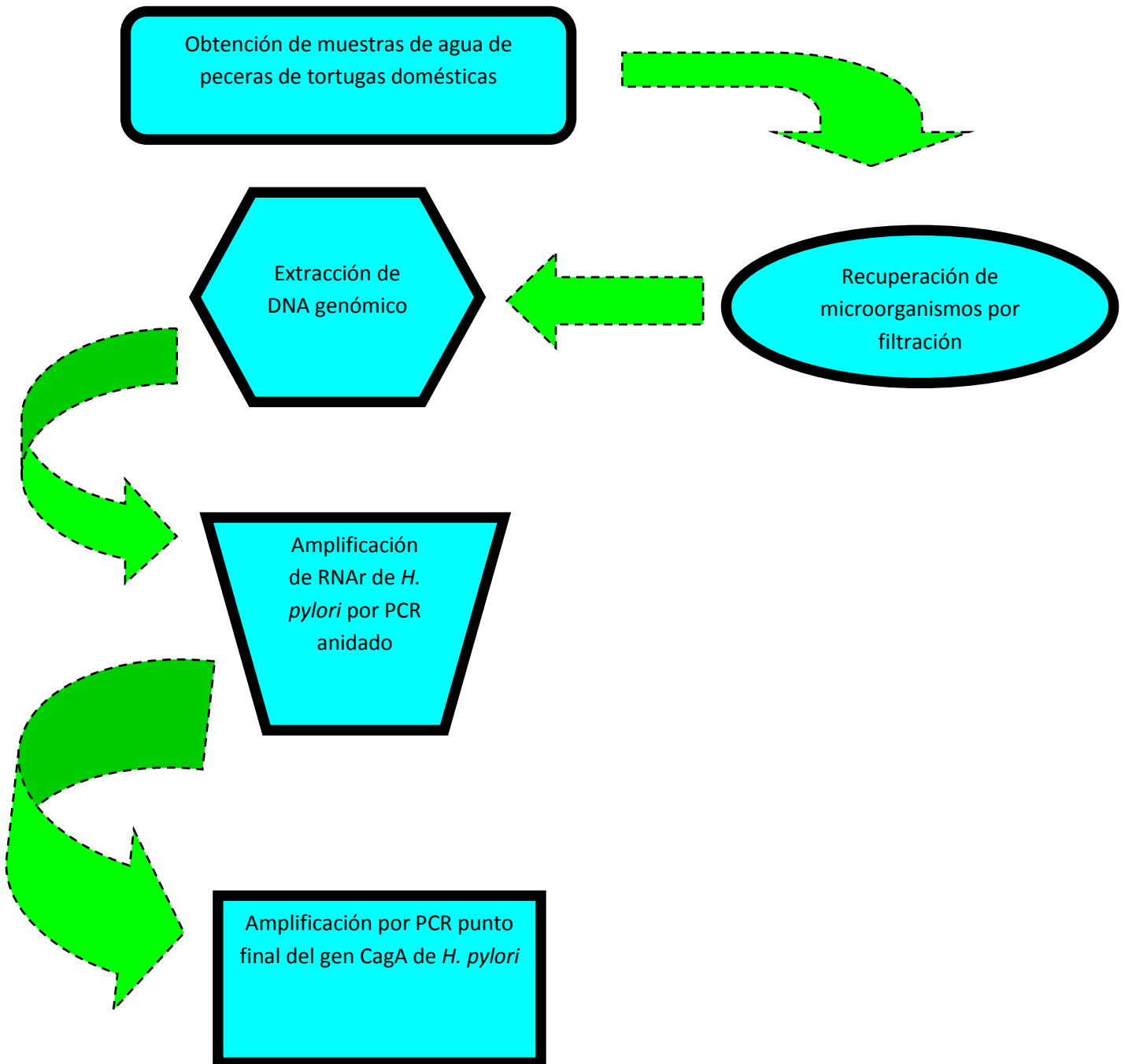
Objetivo general:

Evaluar la posible presencia de *H. pylori* en el agua de peceras de tortugas domésticas.

Objetivos particulares:

- 1) Recuperar e identificar los microorganismos presentes a partir de muestras de agua recolectadas.
- 2) Localización del gen *16S RNAr* de *H. pylori* mediante PCR anidado.
- 3) Identificar el gen *cagA* a partir de las muestras de agua que resulten positivas para *H. pylori*.

7. Esquema de trabajo



8. Material y métodos

8.1. Material biológico

Se utilizaron 20 muestras de agua, provenientes de peceras de tortugas domésticas (*Trachemys scripta elegans*), recolectadas durante un periodo de diciembre 2013 a mayo 2014. Para controlar el tiempo de exposición del reptil en el agua se seleccionó el agua que tuvo una semana sin cambiar. También se tomaron muestras del agua que le fue colocada a la mascota. En cada caso se aplicó un cuestionario a los dueños de las tortugas relacionado con las medidas sanitarias que las personas tienen con sus mascotas.

8.2. Selección de los sitios de monitoreo

Los sitios para el monitoreo del agua fueron seleccionados al azar, en diferentes colonias de la ciudad de Puebla. Para ello, se buscaron personas que tuvieran en sus hogares tortugas domésticas como mascotas y que estuvieran de acuerdo en proporcionar muestras de agua para ser estudiadas en el laboratorio, se tomaron en cuenta peceras de vidrio y contenedores de plástico (tinas o cubetas), además se cuidó que el agua de las muestras fuera exclusiva de tortugas.

8.3. Recolección de agua

Una vez seleccionados los sitios de monitoreo, se procedió a la recolección de las muestras de agua. Para ello, se recolectaron 900 ml de agua en frascos de polipropileno estériles. Para eliminar el excremento y residuos alimenticios, el agua fue filtrada con ayuda de papel filtro estéril. El agua se llevó al laboratorio para su análisis en un periodo no mayor a 2 horas. 1 mL de la muestra se tomó para su cultivo en agar soya tripticaseína (TSA), incubando a 37°C durante 24 horas. De igual forma, se colocó 1 mL de agua en un tubo conteniendo 5 mL de caldo de urea estéril y se incubó a 37°C durante 24 a 48 horas. Como control, se utilizaron 300 mL de agua que normalmente se emplea para mantener al reptil.

8.4. Recuperación de los microorganismos

Para recuperar los microorganismos presentes en el agua de las peceras, se realizó una filtración a vacío utilizando 500 mL de agua y haciéndolos pasar por membranas de celulosa con diámetro de poro de 0.22 μm estériles. Las membranas fueron colocadas en tubos cónicos estériles de 50 mL, y se le agregaron 8 mL de solución amortiguadora Tris-EDTA (50/20 mM). El producto se distribuyó en alícuotas de 0.5 mL, que se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior análisis. Luego se procedió a la extracción de DNA genómico.

8.5. Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA genómico se realizó utilizando el método de purificación con proteinasa K y fenol-cloroformo-álcohol isoamílico descrito por Mazari (2001). Así una vez recolectada, el agua de las peceras fue filtrada en membranas de 0.45 μm , luego se agregaron 8 mL de solución de Tris-EDTA para lavar la membrana y se dejó reposar por un día. Se tomó 1 mL de la solución anterior y se centrifugó a 10,000 r.p.m. durante 10 min; la pastilla se resuspendió en 500 μL de Tris-EDTA y se adicionaron 3 μL de proteínaasa K (200 mg/mL) y 50 μL de SDS (10%). Luego se incubó durante 1 hora a 37°C ; la fenolización se realizó agregando 100 μL de fenol cloroformo alcohol isoamílico mezclando por 2 minutos, luego se centrifugó a 13200 rpm y el sobrenadante se mezcló con 200 μL de cloroformo, se repitió el centrifugado por 5 minutos a 13200 r.p.m. para luego recuperar 60 μL de sobrenadante y agregarle 1/10 de acetato de sodio y 7/10 de isopropanol, a la mezcla resultante se centrifugó por 20 minutos a 13200 r.p.m. y se obtuvo un pellet que se lavó con 200 μL de etanol al 70% (por dos ocasiones) y posteriormente se centrifugó a 12000 rpm; una vez secados los alcoholes el pellet se suspendió en 50 μL de agua “pisa” para su cuantificación.

8.6. Cuantificación de DNA

Para determinar la concentración de DNA obtenido a partir de cada muestra de agua, se empleó el método espectrofotométrico (basado en la absorbancia de

los ácidos nucleicos a una $\lambda=260$ nm. Como blanco se usó agua bidestilada y se tomaron 2 μL de cada muestra, disolviendo en 98 μL de agua bidestilada (obteniendo un factor de dilución 2/100). La concentración de DNA fue calculada utilizando la siguiente relación:

$$[\text{DNA}_m] = \text{Abs}_{260\text{nm}} \cdot (50\text{ng}/\mu\text{l}) \cdot (100/2)$$

Además se calculó la relación $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$ para valorar la pureza de los ácidos nucleicos.

8.7. PCR del gen *16S RNAr*

Para la detección molecular del gen *16S RNAr* de *H. pylori* a partir de muestras de agua, se realizó una PCR anidada descrita por Mazari (2001). Para ello, se utilizaron los oligonucleótidos iniciadores Hp1, Hp2 y Hp3 dirigidos para la búsqueda de la región *16S RNAr* (con un límite de detección de 0.01 pg de DNA). En la Tabla 4 se muestran las secuencias para cada iniciador.

Tabla 4. Secuencias de los iniciadores Hp1, Hp2 y Hp3.

Región blanco, posición de los nucleótidos y tamaño de los amplificadores	Nombre de los iniciadores y sus secuencias
16S RNAr	Hp1, 5'-CTGGAGACTAAGCCCTCC-3'
Nt 407-853, 446 pb	Hp3, 5'-AGGATCAAGGTTAAGGATT-3'
Nt 635-744, 109 pb	Hp2, 5'-ATTACTGACGCTGATTGTGC-3'

Tomado: Base datos Gen Bank.

Para la primera reacción se utilizaron los iniciadores Hp1 y Hp3, usando 5 μL de solución de templado de DNA ajustado a 30 ciclos. La segunda amplificación se realizó empleando 1 μL del producto de la primera amplificación y Hp2. Se agregaron 18.25 μL de agua bidestilada, 2.5 μL de solución amortiguadora 10X, 1.25 μL de cloruro de magnesio, 0.5 μL de cada

iniciador y 1 μ L de los deoxinucleótidos, así como 0.3 μ L de Taq polimerasa ajustando a 25 ciclos.

Los perfiles de temperatura y tiempo que fueron utilizados se muestran en las Tablas 5 y 6.

Tabla 5. Perfil térmico para la primera amplificación del gen *16S RNAr* (iniciadores Hp1 y Hp3).

Programa	Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización Inicial	94°C	4min	1
2	Desnaturalización	94°C	45s	
2	Alineamiento	60°C	45s	30
2	Extensión	72°C	45s	
3	Extensión final	72°C	7min	1

Tabla 6. Perfil térmico de la segunda amplificación del gen *16S RNAr* (iniciadores Hp1y Hp2).

Programa	Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización inicial	94°C	4 min	1
2	Desnaturalización	94°C	45s	
2	Alineamiento	60°C	45s	25
2	Extensión	72°C	45 s	
3	Extensión final	72°C	7 min	1

8.8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final del gen *cagA*

Las muestras de agua que resultaron positivas al gen *16S RNAr* de *H. pylori*, fueron analizadas para detectar el gen *cagA*, localizado en el extremo 3' de la isla de patogenicidad *cag-PAI*. Esta región genética se amplifica por PCR punto final utilizando los iniciadores descritos por Lage *et al.*, (1995), con las especificaciones que se indican en la Tabla 7.

Tabla 7. Iniciadores utilizados para la identificación del gen *cagA*.

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Tamaño de amplicón
<i>cagA1</i>	AATACACCAACGCCTCCAAG	400 pb
<i>cagA2</i>	TTGTTGCCGCTTTTGCTCTC	

Tomado: base datos Gen Bank (**NCTC 11637 y ATCC 53726**).

Se eligió este par de iniciadores basándose en el análisis de tres principales secuencias del gen *cagA* pertenecientes a las cepas de referencia de *H. pylori* 26695, NCTC 11637 y ATCC 53726, amplificando una región intermedia del gen de 400 pb, que es común en la mayoría de las cepas de *H. pylori*. Los iniciadores *cagA1* y *cagA2* presentaron una gran sensibilidad, ya que son capaces de detectar hasta 3.6 fg de DNA de *H. pylori* (**Lage *et al.*, 1995**).

Para la reacción de PCR punto final se utilizaran 5 µL de DNA templado y se añadieron 25 µL de la mezcla de reacción la cual contenía: 18.25 µL de agua desionizada, 2.5 µL de solución amortiguadora 10X, 1.25 µL de MgCl₂, 0.5 µL de cada primer *cagA1* y *cagA2*, y finalmente 0.3 µL de Taq DNA polimerasa (Invitrogen). Se utilizó el siguiente perfil térmico:

Programa	Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización Inicial	94°C	4min	1
2	Desnaturalización	94°C	45s	
2	Alineamiento	60°C	45s	35
2	Extensión	72°C	45s	
3	Extensión final	72°C	7min	1

8.9. Análisis de productos de PCR

Una vez obtenidos los productos de PCR, esos fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.0 y 1.5% (m/v); teñido con bromuro de etidio. El gel fue corrido durante una hora a 75 voltios. Se utilizaron los marcadores de peso molecular GeneRuler 1kb ladder y 100 pb ladder de Fermentans Co. Las bandas de DNA fueron visualizadas con luz U.V.

El tamaño esperado para los productos del PCR- anidado, en los cuales se usaron los iniciadores Hp1-Hp3 fue estimado en 446 pb, amplificando la región 5'CTGGAGACTAAG CCCTCC-3' y 5-AGGATCAAGGTTAAGGATT-3'. Para el tamaño del segundo producto de PCR fue de 109pb, amplificando la región 5'CTGGAGACT A AGCCCTCC-3' y 5'-ATTACTGACGCTGATTGTGC-3'. El tamaño esperado para los productos del PCR punto final para el gen *cagA*, fue 400 pb (usando los iniciadores *cagA1* y *cagA2*), amplificando la región 5'-AATACACCAACGCCTCCAAG-3' y 5'-TTGTTGCCGCTTTTGCTCTC-3.'

9. Resultados

En el presente estudio, los sitios de monitoreo de agua de peceras de tortugas fueron al azar debido a que se contactaron a las personas que poseían tortugas, el agua fue exclusiva de estos reptiles y se tomaron en cuenta tanto peceras como contenedores de plástico o metal (tinajas y botes). En la Fig. 9 se muestran los sitios monitoreados ubicados en las diversas colonias de la ciudad de Puebla.

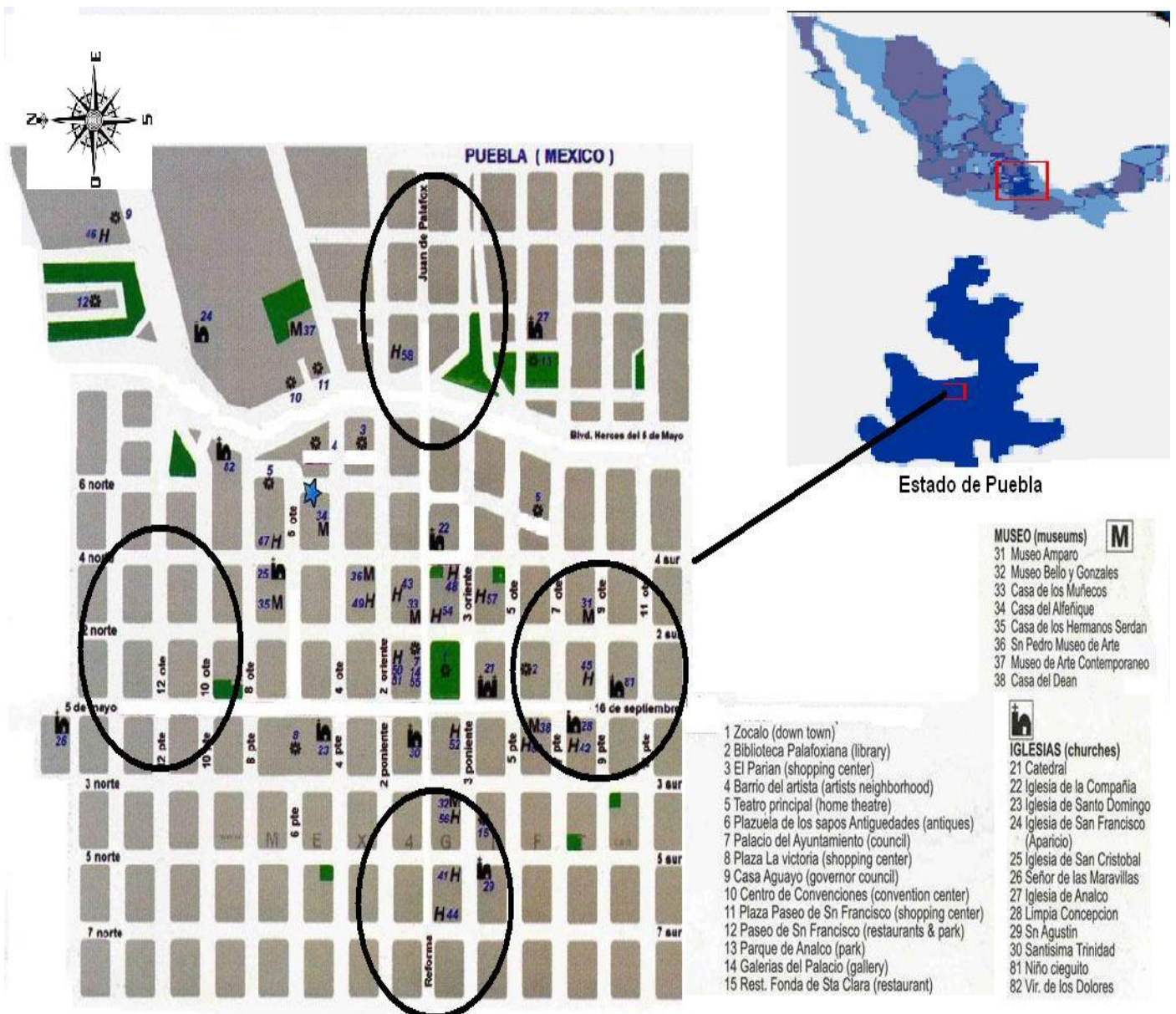


Fig. 9. Mapa de la ciudad de Puebla que muestra las zonas de donde se tomaron las muestras de agua analizadas.

9.1. Condiciones de mantenimiento y posible impacto de las tortugas domésticas.

A continuación se presentan los resultados obtenidos al practicar el cuestionario a los dueños de las tortugas. El primer punto considerado fue en relación a la procedencia del agua de las peceras. Los resultados obtenidos se registraron en la sección de anexos y se muestran en la Fig. 10.

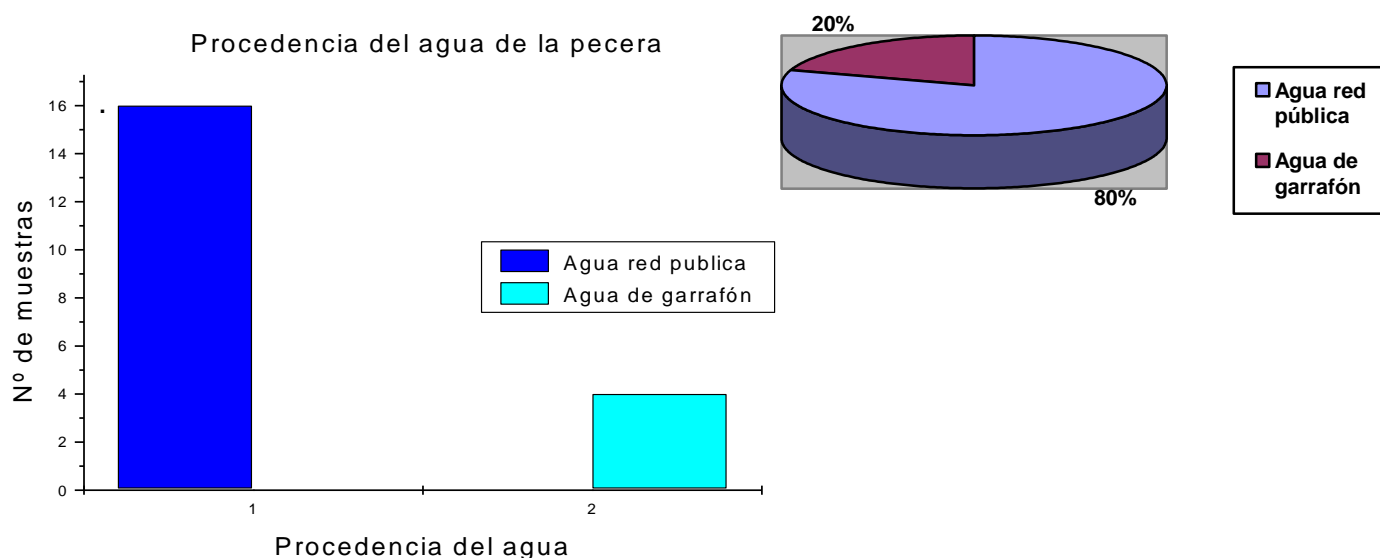


Fig. 10. Agua utilizada para mantener a las tortugas domésticas.

Como se puede observar en la Fig. 10, el 80% (16 personas) que poseen tortugas de este estudio, utilizan agua de la red municipal de Puebla para mantener a sus mascotas, mientras que el 20% restante (4 personas) lo hace con agua purificada de garrafón.

De acuerdo al cuestionario realizado se obtuvo un total de 18 casos (90%) que corresponde a la mayoría de las personas que realizan el recambio del agua de las peceras cada semana (ver Fig. 11). Nótese que sólo 2 personas (10%) lo hacen cada tercer día por la presencia de viscosidad o de lama (ver anexos).

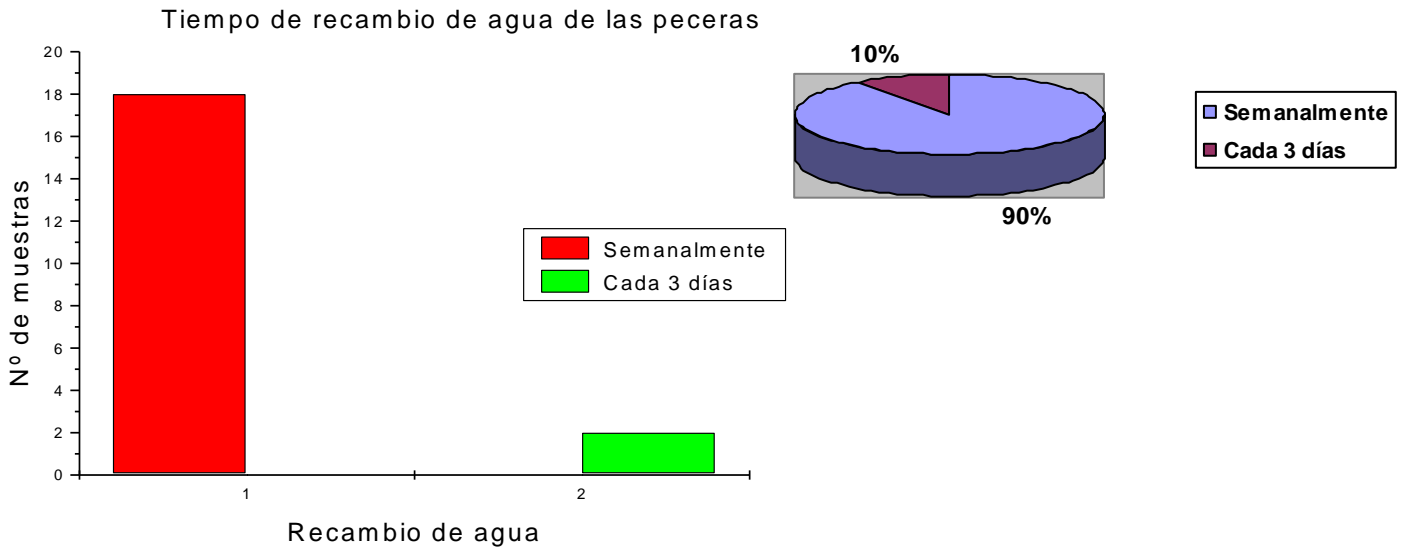


Fig. 11. Recambio de agua de las peceras de tortugas domésticas.

Al evaluar la frecuencia de lavado de las peceras se obtuvo que 19 personas (95%) de los dueños de las tortugas lo realizan cada semana, mientras que 1 persona (5%) lo hace cada tercer día (Fig. 12).

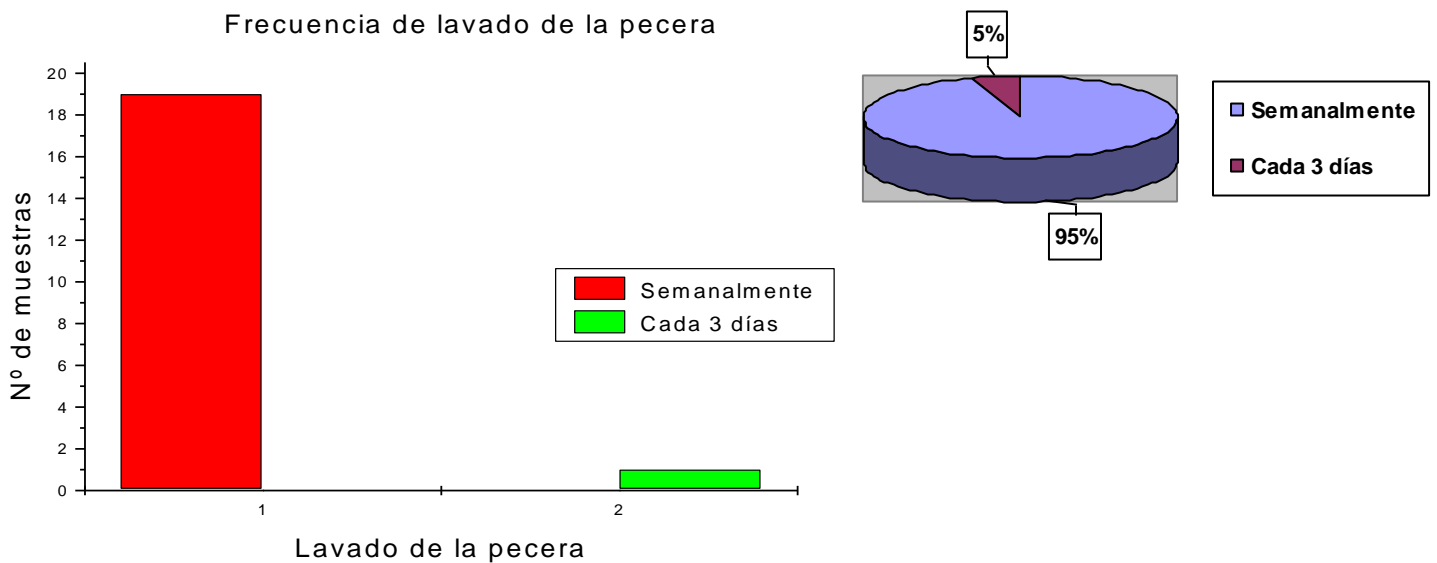


Fig. 12. Frecuencia de lavado de las peceras de tortugas domésticas.

Dado que mientras mas tiempo la mascota se encuentre sin recambio del agua es más probable que ésta esté contaminada. Por lo tanto, otro de los aspectos que se evaluó en el cuestionario fue la frecuencia con que se lava a las tortugas. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig.13.

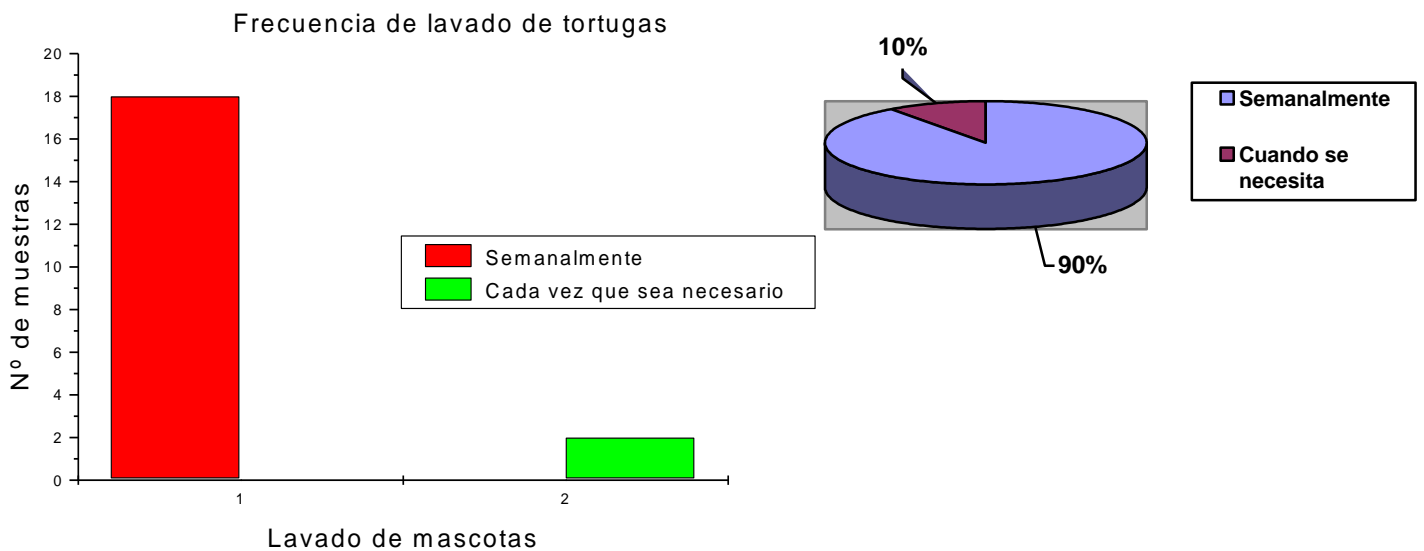


Fig. 13. Frecuencia de lavado de las tortugas domésticas.

Como se puede observar en la figura anterior la mayoría de las personas tiende a realizar el lavado de las peceras cada semana, mientras que solo dos personas encuestadas lo hacen cada 3 días.

Para descartar la presencia de microorganismos por otros factores ambientales, como ejemplo la mala manipulación por parte de los dueños hacia las mascotas, en el cuestionario fueron considerados otros aspectos.

- Asoleado: La mascota se expone a otros factores ambientales como lo son el aire, el sol y el suelo que también son vectores para la adquisición de otras bacterias.
- Enfermedades de las mascotas: En el cuestionario se les pregunto si las mascotas tenían alguna enfermedad, ya que esto podría ser importante a la hora de buscar o encontrar a alguna bacteria en específico.

Los resultados obtenidos al evaluar tanto el asoleado como la presencia de enfermedades presentados en la Fig. 14a nos indica que 16 de las personas prefieren asolear a sus mascotas al aire libre y en cualquier zona (80%), mientras que sólo dos (10%) lo hacen en el jardín. Sin embargo al analizar el estado de salud de las mascotas (Fig 14b) nos encontramos que 16 de los encuestados, es decir el 80% no presentaron enfermedades reportadas,

mientras que solo en dos casos (10%) si presentaron alguna manifestación en los ojos.

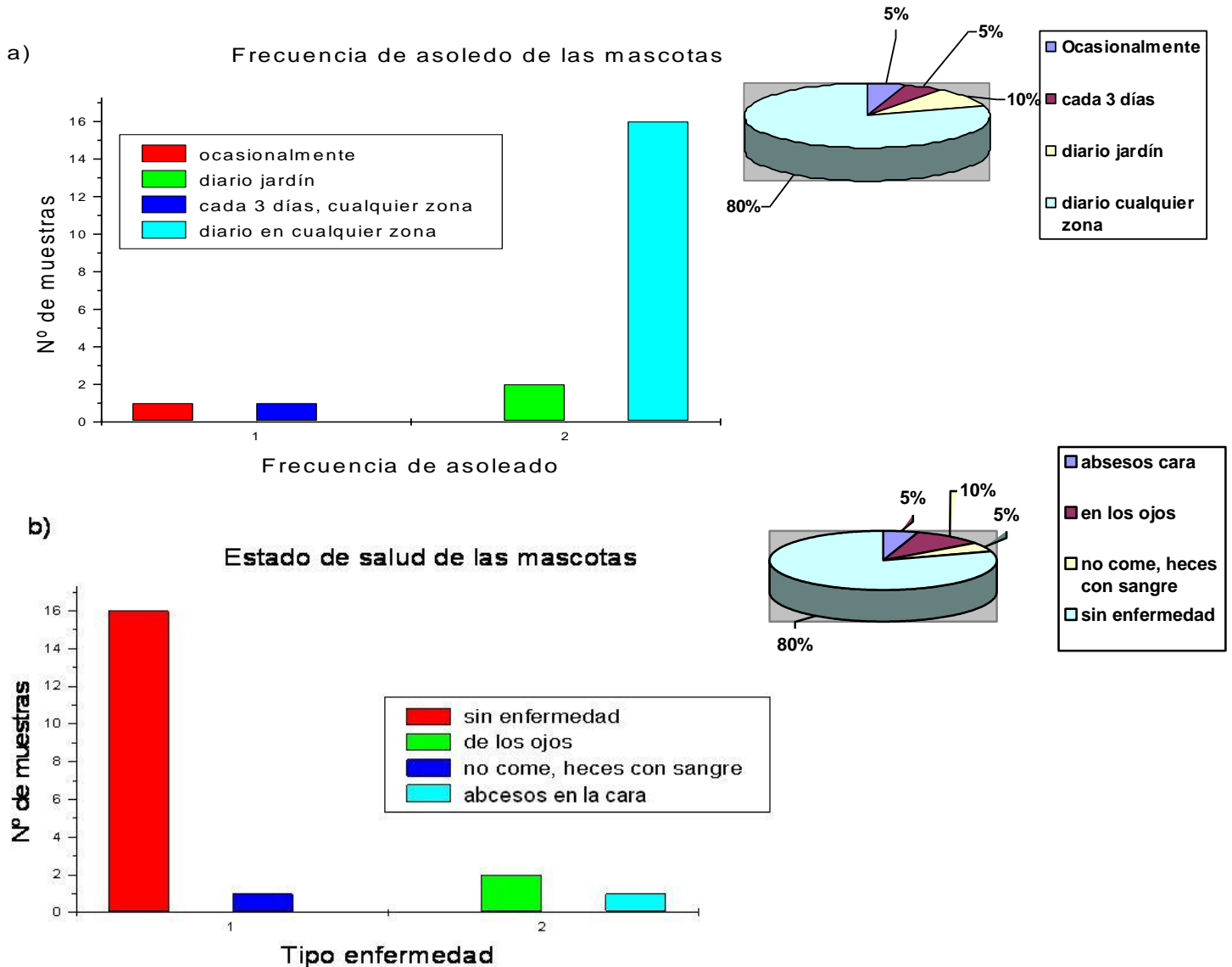


Fig. 14. Exposición al medio ambiente y estado de salud de las tortugas domésticas. a). Frecuencia del asoleado de las tortugas; b): Observaciones hechas en las tortugas.

9.2. Relación de estado de salud mascota-dueño

Dado que en el apartado anterior si se encontraron mascotas enfermas, otra de las preguntas que se realizó a los dueños fue acerca de la presencia de enfermedades en las personas que manejan a las mascotas, haciendo énfasis en la presencia de gastritis.

Como se muestra en la Fig. 15 el 80% de los dueños de las tortugas (16 casos) se encontraron sanos, sin embargo es importante resaltar que el 10% de los dueños (2 niños) si presentaron enfermedades gástricas. En la Fig. 15 se encuentra representado otros 2 casos (10%) correspondiente a enfermedades de otras fuentes ajenas al manejo de las mascotas (ver Anexos).

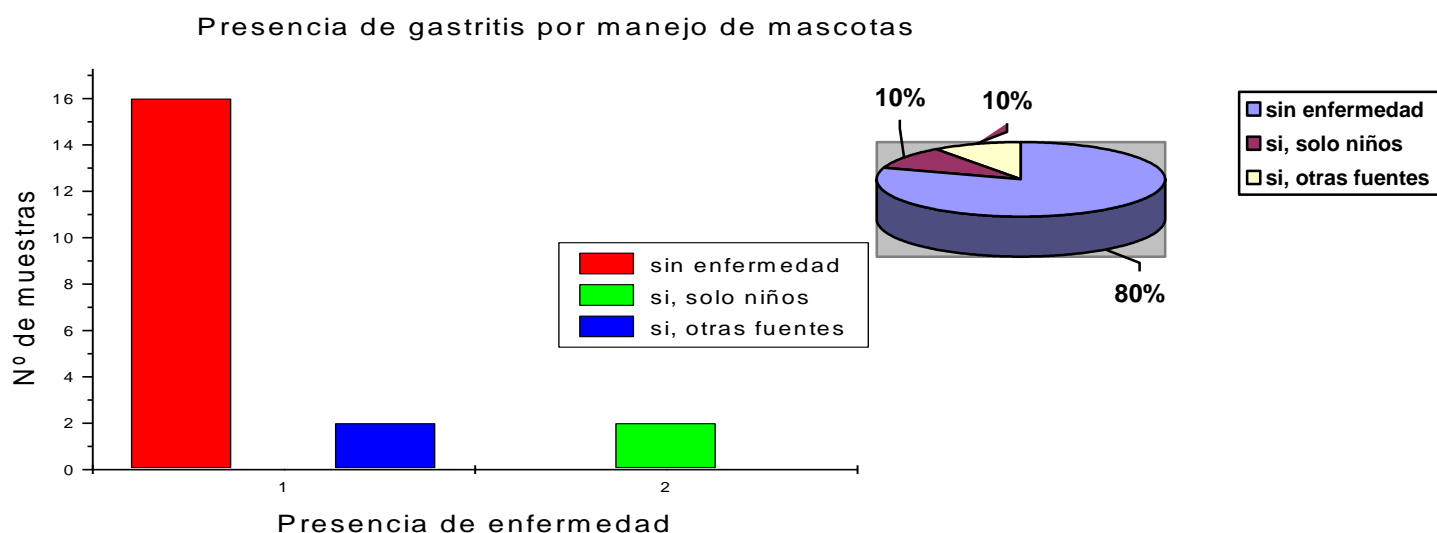


Fig. 15. Presencia de gastritis por manejo de tortugas domésticas.

9.3. Identificación de bacterias a partir de las muestras del agua que se usa para las tortugas domésticas

Una vez seleccionados los sitios de monitoreo se recolectaron 300 mL del agua que se le coloca normalmente a la pecera para mantener al reptil. Posterior al cultivo en placas de TSA con 1 mL de muestra se procedió al análisis microbiológico de la misma (Fig. 16).

Al realizar el cultivo en medio TSA (ver en la Fig. 16), sólo las muestras 4, 5, 6, 9 y 10 de las 20 que se tomaron resultaron positivas al crecimiento bacteriano, mientras que las demás resultaron negativas.

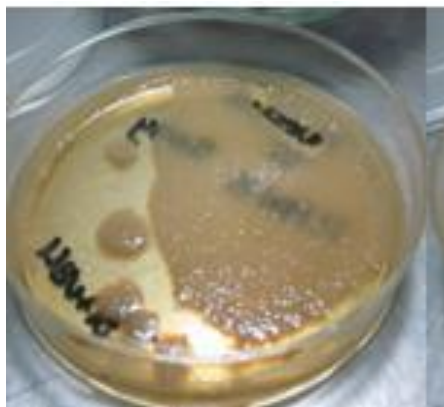


Fig.16. Crecimiento bacteriano en medio TSA (muestras 4, 5, 6, 9 y 10) de agua analizada que se les coloca a las tortugas que resultaron positivas.

Para identificar a las bacterias presentes en las muestras positivas se realizaron diferentes pruebas bioquímicas (tinción de Gram, Mc Conkey, MIO, LIA, TSI, citrato y prueba de urea). Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Pruebas bioquímicas de identificación bacteriana en muestras de agua.

Muestra	Gram	Mc Conkey	MIO	LIA	TSI	Citrato	Urea	Bacteria
4	-	+	+++	+	-	-	-	<i>E.coli</i>
5	-	+	+++	+	-	-	-	<i>E.coli</i>
6	-	+	+++	+	-	-	-	<i>E.coli</i>
9	-	+	+++	+	-	-	-	<i>E.coli</i>
10	-	+	+++	+	-	-	-	<i>E.coli</i>

Como se pudo observar en la Fig. 16, el microorganismo identificado en todos los casos fue *E. coli*.

9.4. Identificación de bacterias del agua de peceras de tortugas domésticas

Luego, se procedió a la recolección de 900 mL de agua procedente de peceras con tortugas domésticas, en frascos de polipropileno estériles para analizarla y se buscaron bacterias. Para ello, se tomó 1 mL de la muestra de agua y se

realizó un cultivo en placas de TSA incubando a 37 °C durante 24 horas. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 17. Como se puede observar de las 20 muestras de agua analizadas, 12 resultaron con crecimiento bacteriano.

Posteriormente, se procedió a la identificación de las bacterias aisladas utilizando diferentes pruebas bioquímicas (tinción de Gram, Mc Conkey, MIO, LIA, TSI, citrato y prueba de urea). Los resultados se muestran en la Tabla 9.

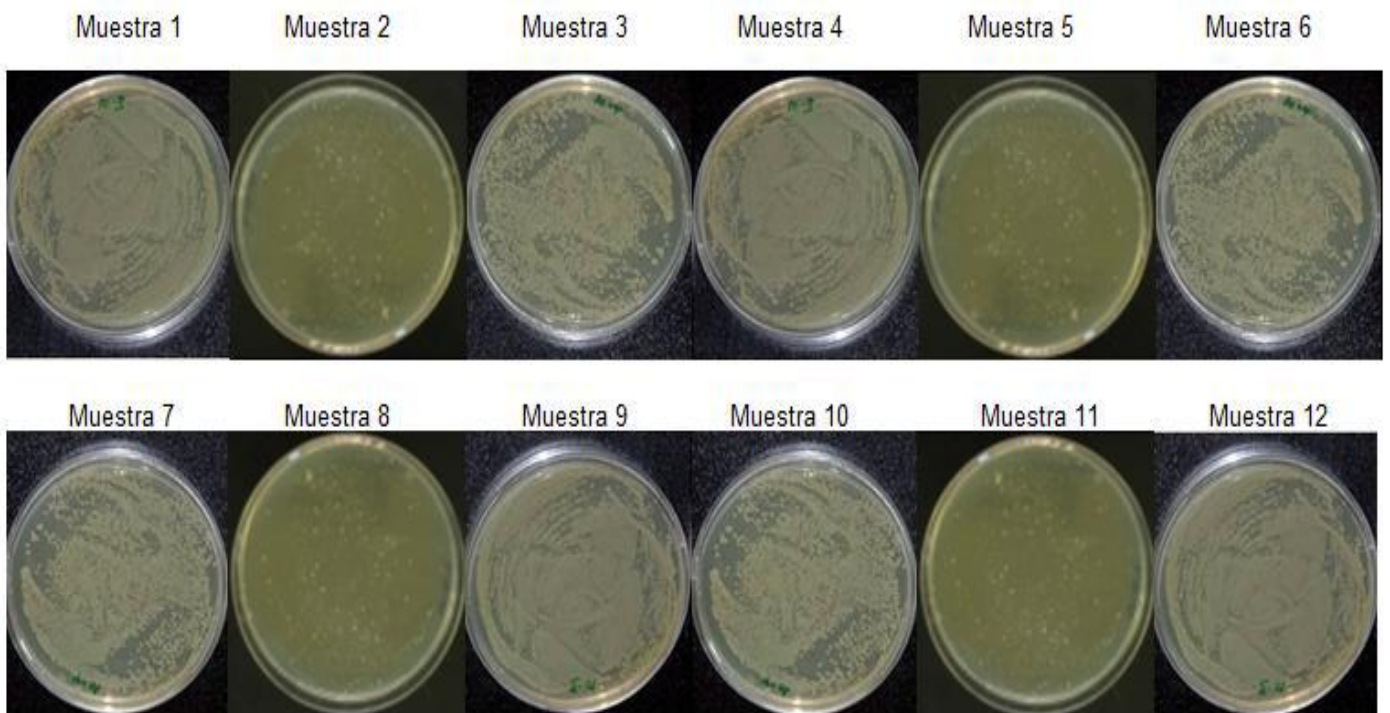


Fig.17. Crecimiento bacteriano en 12 de 20 muestras del agua analizadas en placas de TSA utilizando 1 mL de agua de peceras de tortugas.

Los resultados obtenidos al realizar las pruebas bioquímicas indicaron la presencia de diferentes bacterias como *Salmonella* sp., *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *E.coli* y *Proteus*, todas ellas Gram negativas y de importancia médica (Tabla 9).

Tabla 9. Pruebas bioquímicas de identificación practicada en el agua de las peceras de tortugas domésticas.

Muestra	Gram	Mc Conkey	MIO	LIA	TSI	Citrato	Bacteria
1	-	-	+--+	+	+	+	<i>Salmonella sp.</i>
	-	+	---	+	-	-	<i>Klebsiella pneumoniae.</i>
2	-	-	+--	+	+	-	<i>Salmonella typhi.</i>
3	-	+	---	+	-	-	<i>Klebsiella pneumoniae.</i>
4	-	-	+--+	+	+	+	<i>Salmonella sp.</i>
5	-	+	+++	+	-	-	<i>E.coli.</i>
6	-	-	+--+	+	+	+	<i>Salmonella sp.</i>
7	-	-	+--	+	+	-	<i>Salmonella typhi.</i>
8	-	-	+--	+	+	-	<i>Salmonella typhi.</i>
9	-	-	+--+	-	+	-	<i>Proteus</i>
10	-	+	+++	+	-	-	<i>E.coli</i>
11	-	-	+--+	+	+	+	<i>Salmonella sp.</i>
	-	+	+++	+	-	-	<i>E.coli</i>
12	-	+	+++	+	-	-	<i>E.coli</i>

9.5. Concentración de microorganismos a partir de las muestras de agua

Teniendo las muestras de agua procedentes de las peceras de las tortugas domésticas, se filtraron a vacío 500 mL de agua empleando una membrana de celulosa con un diámetro de poro de 0.22 μm (Fig. 18).

Las membranas fueron colocadas en tubos cónicos estériles conteniendo 8 mL de Tris-EDTA (50:20 mM) y se pusieron a refrigeración durante una noche. Luego, las membranas fueron lavadas con una solución varias veces y se procedió a alicuotar el líquido en volúmenes de 1.4 mL. Este material fue congelado a -70°C hasta su uso. Ese mismo procedimiento se aplicó a muestras de agua que se utiliza para mantener a las tortugas domésticas.

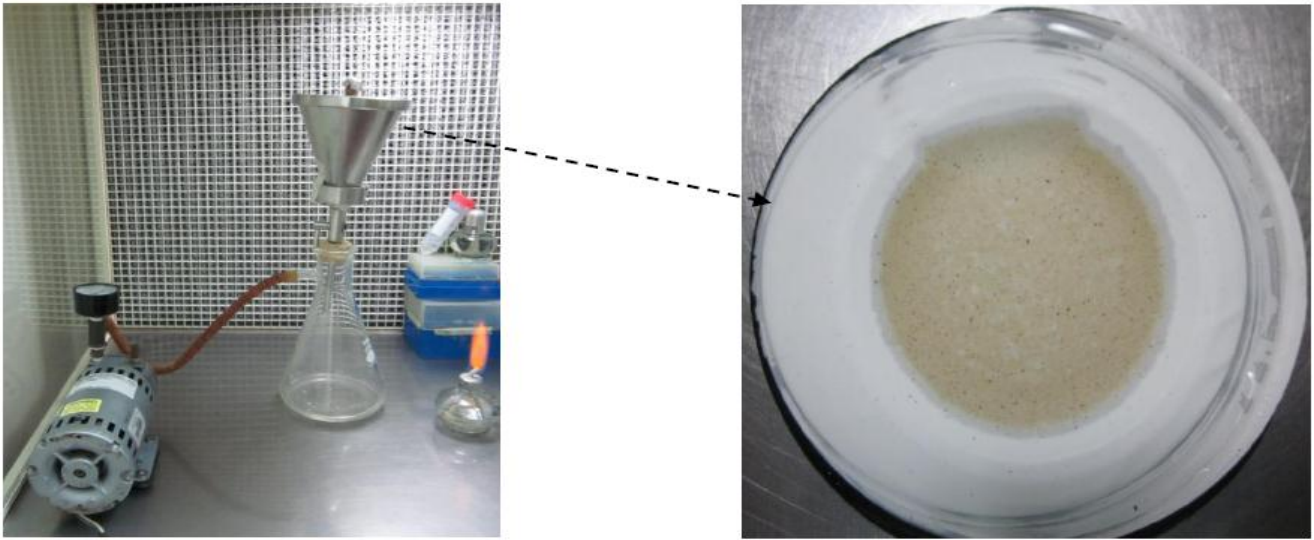


Fig. 18. Sistema de filtración sometido a vacío y membrana de acetato de celulosa de 0.22 μm .

9.6. Determinación de DNA genómico

El DNA genómico fue extraído a partir de las alícuotas de 0.5 mL descritas anteriormente, para lo cual se utilizó el método de purificación con proteinasa K y fenol-cloroformo-alcohol isoamílico descrito por Mazari *et al.*, (2001).

Una vez obtenido el DNA genómico, se procedió a determinar su concentración por un método espectrofotométrico, tanto para las muestras de agua que se les colocan a las tortugas, como el agua proveniente de la mantenimiento de las mismas. Los resultados correspondientes a la cuantificación de DNA se muestran en la Tabla 11 y Tabla 12. También se presenta la pureza de DNA de cada muestra que fue analizada.

Tabla 11. Concentración y pureza del DNA genómico para cada muestra del agua que se le coloca a las peceras.

Muestra (*)	260 nm	280 nm	Concentración DNA ng/μL	Pureza Ab^{260/280}
4	0.100	0.077	250	1.298
5	0.050	0.022	125	2.272
6	0.062	0.045	155	1.377
9	0.048	0.039	120	1.230
10	0.065	0.062	162.5	1.048

(*) Muestras positivas a la presencia de bacterias.

Tabla 12. Concentración y pureza del DNA genómico para cada muestra de agua de peceras de tortugas domésticas.

Muestra	260 nm	280 nm	Concentración DNA ng/μL	Pureza Ab^{260/280}
1	0.090	0.085	225	1.058
2	0.306	0.295	765	1.037
3	0.082	0.079	295	1.037
4	0.250	0.245	625	1.020
5	0.065	0.060	162.5	1.083
6	0.125	0.123	312.5	1.016
7	0.080	0.080	200	1
8	0.128	0.125	320	1.024
9	0.166	0.165	415	1.006
10	0.165	0.165	412.5	1
11	0.094	0.090	235	1.040
12	0.285	0.277	712.5	1.028

Como se puede observar en las Tablas 11 y 12, las concentraciones de DNA obtenidas proporcionaron evidencia de la presencia de microorganismos en las

muestras de agua analizadas; además la concentración de DNA indicó que se podía continuar para la realización de la PCR correspondiente.

9.7. Análisis de *H. pylori* por PCR

Una vez extraído el DNA genómico se procedió a realizar la detección el gen *16S RNAr* de *H. pylori* empleando un PCR anidado. Para ello, se utilizaron las secuencias nucleotídicas indicadas en la sección de Materiales y métodos.

El método de PCR anidado empleado en este estudio amplificó dos diferentes regiones dentro del gen *16S RNAr*. En la primera reacción, se utilizaron los iniciadores Hp1 y Hp3, con los cuales se amplificó un fragmento de 446 pb correspondiente a una región de baja homología con campilobacterias. En la segunda amplificación se utilizaron los oligonucleótidos Hp1 y Hp2, que otorgaron mayor especificidad para *H. pylori*, generando un amplicón de 109 pb.

Como se describió anteriormente, estos fragmentos son importantes para determinar la presencia de *H. pylori* dentro de las muestras de agua que se les colocó a las peceras, para ello es que se procedió a identificar los oligonucleótidos correspondientes a cada reacción, estableciéndose así la presencia de *H. pylori*. En la Fig. 19 se muestra la secuencia completa del gen *16S RNAr* de *H. pylori* y se presentan las regiones que fueron flanqueadas por lo oligonucleótidos Hp1, Hp2 y Hp3 utilizados para llevar a cabo las amplificaciones correspondientes.

```

AGGAGGTGATCCAACCGCAGGTTACCTACGGTTACCTGTTACGACTTCACCCCAGTCGCTGTGTGTGC
CGTGGGCAGTAGCCAAT TTAGCATCCTGACT TAAGGCAAACACAACCTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGG
TACAAGACCCGGGAACGTAT TCACCGCAACATGGCTGATTTGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGCA
GGCGGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGTGAAGGTTGTTTGAAGATTGGCTCCACTTCGCAGTATTGCTC
TCTTTGTGCACCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTAGGCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCGTCCC
CACCTTCCTCCTCCT TACGGAGGCAGTATCCT TAGAGT TCTCAGCATGACCTGTAGCAACTAAG AAAGG
GGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCGTGCAGCACCG
TTTTCAAGTCTAGCAAGCCAGACACTCCACTAT T TCTAGCGGAT TCTCTCAATGTCAAGCCTAGGTAAG
GT TCT TCGTGTATCT TCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCTATTCCCTTTGAG
TTTTAATCT TGCGACCGTACTCCCCAGGCGGGATGCTTAATGCGTTAGCTGCATTACTGGAGAGACTAAG
                                                                                               Hp1
CCCTCCAACAAGTATGATCCATCGT TTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGT T TGCCCCAC
Hp1
GC TTTCGCGCAATCAGCGTCAGTAATGTTCCAGCAGGTCGCCCTCGCAATGAGTATTCCCTCTTGATCTCT
ACGGAT T T TACCCCTACACCAAGAAT TCCACCTACCTCTCCCACACTCTAGAATAGTAGTTTCAAATGCA
Hp2
GTTCTATGGT TAAGCCATAGGAT TTCACACCTGACTGACTATCCCGCCTACGCGCTCTTTACGCCAGTG
ATTCCGAGTAACGCTTGCACCCTCCGATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGTATTTCGT
TAGATACCGTCAT TATCT TCTCTAACAAAAGGAGT TTACAATCCTAAAACCTTCATCCTCCACGCGGCGT
                                                                                               Hp3
TGCTGCTTCAGGGTTTCCCCCATTGAGCAATATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGT
CTCAGTTCCAGTGTGTCCGT TCACCCTCTCAGGCCGGATACCCGTCATAGCCTTGTAAGCCATTACCTT
ACCAACAAGCTGATAGGACATAGGCTGATCTCT TAGCGATAAATCT TTCCCCCGTAGGGAGTATCTGGTA
TTAATCATCGT T TCCAATGGCTATCCCAAATAAGAGGCACATGACCTATGCGT TACTCACCCGTGCGCC
ACTAATCAGCACTCTAGCAAGCTAGAAGCT TCATCGT TCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGT
TCACTCTGAGCCAGGATCAAACCTCTCCATAAA

```

Fig. 19. Secuencia completa del gen *16S RNAr* en el genoma de *H. pylori* 26695. Las flechas indican las regiones flanqueadas por los iniciadores Hp1, Hp2 y Hp3.

Una vez realizada la detección del gen *16S RNAr* por PCR-anidado en las muestras del agua que le colocan a las peceras de las tortugas domésticas, se observó que de 5 muestras analizadas, sólo una muestra de agua mostró un producto de 109 pb (Fig. 20, carril 3; muestra 6).

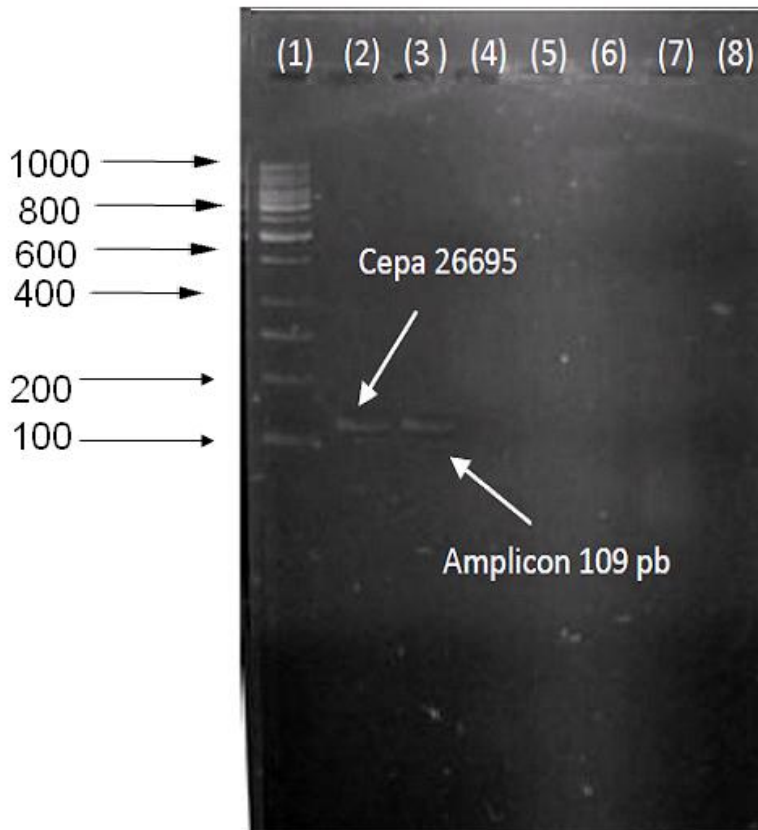


Fig. 20. Gel de agarosa al 1.5% con los productos de amplificación por PCR para el gen *16S rRNA* de *H. pylori* en agua que se les coloca a las tortugas. (1) Marcador 100 pb (Fermentans); (2) Control positivo (Cepa *H. pylori* 26695); (3) Muestra 6; (4) Muestra 5; (6) Muestra 4; (7) Muestra 9; (8) Muestra 10.

Así mismo, se realizó la detección del gen *16S RNAr* por PCR-anidado, para localizar la región genética de 109 pb de *H. pylori* en las muestras de agua de peceras de tortugas domésticas. En la Fig. 21 se muestran los resultados obtenidos.

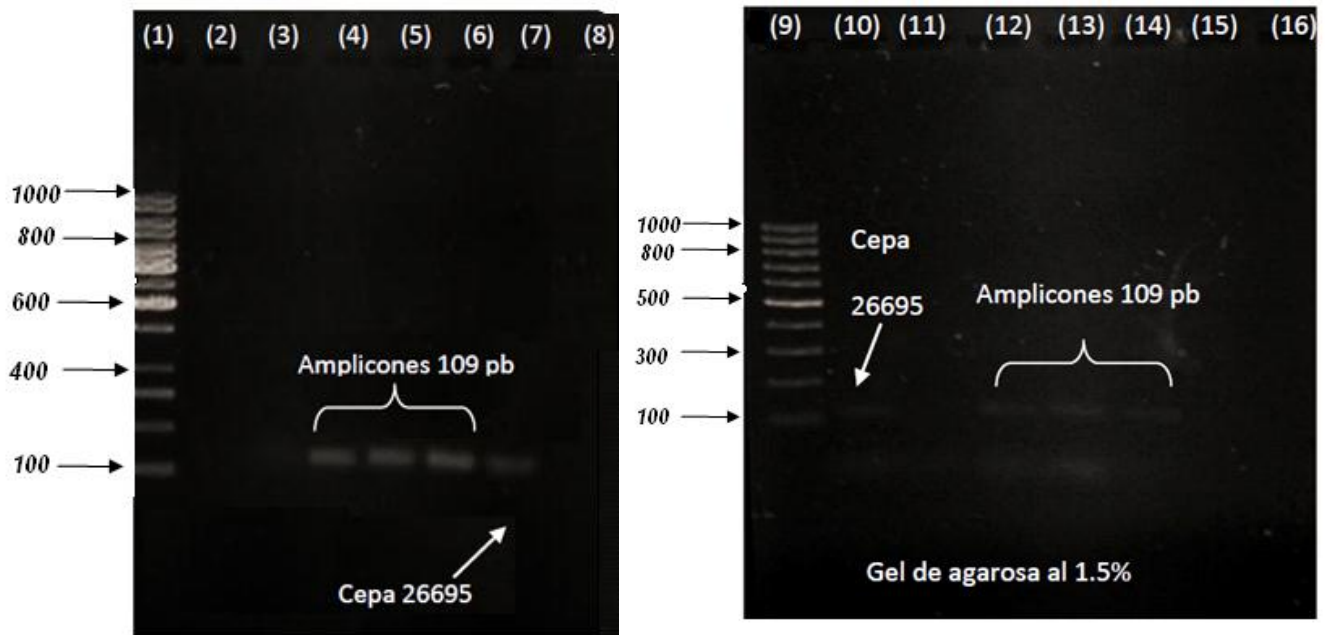


Fig.21. Gel de agarosa al 1.5% con los productos de amplificación de PCR en agua de peceras de tortugas. (1) Marcador 100 pb (Fermentans); (2) Muestra 4; (3) Muestra 5 ; (4) Muestra 1; (5) Muestra 2; (6) Muestra 3; (7) control positivo (cepa *H. pylori* 26695); (8) Control negativo; (9) Marcador 100pb (Fermentans); (10) Control positivo (cepa *H. pylori* 26695); (11) Muestra 9; (12) muestra 6; (13) Muestra 7; (14) Muestra 8; (15) Muestra 10; (16) Control negativo.

Como se puede observar en la Fig. 21 se encontraron amplicones de 109 pb en las muestras de agua analizadas, correspondientes a los carriles 4 (muestra 1), 5 (muestra 2), 6 (muestra 3), 12 (muestra 6), 13 (muestra 7) y 14 (muestra 8).

9.8. Búsqueda de gen *cagA* mediante PCR punto final

Para realizar la detección del gen *cagA* en las cepas de *H. pylori* encontradas en el agua de las peceras de tortugas domésticas, se utilizaron los iniciadores descritos por **Lage et al., (1995)** (ver Materiales y Métodos). Estos iniciadores identificaron una región consenso de 400 pb en la parte intermedia del gen, común para la mayoría de las cepas de referencia de *H. pylori*, incluidas la 26695, NCTC 11637 y ATCC 53726. Los resultados se muestran en la Fig. 24.

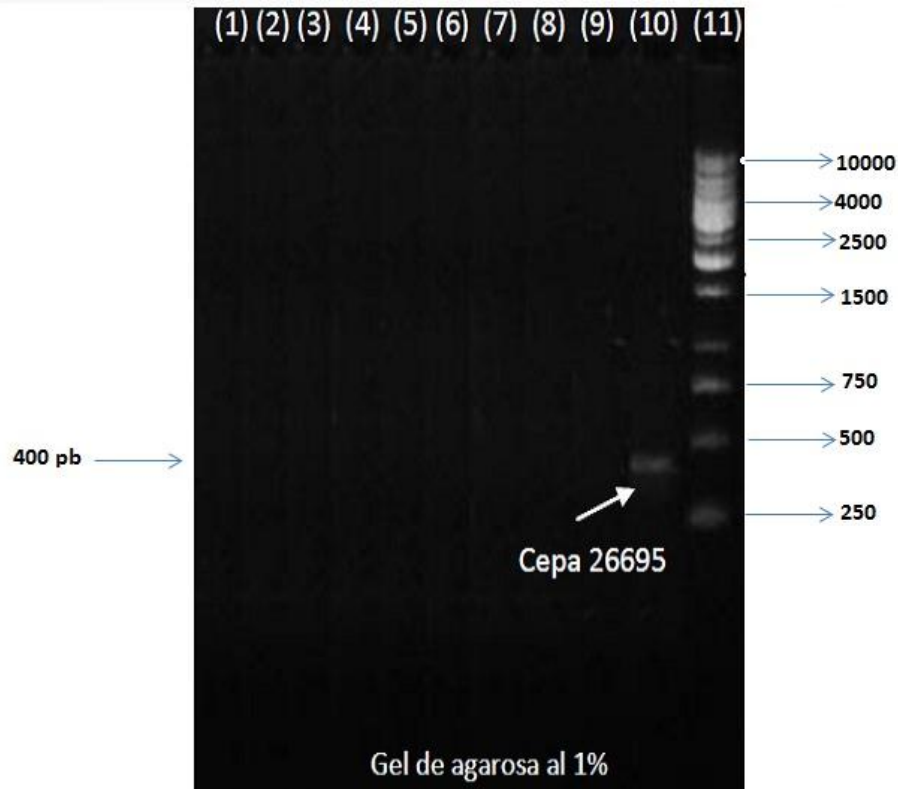


Fig. 22. Gel de agarosa al 1% buscando el gen *cagA* en muestras de agua de peceras de tortugas domésticas. (1) Muestra 1; (2) Muestra 2; (3) Muestra 3; (4) Muestra 6; (5) Muestra 7; (6) Muestra 8; (9) Agua bidestilada, (10) Control positivo (cepa *H. pylori* 26695); (11) Marcador 1 kb (Fermentans).

Como se observa en la Fig. 22 el PCR punto final para la detección del gen *cagA* en las muestras obtenidas de las peceras de tortugas domésticas no mostró la presencia de los amplificadores para 400 pb.

10. Discusión.

Antes de iniciar con el desarrollo experimental de este trabajo se realizó un cuestionario a las personas que proporcionaron sus muestras de agua provenientes de tortugas domésticas, ubicadas en diferentes lugares de la ciudad de Puebla. El cuestionario incluyó aspectos relacionados con la procedencia del agua, cuidados hacia la mascota, estado de salud de las mascotas y de sus dueños, con el objetivo de indagar aspectos importantes acerca del manejo y cuidado de las tortugas domésticas.

En este trabajo se manejaron dos variables importantes, por un lado el origen del agua para manutención de la mascota y por otro lado la frecuencia de enfermedades gástricas de los dueños a partir del manejo del reptil; al realizar el cuestionario se encontró que en su mayoría el agua de manutención en 16 de los casos de las tortugas domésticas procedía de la red pública (80%) y sólo 4 casos (20%) usaba agua de garrafón (Fig. 10).

México, al encontrarse como un país en vías de desarrollo, cuenta con limitaciones en los cuidados del agua, es por ello que en este trabajo, ante el aumento de enfermedades gastrointestinales, se realizó la detección de *H. pylori* en peceras de tortugas domésticas, pues se sabe que estos reptiles son considerados como mascotas. Por ello, cuando se cuestionó acerca de la salud de los dueños de las tortugas domésticas se pretendió saber si había padecimientos gástricos (como resultado del manejo directo de la mascota). Los resultados indicaron que tan sólo un 10% de las personas encuestadas (2 casos) sí presentaba padecimientos gástricos, lo cual tiene relación con lo reportado por **Carbone et al., (2005)** en donde se determinó que las enfermedades están relacionadas con el mal manejo de mascotas. Otro 10% presentó padecimientos no asociados al manejo de la mascota, mientras que el 80%, es decir 16 encuestados, no presentaron ningún padecimiento, lo que sugirió que la mayoría de las personas no se han enfermado por contacto directo con la mascota.

Como se describió anteriormente *H. pylori* es una bacteria Gram negativa asociada a trastornos en la mucosa gástrica. Es la causa de enfermedades gastrointestinales como gastritis crónica, úlcera peptídica y duodenal, además de ser un factor de riesgo en la etiología multifactorial del adenocarcinoma gástrico de tipo diferenciado y linfoma tipo MALT **(Carbone et al., 2005)**. Aunque en este estudio no se determinó la patogenicidad de *H. pylori* debido a que no se encontró expresado el gen *cagA*, sí se representa como probable microorganismo que en etapas avanzadas genere un estado de patogenicidad. Generalmente *H. pylori* es adquirida por vía oral y se asocia con personas de diferentes edades. En países en vías de desarrollo la bacteria se adquiere a temprana edad, lo que podría estar asociado a que el manejo de los reptiles se dio en este estudio en un 10% que corresponde a 2 casos por menores de edad. Sin embargo, la habilidad de *H. pylori* para causar enfermedad depende de la virulencia de la cepa infectante, la genética del hospedero y de factores ambientales **(Clyne et al., 2007)**.

Por otro lado, el ambiente natural de *H. pylori* es la mucosa gástrica del estómago humano, aunque también se ha demostrado la presencia de formas infecciosas en la saliva y heces de individuos infectados **(Leclerc et al., 2002)**. Por ello, en este estudio analizamos el agua de mantenimiento y de peceras de tortugas que fungían como mascotas; ante la evidencia de que *H. pylori* puede sobrevivir en agua de consumo como fue reportado por **Klein et al., (1991)**. En este contexto, solo 5 casos fueron positivos a la presencia de bacterias (ver Fig. 16 y Tabla 8) arrojando que la bacteria más frecuente es *E. coli*. En adición, al analizar el agua de las peceras se encontró que las bacterias más comunes son: *Salmonella* sp, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* sp (ver Fig. 17 y Tabla 9). Todas estas bacterias son patógenas para el ser humano, generando así un posible foco de infección para las personas que conviven con este tipo de mascotas.

Debido que sólo *Salmonella* sp se ha reportado como flora normal de las tortugas como reportaron Nakadai et al., (2005), al analizar el agua de las peceras se determinó a esta bacteria presente dentro de los 5 casos positivos a crecimiento bacteriano, dejando a la tortuga doméstica como un foco de infección para la población que las mantiene como mascotas; pueden transmitir

Salmonella sp al realizar el mantenimiento del reptil. Esta bacteria es excretada en las heces de las tortugas, contaminando con ello el agua de las peceras. Esto genera una posible vía de transmisión de *Salmonella* sp para el ser humano al manipular el agua y el reptil (**Stam et al., 2003**).

Por otro lado, al realizar las pruebas de detección por PCR para el agua de las peceras se encontró que 6 muestras resultaron positivas a la presencia de *H. pylori* tal como se pudo observar en la Fig. 21. Al realizar las pruebas por PCR anidado se estableció que la cepa encontrada es *cagA*-, lo cual refiere a que esta cepa de *H. pylori* no es inductora de cáncer (Fig. 22). Se ha reportado que el gen *cagA* está presente en el 60% de las cepas de *H. pylori*. *cagA* es un factor de virulencia importante en la epidemiología y patología de la bacteria. Cuando *cagA* es positivo induce una respuesta inmune mayor, generando gastritis severa; también se asocia en la úlcera peptídica, atrofia gástrica y cáncer gástrico (**Martin et al., 2004**). No obstante, aunque la cepa encontrada en este trabajo fue *cagA*-, el hecho no deja de ser importante, ya que las técnicas empleadas en este trabajo pusieron de manifiesto la presencia de *H. pylori* en el agua de la red pública de la ciudad de Puebla y en las peceras de algunas tortugas domésticas. Se conocen algunos reportes que refieren que las infecciones por *H. pylori* son más frecuentes en meses de lluvia, indicando con ello que el agua es un reservorio natural en el cual la bacteria puede sobrevivir y permanecer en ella hasta ser ingerida (**Domínguez et al., 2002**).

De acuerdo a los datos presentados, se pudo observar que de todas las muestras de agua estudiadas (que se utiliza para mantener a las tortugas domésticas), el 25% con 5 casos tiene la posibilidad de contener *E. coli* y sólo 1 caso (5%) posee *H. pylori*. Sin embargo, cuando se realizó el estudio con las muestras de agua extraídas de las peceras conteniendo tortugas el 70% de ellas mostraron contener enterobacterias (14 casos) y alrededor del 30% de las muestras de agua analizadas que corresponde a 6 casos si presentó *H. pylori*. En adición, los datos obtenidos sugirieron que 95% de las muestras de agua estudiadas, correspondientes a 19 casos (tanto de agua de manutención y de pecera de tortugas) se contaminan con enterobacterias altamente patógenas y que de este grupo, al menos el 45% deben estar contaminadas con *H. pylori* correspondiente a 9 casos, de ahí que este trabajo resulte importante debido a

que en la actualidad poco se sabe acerca de la presencia de *H. pylori* en tortugas domésticas y estas mascotas puedan ser reservorios importantes para la transmisión de enfermedades con que está relacionada la bacteria.

Con los datos obtenidos del cuestionario que fue aplicado en cada hogar que poseen tortugas (ver Anexos), se propuso que la periodicidad con la que se cambia el agua no afecta de manera importante la presencia de la bacteria (ver Fig. 11, 12 y 13). Lo mismo se observó al buscar la relación entre las personas que padecen gastritis y la exposición con la tortuga (Fig. 15) ya que no se registraron la presencia de síntomas.

Existen hipótesis de que *H. pylori* puede encontrarse en microambientes acuáticos bajo la forma cocoide, la cual posee mayor resistencia que la forma espiral (**Adam et al., 2003**). También se ha reportado que *H. pylori* forma biopelículas en sistemas de almacenamiento y distribución de agua potable (**Davey y O'toole, 2000**). En la actualidad, las vías de transmisión no han sido elucidadas del todo, es un tema controversial. Diversos estudios hacen referencia a la vía de transmisión hídrica, principalmente en países en vías de desarrollo (**Azevedo et al., 2007**). En este contexto los datos obtenidos en este trabajo resultan relevantes ya que aportan información de la presencia de la bacteria en medios acuáticos.

Se sabe que existen diversas especies de *Helicobacter* sp asociados a distintos hospederos y al ser la tortuga una opción de mascota, es que en este trabajo se realizó la búsqueda de *H. pylori*. **Hernández (2004)** reportó el caso de una niña con gastritis crónica. Esta niña tenía de mascotas a perros infectados con *H. heilmanni* por lo que se determinó a esta mascota como vector. En el caso de *H. pylori* hay estudios donde se ha aislado a la bacteria de la mucosa gástrica de los gatos, lo que ha llevado a sugerir que puede ser un agente zoonótico para los humanos, estableciendo que las mascotas comunes al estar en contacto con las personas mediante su mantenimiento, generan opciones de transmisión del microorganismo (**Hernández y Gallón, 2004**). Eso pudo comprobarse en este estudio al encontrar que las peceras de tortugas sí presentaron *H. pylori*. En Korea se analizaron muestras de saliva y heces de gatos domésticos, los cuales resultaron infectados con *H. pylori* y *H. felis*, lo

que puede constituir un foco de infección para el ser humano, aumentando los casos clínicos antes descritos además de generar un daño directo al dueño. De ahí, que el hecho de que hayamos encontrado DNA en el agua de las peceras de tortugas domésticas nos indica que *H. pylori* está en un estado viable o no, pero sí constituye un estado de alerta para conocer más a fondo los posibles reservorios de esta bacteria y las implicaciones en las posibles infecciones asociadas a un manejo inapropiado de la mascota. Así como del agua que se desecha en la tarja o drenaje, siendo éste el último destino para la bacteria. Generando así una posible propagación en el agua y si esta no es potabilizada adecuadamente la erradicación de esta bacteria no se logra.

Ghil et al., (2009) y Brian et al., (2010) reportaron que *H. pylori* en tortugas genera septicemia. Tomando en cuenta lo anterior, al analizar las enfermedades de las mascotas (ver Anexos) se comprobó que en 2 casos los padecimientos de las mascotas eran por abscesos de los ojos (10%) y sólo 1 caso representando el 5% presentó enfermedades gástricas (Fig. 14b). Esto indicó que el reservorio de bacterias presentes en las mascotas podrían provocar enfermedades oculares y que la tortuga como vector es viable para *H. pylori*.

La detección de *H. pylori* a partir de fuentes ambientales, representa un serio problema utilizando las técnicas microbiológicas convencionales. Por lo cual, se ha recurrido a las técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este trabajo representa una aportación importante ya que permitió detectar *H. pylori* en ambientes acuáticos, especialmente en agua de peceras donde se mantiene a las tortugas domésticas. También aporta información valiosa para poder recomendar cuidados que deben tenerse al poseer una tortuga como mascota y de su manejo, ya que la totalidad de la población desconoce que esta inofensiva mascota es portadora de *H. pylori* y no tiene los cuidados necesarios para evitar posibles contagios.

11. Conclusiones

Las tortugas domésticas se encuentran presentes como mascotas en hogares de Puebla. Al realizar la búsqueda de *H. pylori* se encontró que:

- 1) 5 muestras de 20 de agua resultaron positivas a *E. coli*.
- 2) 12 muestras de 20 de agua resultaron positivas para: *Salmonella* sp., *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus* sp.
- 3) Al realizar la detección del gen *16S rRNA* de *H. pylori* por PCR anidado (a partir de las 12 muestras de agua de las tortugas domésticas que contenían bacterias), se encontraron 6 muestras positivas a *H. pylori*.
- 4) Al realizar la detección del gen *cagA* (a las 6 muestras positivas *16S rRNA* de *H. pylori*), no se encontró muestra que resultase positiva al gen *cagA*.
- 5) No se detectó la presencia del gen *cagA* en las muestras de agua de las tortugas, no obstante se determinó la presencia de *H. pylori* en: 6 muestras positivas en el agua de tortugas domésticas y un solo caso en el agua de la red pública.

12. Perspectivas

Dado que este trabajo tuvo como finalidad la detección de *H. pylori* en las peceras de tortugas y ante los resultados obtenidos se sugiere continuar con los siguientes puntos:

- a) Generar después de la detección por PCR anidado productos para su posterior análisis mediante secuenciación nucleotídica.
- b) Encontrar enzimas de restricción específicas para las secuencias de Hp1, Hp2 y Hp3, aumentando la especificidad y generar resultados puntuales.
- c) Tomar muestras de contenido gástrico tanto de mascotas y dueños (en caso de referir padecimientos gástricos) y analizar si las muestras corresponden a la misma cepa.
- d) Analizar la presencia de otro factor de virulencia como lo puede ser el fenotipo de colibrí u otros mediante PCR.

Referencias

1. Adams B, Bates T, Oliver J, 2003. Survival of *Helicobacter pylori* in a natural freshwater environment. *Applied and Environmental Microbiology*; 69:7462–7466.
2. Ahuja V, Sharma M, 2002. High recurrence rate of *Helicobacter pylori* infection in developing countries. *Gastroenterology*; 123: 653 – 54.
3. Alm R, Noonan B, 2001. The Genome *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. American Society for Microbiology Press, 1: 295-312.
4. Amieva M, Omar E, 2008. Host bacterial interactions infection. *Gastroenterology*; 134: 306 – 323.
5. Atherton J, Cao P, Peek J, Tummuru, M, Blazer J, Cover T, 1995. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *Journal Biology Chemistry*; 270: 17771-17777.
6. Ashbolt N, 2004. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *School of Civil and Environmental Engineering*; 198: 229-38.
7. Aurazo M, 2001. Aspectos Biológicos del Agua, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima. Peru; Pág. 59-93.
8. Azevedo N, Guimaraes N, Figueiredo C, Keevil C, Vieira M, 2007. A New Model for the Transmission of *Helicobacter pylori*: Role of Environmental Reservoirs as Gene Pools to Increase Strain Diversity. *Critical Reviews in Microbiology*; 33: 157-169.
9. Azevedo N, Pacheco A, Keevil C, Vieira M, 2006. Adhesion of water stressed *Helicobacter pylori* to abiotic surfaces. *Journal of Applied Microbiology*; 101: 718–724.
10. Azevedo N, Pinto A, Reis N, Vieira M, Keevil C, 2006. Shear stress, temperature, and inoculation concentration influence the adhesion of water–

stressed *Helicobacter pylori* to stainless steel 304 and polypropylene. *Applied and Environmental Microbiology*; 72: 2936–2941.

11. Baker K, Hegarty J, Redmond B, Reed N, Herson D, 2002. Effect of Oxidizing Disinfectants (Chlorine, Monochloramine, and Ozone) on *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology*; 68: 981-984.

12. Bickley J, Owen R, Fraser A, Pounder R, 1993. Evaluation of the polymerase chain reaction for detecting the urease C gene of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy samples and dental plaque. *Journal of Medical Microbiology*; 39: 338-344.

13. Brian A, James F, Wellehan J, 2010. Fatal septicemia caused by *Helicobacter Pylori* infection in a pancake tortoise (*Malacochersus tornieri*), *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*; 22: 660–662.

14. Bruce M, Maarros H, 2008. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*; 13: 1–6.

15. Caputo R, Tuccillo C, Manzo BA, Zarrilli R, Tortora G, Blanco C, et al, 2003. *Helicobacter pylori* VacA toxin up-regulates vascular endothelial growth factor expression in MKN 28 gastric cells through an epidermal growth factor receptor-cyclooxygenase-2-dependent mechanism. *Clinical Cancer Research*; 9: 2015-2021.

16. Carbone M, Maugeri T, Gugliandolo C, Camera E, Biondo C, Fera M, 2005. Occurrence of *Helicobacter pylori* DNA in the coastal environment of southern Italy (Straits of Messina), *Journal of applied microbiology*; 98: 768-774.

17. Chiu H, Lin H, Wang J, 2007. Identification and Characterization of an Organic Solvent Tolerance Gene in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*; 12: 74-81.

18. Clyne M, Dolan B, Reeves E, 2007. Bacterial factors that mediate colonization of the stomach and virulence of *Helicobacter pylori*. *Microbiology*; 268: 135-143.

19. Craun G, Calderón R, 2001. Waterborne Disease Outbreaks Caused by Distribution System Deficiencies. *Journal of the American Water*; 4: 64-75.

20. Dominguez M, 2002. Short report: socioeconomic and seasonal variations of *Helicobacter pylori* infection in patients in Venezuela. *Journal of Tropical Medicine*; 66: 49-56
21. Dunn B, Cohen H, Blazer M, 1997. *Helicobacter pylori*. *Clinical Microbiology Reviews*; 10: 720-741.
22. Fernández D, Contreras M, García M, Michelangeli F, Suárez P, 2007. Evidencias de la transmisión acuática de *Helicobacter pylori*. *Interciencia*; 33: 412-417
23. Fux C, Costerton J, Stewart P, Stoodley P, 2005. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiology*; 13: 34-40
24. Ghil H, Yoos J, Jungi W, Chungi T, Youn H, Yong C, 2009. Survey of *Helicobacter* infection in domestical and feral cats in Korea. *Journal Veterinary Sciences*; 10: 62-67.
25. Gómez L, Atehortua C, Orozco S, 2007. La influencia de las mascotas en la vida humana, *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*; 20: 377-386.
26. Gonzales M, Chiroles S, 2011. Safe use and microbiological risks of wastewater for agriculture, *Revista Cubana de salud pública*; 37: 61-73.
27. Graham D, Lu H, Yamaoka Y, 2009. African, Asian or Indian enigma, the East Asian *Helicobacter pylori*: facts or medical myths. *Journal of Digestive Diseases*: 10: 77 - 84.
28. Gutiérrez G, Granados D, Piar N, 2007. Interacción humano-animal: características e implicaciones para el bienestar de los humanos, *Revista de la Universidad Nacional de Colombia*; 16: 163-184.
29. Happonen IS, *et.al*, 1996. Occurrence and topographical mapping of gastric *Helicobacter*-like organisms and their association with histological changes in apparently healthy dogs and cats. *Veterinary Medicine*; 43: 305–315.
30. Hernández C, Aguilera M, Castro E, 2011. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México, *Enfermedades infecciosas microbiológicas*; 31: 137-151.

31. Hernández C, Gallón G, 2004. Helicobácteres gástricos de perros y gatos: mínimo riesgo en salud pública, Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias; 17: 204-267.
32. Jara M, 2003. Determinación histológica de la presencia de bacterias curvo-espirladas tipo *helicobacter spp.* en estómago, intestinos, hígado y vesícula biliar de perros (*canis familiaris*) de la ciudad de Valdivia, Chile, Trabajo de tesis, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. Pág. 1-52
33. Karita M, Teramukai S, Matsumoto S, 2003. Risk of *Helicobacter pylori* Transmission from Drinking Well Water Is Higher Than That from Infected Intrafamilial Members in Japan. Digestive and Disease Sciences; 48: 1062-1067.
34. Klein P, Graham D, Gaillour A, Opekum A, Smith E, 1991. Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. Lancet 337: 1503-1506.
35. Maguiña V, Soto L, Egoavil R, Breña P, 2004. Enfermedades de mascotas en humanos, Rev.Soc.Per. Med. Interciencia.17: 17-26.
36. Marais A, Mendz G, Hazell S, Mégraud F, 1999. Metabolism and Genetics of *Helicobacter pylori*: the Genome Era. Microbiology and Molecular Biology Reviews; 63: 642-674
37. Martin J, Blaser, John C, 2004. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease, Journal Clinical Investigation; 113: 321-333.
38. Mazari M, López Y, Castillo G, Ponce S, Cravioto A, 2001. *Helicobacter pylori* and Other Enteric Bacteria in Freshwater Environments in Mexico City. Water Sciences Technology.; 32: 458-467.
39. Mladenova I, Durazzo M, Pellicano R, 2006. Transmission of *Helicobacter pylori*: are there evidences for a fecal-oral route, Minerva Medical; 97: 15-8.
40. Moncayo J, Alvarez A, Santacruz J, Santacoloma M, Arias B, Giraldo L, Pinzón A, 2011. Evaluación de diferentes pruebas para el diagnóstico de *Helicobacter. pylori*, Revista de Investigaciones Andina; 13: 297-311.

41. Nakadai A, Kuroki T, Kato Y, Suzuki R, Yanai S, Yaginuma C, Shiotani R, Yamanouchi A, Hayashidani H, 2004. Prevalence of *Salmonella sp.* in pet reptils in Japan, Journal Veterinary Medical Sciences; 67: 97-101
42. Oliver J, 2005. The Viable but Nonculturable State in Bacteria. Journal of Microbiology; 43: 93-100.
43. Olivares D, Gisbert J, 2006. Factors involved in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection, Revista Española de Enfermedades. Digestivas; 98: 374-386.
44. Ottemann K, Lowenthal A, 2002. *Helicobacter pylori* uses motility for initial colonization and to attain robust infection. Infection Immunology; 70: 1984-90.
45. Pacheco R, 2003. Mascotas en los hogares: enfermedades de los niños adquiridas por convivencia con animales. Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología; 23:137-148.
46. Pérez G, 2007. Fisiopatología del *Helicobacter pylori* SAM Esófago, estómago y duodeno. Sistema de actualización médica Intersistemas; 2: 39 – 44
47. Poddar U, Yachha S, 2007. *Helicobacter pylori* in children: an Indian perspective. Indian Pediatrics ; 44: 761-760.
48. Rad R, Gerhard M, Lang R, Schoniger M, Rosch T, Schepp W, et al, 2002. The *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin facilitate bacterial colonization and augments a nonspecific immune response. Journal Immunology; 168: 3033-3041.
49. Ramírez R, Chinga A, Mendoza R, 2004. Variation of *Helicobacter pylori* prevalence and its relation with the level of chlorine in the water at the "Atarjea" plant, Lima, Peru. Period 1985-2002. Revist Gastroenterology Perú; 24: 223-229.
50. Rivas F. Hernández F, 2000. *Helicobacter pylori*: factores de virulencia, patología y diagnóstico. Revist Biomedicine; 11:187-205.

51. She F, Lin J, Liu J, Huang C, Su D, 2003. Virulence of water-induced coccoid *Helicobacter pylori* and its experimental infection in mice. *Journal of Gastroenterology*; 9: 516-520.
52. Stam F, Tessa H, Mkens R, Hekker T, Smulders Y, 2003. Turtles-Associated human salmonellosis. *Clinical infectious Diseases*: 37; 167-169
53. Stolte M, Wellens B, Bethke, M, Ritter H, 1994. *Helicobacter heilmannii* (antes *Gastrospirillum hominis*) Gastritis: una infección transmitida por los animales? *Scand Journal of Gastroenterology* ; 29:1061-1064.
54. Zúñiga I, lozano J, 2007. Zoonosis intradomiciliarias: Las mascotas como entes portadores de enfermedades, *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*; 23: 4-6.
55. Voland P, Weeks D, Marcus E, Prinz C, Sachs G, Scott D, 2003. Interactions among the seven *Helicobacter pylori* proteins encoded by the urease gene cluster. *Journal Physiology Gastrointestinal Liver Physiology*; 284: 96–106.
56. Waleed A, *et al*, 2003. Assessment of pcr-dgge for the identification of diverse *helicobacter* species, and application to faecal samples from zoo animals to determine helicobacter prevalence, *Journal of Medical Microbiology*; 52: 765-771.
57. Van K, Debongnie J, Ducatelle R, 2005. Identification of Non-*Helicobacter Pylori* spiral organisms in gastric samples from humans, dogs and cats, *American Society for Microbiology*; 43: 2256-2260.
58. Warwick C, Lambiris A, Westwood D, 2001. Reptile-related salmonellosis, *Journal of the Royal Society of Medicine*; 94:124-126.

ANEXOS

CUESTIONARIO

1. ¿Cuántas veces le cambia el agua a la pecera de la tortuga?

Muestra 1: cada semana

Muestra 11: cada semana

Muestra 2: cada semana

Muestra 12: cada tercer día

Muestra 3: cada semana

Muestra 13: cada semana

Muestra 4: cada tercer día

Muestra 14: cada semana

Muestra 5: cada semana

Muestra 15: cada semana

Muestra 6: cada semana

Muestra 16: cada semana.

Muestra 7: cada semana

Muestra 17: cada semana

Muestra 8: cada semana

Muestra 18: cada semana

Muestra 9: cada semana

Muestra 19: cada semana

Muestra 10: cada semana

Muestra 20: cada semana

2. ¿De donde procede el agua que se le coloca en las peceras?

Muestra 1: de la llave

Muestra 11: de la llave

Muestra 2: botellón rellenable

Muestra 12: de la llave

Muestra 3: de la llave

Muestra 13: de la llave

Muestra 4: botellón

Muestra 14: de la llave

Muestra 5: de la llave

Muestra 15: de la llave

Muestra 6: de la llave

Muestra 16: de la llave

Muestra 7: de la llave

Muestra 17: de la llave

Muestra 8: de la llave

Muestra 18: de la llave

Muestra 9: de la llave

Muestra 19: de la llave

Muestra 10: de la llave

Muestra 20: de la llave

3. ¿Cuántas veces lava la pecera?

Muestra 1: cada semana

Muestra 2: cada semana

Muestra 3: cada semana

Muestra 4: cada tercer día

Muestra 5: cada semana

Muestra 6: cada semana

Muestra 7: cada semana

Muestra 8: cada semana

Muestra 9: cada semana

Muestra 10: cada semana

Muestra 11: cada semana

Muestra 12: cada semana

Muestra 13: cada semana

Muestra 14: cada semana

Muestra 15: cada semana

Muestra 16: cada semana.

Muestra 17: cada semana

Muestra 18: cada semana

Muestra 19: cada semana

Muestra 20: cada semana

4. ¿Cuándo lava la pecera de la tortuga?

Muestra 1: si, cada semana

Muestra 2: si, cada vez que
se le siente lama

Muestra 3: si, cada semana

Muestra 4: si, cada semana

Muestra 5: si, cada semana

Muestra 6: si, cada semana

Muestra 7: si, cada semana

Muestra 8: si, cada semana

Muestra 9: si, cada semana

Muestra 10: si, cada semana

Muestra 11: si, cada semana

Muestra 12: cada vez que
lo crea necesario

Muestra 13: cada semana

Muestra 14: cada semana

Muestra 15: cada semana

Muestra 16: cada semana.

Muestra 17: cada semana

Muestra 18: cada semana

Muestra 19: cada semana

Muestra 20: cada semana

5. ¿La saca a tomar el sol? ¿Cuántas veces?

Muestra 1: si, de vez en cuando

Muestra 2: si todos los días

Muestra 3: si, se encuentra
en el jardín

Muestra 4: si, todos los días

Muestra 5: si, están en el jardín

Muestra 6: si, todos los días

Muestra 7: si, todos los días

Muestra 8: si, todos los días.

Muestra 9: si, cada tercer día.

Muestra 10: si, todos los días.

Muestra 11: todos los días

Muestra 12: todos los días

Muestra 13: si, todos los días

Muestra 14: diario

Muestra 15: toda la semana

Muestra 16: diario

Muestra 17: si, toda la semana

Muestra 18: si, todos los días

Muestra 19: si, todos los días

Muestra 20: diario

6. ¿Se ha enfermado la tortuga?

Muestra 1: no

Muestra 2: si, de los ojos.

Muestra 3: si, no come,
heces con sangre.

Muestra 4: si, abscesos en la cara.

Muestra 5: no

Muestra 6: no

Muestra 7: no

Muestra 8: si, de los ojos.

Muestra 9: no

Muestra 10: no

Muestra 11: no

Muestra 12: no

Muestra 13: no

Muestra 14: no

Muestra 15: no

Muestra 16: no

Muestra 17: no

Muestra 18: no

Muestra 19: no

Muestra 20: no

7 ¿Algún miembro de la familia padece gastritis? ¿Desde cuándo?

Muestra 1: No

Muestra 11: no

Muestra 2: Si, desde hace 20 años

Muestra 12: no

Muestra 3: No

Muestra 13: no

Muestra 4: Si, como dos años.

Muestra 14: no

Muestra 5: Si, como 5 años.

Muestra 15: no

Muestra 6: No

Muestra16: no

Muestra 7: No

Muestra 17: no

Muestra 8: No

Muestra 18: no

Muestra 9: Si, hace 10 años

Muestra 19: no

Muestra 10: Si, hace 2 años

Muestra 20: no

8. ¿Alguna persona que maneja la tortuga frecuentemente, se ha enfermado del estomago?

Muestra 1: No

Muestra 11: no

Muestra 2: No

Muestra 12: si, pero no se lo atribuyen al manejo del reptil

Muestra 3: No

Muestra 13: no

Muestra 4: No

Muestra 14: no

Muestra 5: Si, niños pero conviven con otras mascotas.

Muestra 15: no

Muestra 6: No

Muestra16: no

Muestra 7: Si, niños.

Muestra 17: no

Muestra 8: No

Muestra 18: no

Muestra 9: No

Muestra 19: no

Muestra 10: si, niños.

Muestra 20: no

9. ¿El agua la desechan en el drenaje del hogar o en otro lugar?

Muestra 1: Si

Muestra 2: Si

Muestra 3: En el patio.

Muestra 4: Si

Muestra 5: Si

Muestra 6: En el jardín.

Muestra 7: Si

Muestra 8: Si

Muestra 9: Si

Muestra 10: Si

Muestra 11: si

Muestra 12: si

Muestra 13: si

Muestra 14: si.

Muestra 16: si

Muestra 17: si

Muestra 18: si

Muestra 19: si

Muestra 20: si

**ESTE TRABAJO FUE REALIZADO GRACIAS AL APOYO ECONÓMICO RECIBIDO
POR LA VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO
(VIEP) DE LA BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**