

PROFESORES AL DÍA

Bacterias patógenas de moda*

Raúl Garza-Velasco^a, Elda Peniche-Quintana^a y Silvia M. Manero-Brito^b

*Recibido: 27 de noviembre de 1997 Aceptado: 2 de febrero de 1998

^aDepartamento de Biología, Facultad de Química, U.N.A.M.

^bDepartamento de Fisicoquímica, Facultad de Química, U.N.A.M.

ABSTRACT: Pathogenic bacteria in fashion

Actually, *Vibrio cholerae*, *Helicobacter pylori* y *Chlamydia pneumoniae* are the three pathogenic bacteria more mentioned in the scientific articles; *V. cholerae* is the etiological agent of cholera which is a serious epidemic disease that has killed millions of people and continues to be a major health problem worldwide; *H. pylori* leads to chronic gastritis and gastric ulcers but in addition it is associated with duodenal ulcers and gastric cancer; finally, earlier research has suggested the possible role of *C. pneumoniae* as a cause of atherosclerosis, coronary artery disease and myocardial infarction. The present work describes the essential biochemical and general characteristics related to these pathogenic bacteria in fashion.

INTRODUCCIÓN

Sin lugar a dudas, los padecimientos bacterianos destacan por su frecuencia, gravedad y diversidad; algunos ejemplos representativos son los siguientes: a) las numerosas intoxicaciones alimentarias asociadas a la ingestión de toxinas liberadas en los alimentos y en las fórmulas lácteas por especies tales como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*; b) las cotidianas enteritis y gastroenteritis debidas a *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium perfringens* y a diversos grupos de *Escherichia coli*; c) la faringoamigdalitis estreptocócica, que afecta principalmente a los menores de dos años y puede desencadenar cuadros adicionales de fiebre escarlatina, erisipela y/o enfermedades autoinmunes tales como la fiebre reumática y la glomerulonefritis; d) las afecciones de transmisión sexual, entre las que figuran la clamidiasis genital, la gonorrea y la sífilis; y e) muchas otras entidades clínicas tales como el tracoma -la causa más frecuente de ceguera previsible en el mundo-, tuberculosis, difteria, tosferina, tétanos, botulismo, fiebre tifoidea, colitis pseudomembranosa, brucelosis, lepra, tifus y leptospirosis.

Sin embargo, en el momento actual, llaman particularmente la atención los casos de tres especies bacterianas: *Vibrio cholerae*, *Helicobacter pylori* y *Chlamydia pneumoniae*, ya que la primera ocasiona la actual epidemia latinoamericana de cólera y, las dos últimas, son señaladas con insistencia como probables agentes etiológicos de varios padecimientos humanos “de moda”: gastritis, úlceras gástricas y duodenales, aterosclerosis, enfermedad coronaria y los infartos cardíacos, todos los cuales se atribuían a causas completamente ajenas a microorganismos.

El presente trabajo describe los principales aspectos químico-biológicos relacionados

tanto con el vibrión del cólera, como con el papel de *H. pylori* en la gastritis y las úlceras gastrointestinales; asimismo, comenta los hallazgos que sustentan las teorías que asocian a *C. pneumoniae* con el origen o agravamiento de los cuadros arteriales y cardíacos que aquejan a los adultos jóvenes y mayores. Evidentemente, el texto incluye términos y explicaciones que permiten plantear los citados temas a los profesionales y estudiantes de cualquier rama de la química.

I *Vibrio cholerae*: EL CÓLERA

Principales características del padecimiento

El cólera representa la enfermedad más deshidratante que se conoce, se presenta generalmente en forma epidémica o pandémica¹ y se adquiere por ingestión de agua o alimentos contaminados con materia fecal humana (Madico, 1996; Mooi, 1997; McLaughlin, 1995).

Una vez que la bacteria del cólera (*Vibrio cholerae*) llega al intestino delgado, se adhiere firmemente a las células epiteliales, en cuya superficie mucosa se reproduce rápidamente², liberando la potente enterotoxina del cólera, también conocida como colerágeno (Madico, 1996; Mooi, 1997; McLaughlin, 1995; Roth, 1995; Salyers, 1994).

Numerosos estudios efectuados a la toxina del cólera han logrado establecer su estructura y mecanismo de acción, comprobándose ampliamente que se trata del factor responsable de que el individuo afectado pierda grandes cantidades de agua, Cl^- , HCO_3^- , Na^+ y K^+ , a través de sus numerosas y voluminosas evacuaciones; consecuentemente, en muy poco tiempo puede ocurrir el colapso del sistema circulatorio³ que conduce a la muerte (Roth, 1995; Salyers, 1994; Morris, 1995).

Después de un corto período de incubación que fluctúa entre las 3 horas y los 5 días, los síntomas del padecimiento aparecen abruptamente, destacando el vómito y la diarrea -pudiendo o no haber una leve fiebre-, con evacuaciones blanquecinas que semejan agua de arroz; la intensa deshidratación origina que el paciente manifieste ojos hundidos, pómulos salidos, lengua seca y sarrosa, labios cianóticos y manos de lavandera. Cabe mencionar que, cuando el enfermo se encuentra bajo tratamiento hídrico, llega a evacuar entre 15 y 25 litros diarios de agua; ello da una idea muy cierta acerca de la agresividad del cuadro patológico (McLaughlin, 1995; Roth, 1995; Salyers, 1994).

Mecanismo de acción de la toxina colérica

Aunque este padecimiento se considera producto de una toxi-infección, sus manifestaciones derivan de la notable virulencia del colerágeno; éste corresponde a una proteína termolábil de 84 kDa y se compone por dos unidades: A y B, de las cuales la segunda es la que se une a ciertos receptores específicos presentes en las células

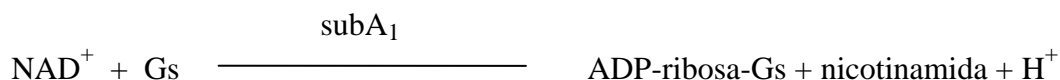
¹ Una enfermedad se clasifica como epidémica cuando afecta a un número de individuos, rebasando las expectativas, dentro de una cierta región geográfica; por otra parte, se considera pandémica cuando se trata de regiones geográficas muy extensas (por lo general, continentes enteros o todo el mundo).

² Es importante considerar que existe un considerable número de individuos que fungen como portadores sanos.

³ El fenómeno se conoce como choque hipovolémico debido al escaso volumen de sangre.

intestinales (los gangliósidos superficiales G_{M1}) y, la primera es la que penetra al citoplasma de dichas células, en donde su subunidad A_2 (sub A_2) se separa de la A_1 (sub A_1), previa reducción de los enlaces disulfuro que las mantenían unidas; finalmente la sub A_1 ejerce su actividad enzimática⁴, que consiste en ADP-ribosilar a la proteína reguladora Gs, la cual de esta manera provoca la activación permanente de la adenilato ciclasa de la célula hospedadora (Roth, 1995; Salyers, 1994) (consultar los diagramas 1 y 2).

La reacción catalizada por la sub A_1 de la toxina colérica es la siguiente (Roth, 1995):



Cabe destacar la interesante función como “preendedor-apagador” de la Gs en las células intestinales: como respuesta a su estimulación por parte de algunas hormonas y unida a guanosintrifosfato (GTP), activa o desactiva a la adenilato ciclasa cuando, respectivamente, se requiere o no de incrementar los niveles de AMPc (adenosinmonofosfato cíclico). Esta última molécula desempeña fundamentales funciones regulatorias en las células eucariotes, pero su acumulación intracelular -en concentraciones relativamente elevadas- resulta muy perjudicial para el metabolismo tisular; por lo que respecta al intestino, su mayor influencia negativa consiste en provocar la hipersecreción prolongada de agua y electrolitos (Roth, 1995; Salyers, 1994).

Algunos datos epidemiológicos

Como se ha difundido entre la población, el cólera reapareció en América después de una ausencia de más de cien años, tocando tierra en Chancay, Perú, en enero de 1991; a partir de esta región se diseminó a través del Continente, llegando a México en junio del mismo año (Madico, 1996).

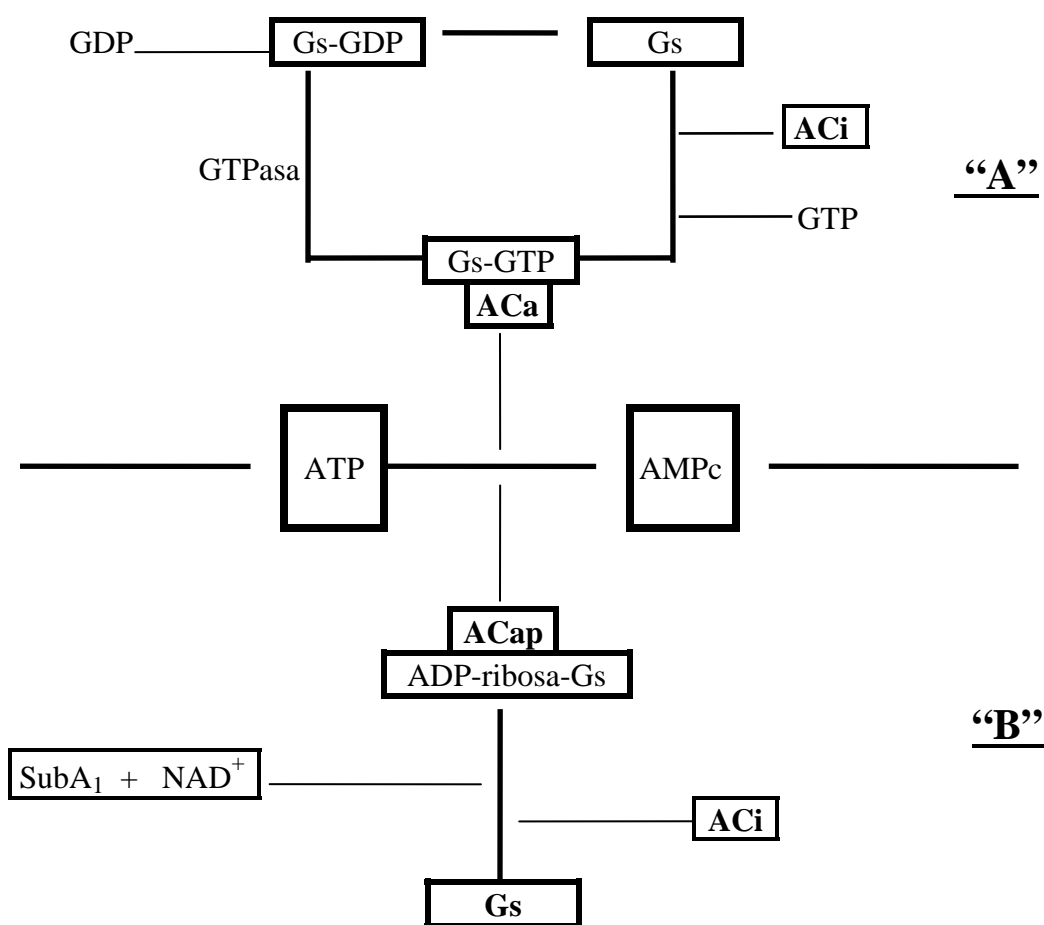
A diferencia de lo sucedido en pandemias anteriores, la actual tiene una letalidad de sólo 1 %, lo cual se debe a que el biotipo involucrado es El Tor que, en general, es más frecuente pero mucho menos virulento que el Clásico (McLaughlin, 1995; Faruque, 1997).

Si bien en la República Mexicana sólo se registraron -oficialmente- alrededor de 4,059 casos anuales en 1994, al año siguiente el problema creció de manera vertiginosa, ya que la cifra final fue de 16,430. Ante tal problemática, se intensificaron las campañas de prevención y control, empleándose los medios masivos de comunicación, con lo cual el registro de 1996 disminuyó a 1,088 casos. Por lo que se refiere a 1997, la frecuencia

⁴ Actúa como una ADP-ribosil transferasa, ya que transfiere la parte ADP-ribosa presente en la estructura del nicotinamida adenindinucleótido (NAD^+) hacia la proteína Gs.

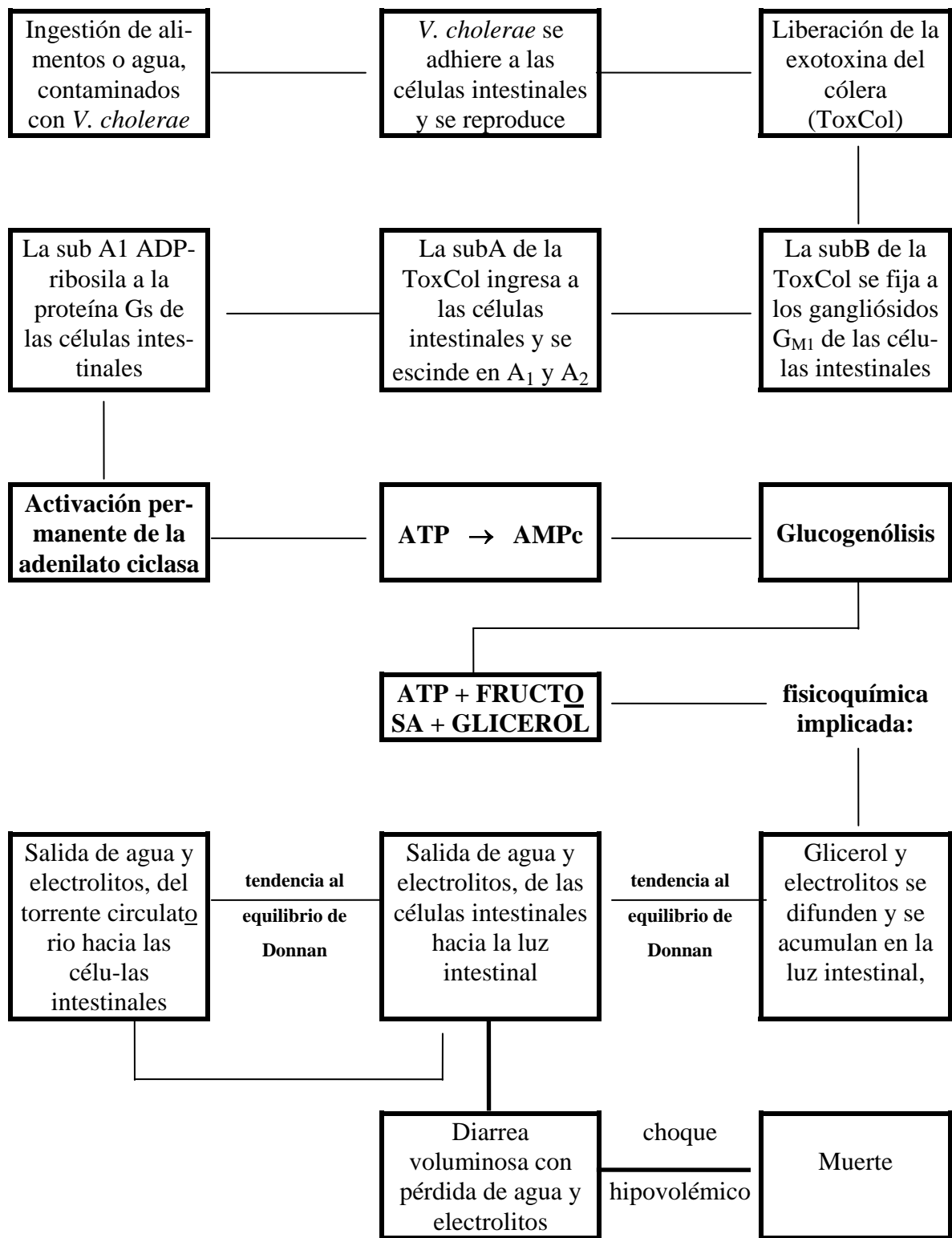
de la enfermedad se incrementó a 2,356 casos, influyendo en cierta forma los desastres ocurridos en Guerrero y Oaxaca, con motivo del huracán Paulina (Secretaría de Salud, 1996 y 1998).

Diagrama 1. Producción de AMPc en las células intestinales: “A” en condiciones de salud; “B” bajo la influencia de la subA₁ de la toxina colérica (Roth, 1995; Salyers, 1994).



CLAVES: GDP = guanodifosfato; GTP = guanotrifosfato; ACi = adenilato ciclasa inactiva; ACa = adenilato ciclasa activa; ATP = adenosintrifosfato; AMPc = adenosinmonofosfato cíclico; ACap = Adenilato ciclasa activada permanentemente; NAD⁺ = nicotinamida-adenosin-dinucleótido.

Diagrama 2. Principales eventos implicados en la infección por cólera (Madico, 1996; McLaughlin, 1995; Roth, 1995; Salyers, 1994).



Características del agente causal

Vibrio cholerae es una bacteria Gram negativa que presenta forma de coma, tanto en su estado parasitario como durante los primeros cultivos *in vitro*, si bien después adquiere la morfología de bacilo recto, con aproximadamente 0.5 μ de ancho por 1.5 μ de largo; es muy móvil merced a su flagelo polar único y no produce cápsula ni espora. Asimismo, es facultativo, puede reproducirse entre los 6 y los 42°C (si bien su temperatura óptima es de 37°C) y, aunque su pH óptimo es cercano a 7, crece sin problemas a pH's alcalinos de hasta 9.5 (McLaughlin, 1995).

Cabe mencionar que existen cepas de *V. cholerae* que no ocasionan cólera, sino un síndrome diarreico común -menos grave-; en este sentido, la diferenciación correspondiente generalmente se basa en una simple reacción de aglutinación con un suero polivalente denominado anti-O1: las cepas que provocan el cólera aglutinan en presencia de dicho suero, a diferencia de las restantes (conocidas como cepas de *Vibrio cholerae* no O1). Sin embargo, es oportuno tomar en cuenta que, actualmente, existe una cepa no O1 que en breve podría dar lugar a una nueva pandemia y cuya denominación es la de *Vibrio cholerae* O 139 Bengal (Faruque, 1997).

Las cepas de *Vibrio cholerae* O1 se subdividen en 2 biotipos: Clásico y El Tor, con base en diversas pruebas bioquímicas⁵; cada uno de dichos biotipos se divide en 3 serotipos: Inaba, Ogawa e Hikojima, dependiendo de las determinantes antigénicas presentes en su antígeno O (AgO) (McLaughlin, 1995; Faruque, 1997; Osawa, 1997).

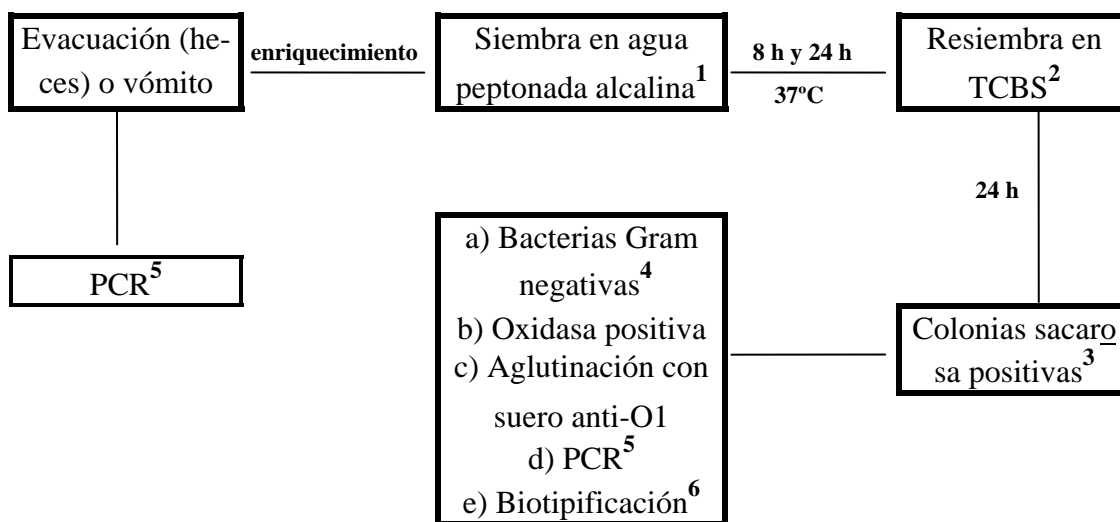
Tratamiento y diagnóstico del cólera en el laboratorio

Dada la rapidez con la que el cólera evoluciona, en la mayor parte de los casos resulta impropio esperar el reporte del laboratorio para dar inicio al tratamiento; por tal motivo, éste se implementa con base en el diagnóstico clínico (signos y síntomas) y consiste en la pronta restitución del agua y los electrolitos perdidos -por vía oral pero, principalmente, por vía endovenosa- y la administración de tetraciclinas u otros antibióticos (McLaughlin, 1995).

No obstante lo anterior, el cultivo de las muestras debe realizarse en todos los casos, a fin de aislar, identificar y tipificar a la cepa responsable, lo que sustenta los estudios epidemiológicos correspondientes. Los pasos más importantes en la identificación y tipificación de la especie se resumen en el diagrama 3.

⁵ Voges Proskauer, fermentación de manosa, ornitina descarboxilasa (ODC), lisina descarboxilasa (LDC) y Kligler (McLaughlin, 1995).

Diagrama 3. Metodología implicada en la detección de *V. cholerae* en muestras clínicas (Madico, 1996; Mooi, 1997; McLaughlin, 1995; Faruque, 1997; Osawa, 1997; Falklind, 1996).



CLAVE: ¹ = peptona al 1 % estéril ajustada a pH aproximado de 8.6; ² = Tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa; ³ = las colonias sacarosa positiva son de color amarillo, ya que el TCBS contiene indicador azul de bromo-timol; ⁴ = los microorganismos se observan al microscopio, previa preparación de extensiones teñidas al Gram; ⁵ = reacción en cadena de la polimerasa; ⁶ = reacciones de aglutinación con sueros anti-B y anti-C

II. *Helicobacter pylori*: GASTRITIS Y ÚLCERAS GASTRODUODENALES

Desde hace algunos años, se comprobó debidamente el importante papel de la especie bacteriana *Helicobacter pylori* como principal promotor, tanto de la gastritis crónica y de las úlceras gastroduodenales, como del carcinoma gástrico (Oksanen, 1997; Blaser, 1994; Chandrakumaran, 1994; Jerris, 1995; Rudi, 1997).

La comprensión de los mecanismos asociados al origen de dichas enfermedades, requiere de una breve revisión de los factores que sustentan la protección de las mucosas gástrica y duodenal.

Mecanismos de defensa del tracto gastrointestinal

En condiciones de salud, la defensa conjunta del estómago reside primordialmente en una gruesa barrera de moco que recubre los tejidos epiteliales, en los iones HCO_3^- atrapados en la mucosa y en los elevados niveles gástricos de prostaglandinas (PG's) y de HCl. La primera impide que la mayor parte de los iones H^+ (provenientes del HCl), alcancen la superficie de las células epiteliales; el HCO_3^- neutraliza precisamente a los iones H^+ que logran atravesar la cubierta de moco; las PG's, potencian la secreción de moco y la acumulación de HCO_3^- en los tejidos estomacales, y el HCl lleva a cabo la hidrólisis ácida de las proteínas y carbohidratos que se localizan en la superficie de numerosos microorganismos, promoviendo su ulterior destrucción (Jerris, 1995; Sachs, 1995).

De esta manera, la degradación de la gran capa de moco y/o la disminución en las concentraciones de HCO_3^- permiten que los iones H^+ difundan con mayor libertad hasta las células estomacales y efectúen la hidrólisis ácida de los carbohidratos y proteínas de los tejidos gástricos, lo que conduce a una intensa destrucción tisular (Jerris, 1995; Sachs, 1995).

Dado que el HCl no se produce en el duodeno (la primera porción del intestino delgado), es lógico que los factores de defensa contra la acidez resulten menos eficaces en esta región; de hecho, la barrera de moco no es tan gruesa y la resistencia a los iones H^+ depende, de manera más determinante, del líquido pancreático descargado en esta zona anatómica -a razón de 1 a 1.5 litros diarios-, a fin de que su contenido en HCO_3^- neutralice al material ácido proveniente del estómago (Jerris, 1995; Sachs, 1995).

Patogenia

Aunque no todas las vías de transmisión están debidamente comprobadas, al parecer, *Helicobacter pylori* se adquiere de persona a persona (oral-oral o ano-mano-boca), por ingestión de agua, bebidas o alimentos contaminados con materia fecal, y por la introducción de endoscopios u otros instrumentos médicos -contaminados- hasta el

estómago de los pacientes analizados, e inclusive, por la convivencia con algunos animales domésticos (gatos y perros) (Oksanen, 1997; Blaser, 1994; Chandrakumaran, 1994; Jerris, 1995).

Independientemente de la fuente de contagio, el microorganismo se aloja en la luz del estómago y, previo desplazamiento basado en su gran movilidad, después se adhiere a las células mucoproducidas superficiales -en las foveolas gástricas⁶-. Consecuentemente, las células estomacales implicadas sufren importantes cambios degenerativos: tienden a aplanarse, pierden progresivamente su recubrimiento de moco y se separan del resto del tejido; además, éste continúa deteriorándose y puede generarse hipoclorhidria gástrica, ante la progresiva acción hidrolítica u oxidante de las hidrolasas, de los iones H^+ , de los iones peróxido (O_2^-) y superóxido (O_2^-) liberados por los neutrófilos polimorfonucleares⁷ (PMN) y del NH_3 originado por la ureasa bacteriana (Blaser, 1994; Jerris, 1995; Figura, 1997).

La intensidad de las lesiones determina el nombre de la enfermedad: gastritis o úlcera gástrica ya que, por lo general, en esta última se observa una mayor destrucción y sangrado. En cuanto a las úlceras duodenales, aún no se han encontrado evidencias directas de que este microorganismo pudiera originarlas, aunque sí existe correlación entre su presencia y la de dichas lesiones. Sin embargo, una de las teorías establece que las úlceras duodenales se deben principalmente a que *H. pylori* provoca indirectamente hipersecreción gástrica, como resultado de la destrucción de numerosas células “D”, por efecto del proceso inflamatorio y de la acumulación de NH_3 ; cabe señalar que dichas células “D” son las productoras de somatostatina, hormona encargada de disminuir la secreción de gastrina por las células “G”; ante tales condiciones, suele presentarse una hipergastrinemia (elevada concentración de gastrina en la sangre) que deriva en la liberación de abundantes cantidades de HCl -por parte de las células parietales- prácticamente imposibles de neutralizar mediante el HCO_3^- que el páncreas libera hacia el duodeno (Sachs, 1995; Figura, 1997).

Por otra parte, es conveniente considerar que los individuos sintomáticos y asintomáticos infectados por *Helicobacter pylori*, presentan títulos elevados de anticuerpos contra dicha especie bacteriana, tanto en el suero, como en el jugo gástrico y la saliva (Blaser, 1994; Rudi, 1997; Jaskowski, 1997).

De hecho, las encuestas epidemiológicas y diversos estudios sobre la patogenia asociada a este microorganismo se basan en la búsqueda y cuantificación de anticuerpos séricos dirigidos en su contra; de esa manera se ha logrado establecer que al menos la mitad de

⁶ Las foveolas gástricas corresponden a aberturas naturales de las glándulas secretoras de moco en el estómago.

⁷ Los neutrófilos son células fagocitarias que destruyen agentes infecciosos: los engullen, después los inactivan -los matan- oxidando sus complejos enzimáticos y, finalmente, los destruyen vía sus enzimas hidrolíticas. Sin embargo, durante la interacción también ocurre la destrucción de una mayor o menor cantidad de neutrófilos, por lo que su contenido oxidante/hidrolítico se libera y actúa sobre los propios tejidos del individuo.

los adultos ha entrado en contacto con *H. pylori* pero, adicionalmente, se ha encontrado que la concentración de los anticuerpos dirigidos específicamente contra algunas de sus proteínas superficiales (VacA y CagA) parece correlacionar con la agresividad de las úlceras, e inclusive, con el riesgo de contraer cáncer gástrico (Figura, 1997; Jaskowski, 1997; Fox, 1998).

De acuerdo con lo anterior, es indudable que habrá que intentar y concretar un mayor número de estudios experimentales en modelos animales -utilizando roedores y lechones- para aclarar lo referente a la aparición y evolución de los diversos padecimientos causados por *Helicobacter pylori* y, desde luego, para lograr avances más significativos en cuanto a su tratamiento y prevención (Fox, 1998; Eaton, 1994; Asaka, 1998).

Factores de virulencia de *H. pylori*

Entre los numerosos factores de virulencia que se han detectado en este microorganismo, destacan los siguientes (Oksanen, 1997; Blaser, 1994; Chandrakumaran, 1994; Jerris, 1995; Figura, 1997; Ito, 1997; Spohn, 1997):

Motilidad. Resulta esencial para que ocurra la colonización de la superficie gastrointestinal; el empleo de medios sintéticos elaborados a base de metil-celulosa ha revelado que *H. pylori* cruza eficazmente los medios viscosos, lo cual sugiere que se desplaza con relativa facilidad a través de la capa mucosa, desde el medio ácido predominante en el lumen gástrico hasta la superficie del tejido epitelial, en donde suele existir un pH casi neutro -hasta que aparecen las alteraciones patológicas (Jerris, 1995; Rudi, 1997; Andersen, 1997).

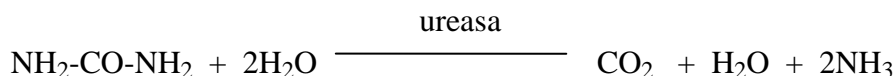
Adhesinas. La microscopía electrónica ha mostrado que *H. pylori* se adhiere a las membranas del epitelio celular, a través de pequeñas proyecciones celulares, a las cuales se les ha denominado “pedestales de adherencia”. Algunos autores proponen que estas estructuras equivalen a adhesinas proteicas clásicas que soportan en la punta algunos azúcares tales como el N-acetil-neuraminil-lactosa, cuyos receptores -en la mucosa gástrica humana- son algunas moléculas de fosfatidiletanolamina (Jerris, 1995; Andersen, 1997).

Ureasa. Sin lugar a dudas, esta enzima representa uno de los principales factores de patogenicidad de *H. pylori* ya que, al catalizar la hidrólisis de la urea -tanto salival como de la mucosa gástrica-, la transforma en NH_3 y CO_2 , favoreciendo que ocurra lo siguiente (Oksanen, 1997; Jerris 1995; Eaton, 1994):

- La nube de NH_3 resultante protege de la gran cantidad de ácido intragástrico al microorganismo; aún cuando éste es susceptible al pH ácido, los experimentos han demostrado que puede sobrevivir hasta 120 minutos a $\text{pH}=2$, si el medio contiene una concentración fisiológica de urea.
- El NH_3 produce algunos efectos tóxicos sobre la mucosa gastrointestinal, entre los

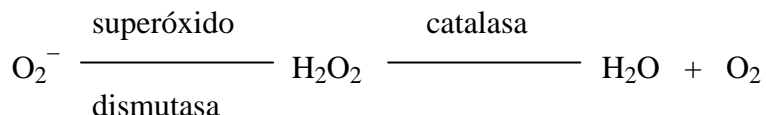
cuales se han comprobado la alteración de la síntesis de ácidos nucleicos y el crecimiento incontrolado de la masa celular; de hecho, este podría ser parte del mecanismo implicado en la carcinogénesis gástrica.

- Tanto el amoníaco como la bacteria provocan la inflamación de los tejidos estomacales, con infiltración de leucocitos polimorfonucleares que contribuyen a la lesión tisular, vía la liberación de radicales superóxido, enzimas hidrolíticas y otros agentes mediadores del proceso inflamatorio.



Mucinasas. La intensidad de los daños tisulares asociados a las infecciones por *H. pylori* correlaciona con el nivel de degradación de la capa de moco que recubre a las células gástricas. Dicha degradación se debe principalmente a la acción de una enzima denominada mucinasa que ejerce su acción catalítica sobre la mucina -el glucolípidos que constituye al moco-; en ausencia de moco, el microorganismo se adhiere más fácilmente al epitelio estomacal y, además, los iones H^+ difunden libremente hacia el tejido gástrico, en donde llevan a cabo la hidrólisis ácida de las sustancias estructurales de las células epiteliales (Blaser, 1994; Jerris, 1995).

Superóxido dismutasa-catalasa. *H. pylori* produce este complejo enzimático que, de manera acoplada, lo protege contra los efectos oxidantes del ion superóxido y del peróxido de hidrógeno endógeno -localizados en los lisosomas de los fagocitos-, al catalizar su conversión en agua y oxígeno molecular (Jerris, 1995).



Deshidrogenasa alcohólica. A partir del etanol ingerido, las notables cantidades de deshidrogenasa alcohólica (DHA) producidas por *H. pylori* suelen producir concentraciones importantes de acetaldehído; éste resulta muy irritante para las mucosas, además de formar aductos con diferentes proteínas celulares e inducir la peroxidación de los lípidos; es importante considerar que dichas reacciones también representan serios factores de riesgo en el origen del cáncer gástrico (Blaser, 1994; Jerris, 1995).

Citotoxina. La citotoxina vacuolizadora se detecta en aproximadamente el 50 % de las cepas de esta especie y, de acuerdo con diversos estudios efectuados *in vitro*, provoca la vacuolización de numerosos tipos de células animales (Jerris, 1995; Rudi, 1997; Ito, 1997; Spohn, 1997).

Si bien la ureasa y la citotoxina vacuolizadora de *Helicobacter pylori* son moléculas diferentes, se ha demostrado que la primera potencia la acción de la segunda, a través del NH_3 sintetizado; en algo similar podría participar la nicotina, lo cual explicaría la mayor

agresividad de los cuadros clínicos asociados a los fumadores. Aunque su mecanismo de acción aún se desconoce, se ha demostrado que las cepas productoras de citotoxina se detectan con mayor frecuencia en pacientes con úlceras gástricas y/o duodenales que en los que sólo padecen de gastritis; adicionalmente, cabe subrayar que las cepas que presentan tanto el gene *cagA*⁸ (que codifica para la síntesis de una proteína superficial asociada a la citotoxina) como el gene *vacA*⁸ (en el que reside la capacidad de síntesis de la toxina vacuolizadora), resultan aún más virulentas, e inclusive, se relacionan con el carcinoma gástrico en los jóvenes (Jerris, 1995; Rudi, 1997; Ito, 1997; Spohn, 1997).

Principales características del microorganismo

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa, microaerófila, que mide aproximadamente 0.5 a 2 μ de ancho por 1.5 a 4 μ de largo y presenta forma espiral; de hecho, en cortes histológicos se observa como “U” o “S”. Es relativamente exigente en cuanto a sus requerimientos nutricionales y desarrolla con dificultad *in vitro*; por tal motivo, su cultivo requiere de incubaciones de 3 a 7 días, a 35°C, en medios enriquecidos tales como el de infusión de cerebro y corazón y el tripticaseína soya, suplementados con sangre de caballo o suero fetal bovino, polienriquecimiento, vancomicina, ácido nalidíxico y anfotericina B (Blaser, 1994; Jerris, 1995; Andersen, 1997).

Finalmente, sus colonias son circulares, translúcidas, convexas, lisas, no pigmentadas y de 0.5 a 1 mm de diámetro y su identificación microbiológica se basa en diversas pruebas bioquímicas tales como la de oxidasa, catalasa, ureasa, reducción de nitratos y susceptibilidad a cefalotina (Jerris, 1995).

Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de laboratorio de los padecimientos asociados a *Helicobacter pylori* se basa en métodos “invasivos” y “no invasivos”. Entre los primeros, los más destacados incluyen la obtención de biopsias, raspados o aspirados gástricos, mediante endoscopia (Jerris, 1995; Eaton, 1994; Monteiro, 1997).

Una vez recolectados los especímenes, estos se someten a estudios histológicos, a la prueba de ureasa rápida y, desde luego, se cultivan en medios enriquecidos tales como los mencionados en la sección anterior.

Las biopsias se tiñen previamente por la técnica clásica y convencional de hematoxilina-eosina o, de ser posible, con plata, Giemsa o naranja de acridina, ya que con estas últimas se evidencia más fácilmente la presencia del microorganismo (Jerris, 1995).

Por su parte, la prueba rápida de la ureasa consiste en colocar pequeños trozos del tejido obtenido dentro de un tubo de ensayo que contiene caldo o agar urea de Christensen modificado; una reacción positiva será detectada por el cambio de coloración del

⁸ Cytotoxin-associated gene protein y vacuolyzing cytotoxin gene.

indicador rojo de fenol (al incrementarse el pH del medio) (Jerris, 1995; Fox, 1998).

El cultivo es considerado como el método ideal (frente al cual se compara la efectividad de las pruebas restantes) pero, dado que el microorganismo crece con dificultad *in vitro*, sólo se recomienda cuando se sospecha de que la cepa implicada es resistente a los fármacos más empleados en el tratamiento (Jerris, 1995).

Finalmente, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) representa una herramienta muy valiosa, tanto por su rapidez como por su confiabilidad, si bien requiere de equipo especializado. En este caso particular, los reportes destacan que los principales genes a amplificar son los que codifican para la síntesis de ureasas (*ureA* y *ureB*) o para el RNA 16S; cabe subrayar que la PCR no sólo pone en evidencia al microorganismo en las biopsias gástricas, sino que también lo hace en muestras de saliva, placa dentobacteriana y materia fecal (Monteiro, 1997).

Por lo que respecta a los métodos no invasivos, en esta categoría se agrupa a la prueba respiratoria de la ureasa y a las técnicas inmunoquímicas que ponen en evidencia y cuantifican anticuerpos séricos anti-*H. pylori*.

En la prueba respiratoria de ureasa, el enfermo ingiere -en ayunas- urea marcada con ^{13}C , la cual -en caso de encontrarse el microorganismo en el estómago- será hidrolizada por la ureasa bacteriana, produciéndose $^{13}\text{CO}_2$; este gas difundirá hacia la sangre y será excretado por los pulmones, siendo detectado en muestras respiratorias obtenidas a intervalos pre-establecidos; cabe mencionar que, en ausencia de ureasa, la urea marcada se desechará por la orina (Oskanen, 1997; Jerris, 1995).

Por otro lado, entre las técnicas más empleadas para detectar/cuantificar anticuerpos séricos destacan las de ELISA, aglutinación en látex y fijación de complemento. No obstante, la de mayor aceptación es la de ELISA, debido a que se pueden emplear diferentes antígenos: células completas del microorganismo, sustancias de membrana extraídas con glicina ácida, extractos de lisis causada por sonicación, e inclusive, ureasas producidas por *H. pylori* (Monteiro, 1997).

El antígeno se adsorbe al fondo de varios pozos de placas de microtitulación; a continuación, se adicionan diluciones seriadas del suero del paciente a cada pozo y, previa incubación de 1 hora a temperatura ambiente, el sistema se lava; posteriormente, se agrega el suero conjugado: anticuerpos anti- γ globulina humana marcados con peroxidasa y, finalmente, después de volver a incubar y lavar, se adiciona el sistema revelador (o-fenilendiamina/ H_2O_2). La reacción se detiene con ácido sulfúrico después de 30 minutos y se procede a realizar la lectura: la intensidad del color amarillo -medida a 492 nm en un fotocolorímetro- será directamente proporcional a la concentración de anticuerpos anti-*H. pylori* en el suero del enfermo. Cabe mencionar que dichos anticuerpos permanecen en títulos considerables durante varios años, aún después de que el paciente ha curado, por lo cual esta técnica no resulta de utilidad para establecer el diagnóstico de infección activa ni para valorar el tratamiento de la enfermedad (Rudi,

1997; Monteiro, 1997).

Tratamiento

Afortunadamente, los avances logrados en cuanto a la terapéutica de las infecciones debidas a *H. pylori* han permitido tratar exitosamente a numerosos enfermos de gastritis o de úlceras duodenales. En este sentido, se ha observado que los resultados dependen de que el paciente se apegue disciplinadamente a los regímenes seleccionados, y que estos incluyan el empleo de medicamentos realmente efectivos. Entre los fármacos más utilizados destacan los citados en las tablas 1 y 2, en las cuales también se señala que los esquemas son relativamente prolongados, buscando evitar las infortunadas pero numerosas recaídas; además, es muy oportuno considerar que ya se han empezado a detectar cepas de *H. pylori* resistentes al metronidazol, por lo que resulta muy adecuado utilizar combinaciones de varios agentes terapéuticos, tales como la integrada por amoxicilina con metronidazol y famotidina (Goh, 1997).

Tabla 1. Esquema terapéutico # 1

FÁRMACOS	DOSIS	DURACIÓN
Amoxicilina	500 mg, 3 veces diarias	2 semanas
Metronidazol	500 mg, 3 veces diarias	De 10 días a 2 semanas
Subsalicilato de bismuto	2 comprimidos, 3 veces diarias	2 semanas

Tabla 2. Esquema terapéutico # 2

FÁRMACOS	DOSIS	DURACIÓN
Tetraciclina	500 mg, 3 veces diarias	2 semanas
Metronidazol	250 mg, 3 veces diarias	2 semanas
Ranitidina	300 mg diarios, al acostarse	Hasta la cicatrización de la úlcera
Subsalicilato de bismuto	2 comprimidos, 4 veces diarias	2 semanas

III. *Chlamydia pneumoniae*: ATEROSCLEROSIS, ENFERMEDAD CORONARIA E INFARTO AL MIOCARDIO

Una sospecha cuyos sustentos crecen día con día daría lugar, en muy corto plazo, a una revolución de la cardiología: al parecer, la aterosclerosis, la enfermedad coronaria y los infartos al miocardio podrían estar relacionados con infecciones provocadas por una bacteria muy peculiar, susceptible a la acción de antibióticos comunes (Saikku, 1997; Blasi, 1997; Wimmer, 1996).

La fama de *Chlamydia pneumoniae* ha crecido con singular rapidez: hasta muy recientemente se le reconoció como una especie independiente, casi al tiempo de comprobarse su importante papel en afecciones respiratorias comunes tales como faringitis, sinusitis, bronquitis y neumonía; cabe mencionar que su frecuencia en este último padecimiento varía entre 5 y 22 %, dependiendo de la población analizada y que, de acuerdo con numerosos estudios seroepidemiológicos, más del 50 % de los adultos de cualquier zona geográfica del mundo presentan anticuerpos séricos contra el microorganismo (Blasi, 1997; Thomas, 1997; Gnarpe, 1997).

Hallazgos que relacionan a *C. pneumoniae* con las enfermedades cardiovasculares

La asociación de *C. pneumoniae* con las diversas afecciones cardiovasculares se ha venido fundamentando tanto en la detección/cuantificación de anticuerpos anti-*C. pneumoniae* presentes en el suero de los enfermos, como en la apropiada identificación del microorganismo en los tejidos lesionados.

Las observaciones más interesantes iniciaron en 1988, cuando Saikku y Leinonen encontraron, mediante microinmunofluorescencia indirecta, que el 70 % de pacientes con enfermedad coronaria y de sobrevivientes de infartos cardíacos presentaban títulos séricos muy elevados de anticuerpos IgA e IgG anti-*C. pneumoniae*⁹ (Saikku, 1997; Gnarpe, 1997).

En 1993, Shor realizó autopsias de individuos que habían fallecido debido a afecciones cardiovasculares y observó al microscopio electrónico que los cortes de las arterias lesionadas manifestaban la presencia de finas formas bacterianas cuya morfología se parecía a la de una pera -los clásicos cuerpos elementales que corresponden a la forma infectante de las clamidias-; la plena identificación de *C. pneumoniae* se llevó a cabo a través de pruebas inmunocitoquímicas y de PCR (Saikku, 1997).

En 1995, Summersgill, investigador de la Universidad de Louisville, Kentucky, aisló en cultivo al microorganismo a partir de los vasos sanguíneos de un enfermo isquémico de 56 años de edad (Blasi, 1997).

⁹ Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) se dividen en 5 clases: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, siendo las primeras tres las que aparecen con mayor frecuencia en los procesos infecciosos; generalmente, las concentraciones de cada clase difieren dependiendo de si sólo se tuvo contacto con el microorganismo que funge como inmunógeno o de si la enfermedad se encuentra activa o se padeció anteriormente.

Posteriormente, en 1996, Blasi y cols. comprobaron la presencia de *C. pneumoniae* en más de la mitad de las lesiones características de aneurisma aórtico, mediante técnicas de biología molecular; el mismo estudio realizado en Italia permitió a los investigadores descartar la participación directa de *Helicobacter pylori* en las zonas afectadas. A este respecto, es conveniente tomar en cuenta que ciertos autores han sugerido que esta última especie también podría desempeñar algún papel como agente causal de la aterosclerosis, en virtud de que los pacientes suelen contener títulos séricos elevados contra ella; sin embargo, no se ha logrado comprobar la presencia de *H. pylori* en los tejidos cardiovasculares dañados y algunas sospechas débiles sólo pueden sustentarse en factores de riesgo menos frecuentes (Blasi, 1997; Blasi, 1996; Juvonen, 1997).

Al margen de los diversos estudios efectuados en seres humanos, también se están llevando a cabo importantes experimentos en animales; por ejemplo, en el Hospital St. Michael de Toronto se infectaron con *C. pneumoniae* a doce conejos, por vía nasal, encontrándose que dos de ellos desarrollaron lesiones aórticas en tan sólo dos semanas. Análogamente, en Finlandia se infectaron por la misma vía a cinco conejos y tres de ellos desarrollaron las clásicas “placas ateroscleróticas”; en la actualidad, los mismos investigadores se encuentran tratando de establecer si la administración de antibióticos puede impedir el crecimiento de dichas lesiones (Gloria, 1997).

Posible origen de las afecciones cardiovasculares

Si bien los diversos trabajos realizados en todo el mundo han promovido el convencimiento generalizado sobre la importancia de *C. pneumoniae* en las afecciones arteriales y cardíacas, ello no modifica los conceptos tradicionales sobre los factores predisponentes que siempre se han relacionado con este tipo de padecimientos, destacando el tabaquismo, hipertensión arterial, altas concentraciones sanguíneas de fibrinógeno y de colesterol-lipoproteínas de baja densidad, obesidad, sedentarismo y estrés psicosocial (Thomas, 1997; Blasi, 1996; Gloria, 1997).

En este contexto, es muy claro que aún falta mucho por conocer acerca de los mecanismos involucrados en el supuesto origen o agravamiento de las lesiones cardiovasculares; sin embargo, algunas teorías que se vienen señalando en esta materia parecen coincidir en lo siguiente:

Las células mononucleares (monocitos y macrófagos) engloban a las clamidias que se encuentran afectando al tracto respiratorio, pero éstas se reproducen eficazmente dentro de las primeras; de esta manera, cuando las células mononucleares se desplazan hasta las arterias -en donde su presencia es necesaria para eliminar los residuos de ácidos grasos y colesterol-, terminan infectando con *C. pneumoniae* a las células arteriales (endoteliales) con las cuales interactúan¹⁰ (Saikku, 1997).

¹⁰ Se ha demostrado ampliamente la capacidad de *C. pneumoniae* para reproducirse dentro de las células mononucleares y endoteliales, así como en las capas musculares lisas.

Consecuentemente, la reproducción de esta bacteria en las células de los vasos y capilares sanguíneos desencadena -como respuesta del individuo afectado- la generación de un proceso inflamatorio muy severo -en el que ocurre una gran actividad proteolítica y oxidante- que conduce a la formación de protuberancias en las paredes del endotelio, lesiones a las cuales se ha asignado el nombre de “placas ateroscleróticas” (Saikku, 1997; Juvonen, 1997; Gloria, 1997).

Estas últimas obstruyen el flujo sanguíneo normal, dando lugar a la formación de coágulos capaces de taponar venas y arterias -sobre todo a las que se relacionan con el cerebro y el corazón- pero, adicionalmente, podrían favorecer la fijación de colesterol y ácidos grasos al tejido involucrado: al parecer, el lipopolisacárido (LPS) presente en la pared celular del microorganismo, constituido en su mayor parte por ácido cetodesoxioctanoico (KDO), contiene varios residuos que reaccionan eficazmente con las lipoproteínas de baja densidad¹¹. A este respecto, ese podría ser uno de los papeles de numerosos complejos inmunes anticuerpo-LPS que se encuentran sobre el tejido afectado y circulando en la sangre de pacientes con enfermedad cardíaca crónica (Blasi, 1997; Linnanmäki, 1993).

Aún cuando lo antes mencionado tiene bastante sentido, hasta ahora no ha sido posible establecer si el microorganismo promueve la fijación de los ácidos grasos y el colesterol a las paredes de los vasos o si, por el contrario, dicha acumulación de compuestos lipídicos favorece la posterior invasión clamidial de las células endoteliales. En todo caso, otro consistente hallazgo coincidental reside en la presencia de clamidias que se reproducen dentro de los macrófagos sin provocar su destrucción (Thomas, 1997).

Principales características del microorganismo

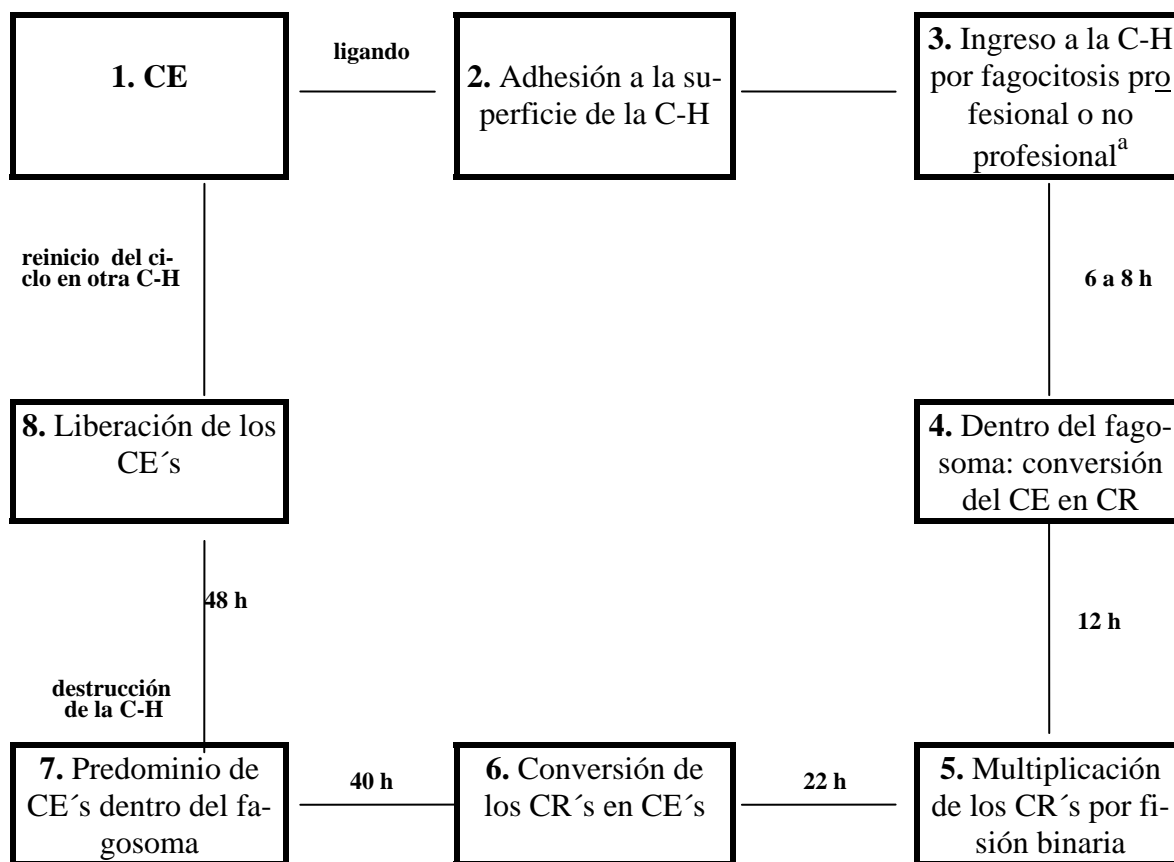
Las clamidias son parásitos intracelulares obligados que comparten numerosas características con el resto de las bacterias: presentan dos ácidos nucleicos (DNA y RNA), poseen una envoltura celular muy semejante a la pared celular de las Gram negativas, sintetizan la mayor parte de sus proteínas y manifiestan una clara susceptibilidad a varios agentes antibacterianos, entre los que destacan la tetraciclina y la eritromicina (Garza, 1993).

No obstante, su clasificación como bacterias tardó algún tiempo, debido a que también exhiben varias características exclusivas: **a)** son parásitos energéticos, debido a que no producen ATP -y por ello emplean el de la célula hospedadora-; **b)** no sintetizan hexoquinasa, una enzima indispensable para dar inicio a diferentes rutas metabólicas; **c)** presentan un ciclo vital en el que participan dos diferentes formas celulares: el cuerpo elemental (CE), que corresponde a una bacteria oval de 0.25 a 0.4 μ de diámetro, con centro denso -debido a la acumulación de los ribosomas y ácidos nucleicos en su parte central- y cuya misión consiste en actuar como la forma infectante, para lo cual presenta una adhesina o “ligando” capaz de fijarse a cualquier célula de su hospedador. Por su parte, el cuerpo reticular (CR) tiene un diámetro de 0.5 a 1 μ y representa la forma

¹¹ Las lipoproteínas de baja densidad son las que se asocian a la aterosclerosis, a la enfermedad coronaria y a los infartos cardíacos.

metabólicamente activa, es decir, aquella que posee capacidad de reproducción. La tabla 4 resume las diferencias principales entre el CE y el CR, y el diagrama 3 presenta los eventos principales del ciclo vital de las clamidias (Garza, 1993).

Diagrama 4. Eventos principales del ciclo vital de *Chlamydia* (Garza, 1993).



CLAVE: CE = cuerpo elemental; CR = cuerpo reticular (plurales CE's y CR's); C-H = célula hospedadora; ^a = la fagocitosis profesional es la realizada por los fagocitos que cuentan con la maquinaria para matar parásitos y, la no profesional, es la llevada a cabo por otras células del hospedador, por influencia del parásito.

Expectativas en cuanto al diagnóstico de laboratorio y al tratamiento

Aún cuando se pueden realizar observaciones por microscopía electrónica, cultivos, inmunocitoquímica y técnicas de biología molecular, todo parece indicar que el diagnóstico inicial podrá realizarse confiablemente mediante la detección/cuantificación de anticuerpos IgA anti-*C. pneumoniae* en el suero del enfermo. A este respecto, en el caso de las enfermedades cardiovasculares, las observaciones han mostrado que los anticuerpos de dicha clase IgA parecen ser los más representativos, ya que su concentración es nula o muy

baja en personas ajenas a este tipo de padecimientos (Blasi, 1996; Juvonen, 1997; Gupta, 1997).

Por otra parte, la plena demostración de que *C. pneumoniae* desempeña un papel determinante en el origen o agravamiento de la aterosclerosis y/o en la frecuencia de los infartos cardíacos, resultaría realmente esperanzadora¹²: tanto las personas predispuestas como las víctimas de los clásicos ataques al corazón se podrían controlar o aliviar más fácilmente -disminuyendo la probabilidad de futuros eventos cardiovasculares-, mediante la administración de antibióticos macrólidos tales como la azitromicina y la claritromicina (Thomas, 1997; Gupta, 1997).

De hecho, en el Hospital St. George de Londres se está tratando con azitromicina a poco menos de cincuenta sobrevivientes de infartos cardíacos y, por lo pronto, se ha observado que en un lapso de seis meses dichos enfermos han sintetizado menor cantidad de elementos participantes en el proceso inflamatorio que sus respectivos controles, a quienes sólo se les ha venido administrando un placebo (Gupta, 1997).

COMENTARIOS FINALES

El título del presente artículo intenta reflejar el gran impacto que pueden representar para el ser humano los recientes hallazgos asociados a tres bacterias patógenas:

- a) Por lo que respecta a *Vibrio cholerae*, ésta podría ocasionar en breve la que sería su octava pandemia mundial de cólera, estando involucrada una cepa no O1 conocida como O139 Bengal.
- b) En cuanto a *Helicobacter pylori*, se ha confirmado debidamente que se trata del agente causal de la gastritis y de las úlceras gástricas y duodenales -quedando por confirmar si también provoca el cáncer gástrico-; dichos padecimientos son tan frecuentes y perjudiciales que, por tal motivo, ha salido a la luz pública la revista científica "*Helicobacter*".
- c) Finalmente, aún cuando todavía existen numerosas dudas por aclarar, *Chlamydia pneumoniae* representa una probable causa de aterosclerosis, de enfermedad coronaria y de infarto al miocardio, padecimientos que -de comprobarse las observaciones iniciales-, en el futuro inmediato, podrían empezar a disminuir o a resolverse de una manera relativamente fácil, mediante regímenes terapéuticos diseñados a base de antibióticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andersen, A.P., Elliott, D.A., Lawson, M., Barland, P., Hachter, V.B. and Puszkin, E.G., Growth and morphological transformations of *Helicobacter pylori* in broth media, *J Clin*

¹² Algunos autores consideran que la aterosclerosis es el principal problema de salud, tanto en los países industrializados como en los de desarrollo medio, ya que en todos ellos puede representar la primera causa de mortalidad.

Microbiol. **35**(11), 2918-2922 (1997).

Asaka, M., Kudo, M., Kato, M., Sugiyama, T. and Takeda, H., Long-term *Helicobacter pylori* infection from gastritis to gastric cancer, *Aliment Pharmacol Ther.* **12**(Suppl. 1), 9-15 (1998).

Blaser, M. and Parsonnet J., Parasitism by the “slow” bacterium *Helicobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis, *J Clin Invest.* **94**, 4-8 (1994).

Blasi, F., Cosentini, R., Raccanelli, R., Massari, F.M., Arosio, C., Tarsia, P. and Allegra, L., A possible association of *Chlamydia pneumoniae* infection and acute myocardial infarction in patients younger than 65 years of age, *Chest.* **112**(2), 309-312 (1997).

Blasi, F., Denti, F., Erba, M., Cosentini, R., Raccanelli, R., Rinaldi, A., Fagetti, L., Esposito, G., Ruberti, U. and Allegra, L., Detection of *Chlamydia pneumoniae* but not *Helicobacter pylori* in atherosclerotic plaques of aortic aneurysms, *J Clin Microbiol.* **34**, 2766-2769 (1996).

Chandrakumar, K., Vaira, D. and Hobsley, M., Duodenal ulcer, *Helicobacter pylori*, and gastric secretion, *Gut.* **35**, 1033-1036 (1994).

Eaton, K. and Krakowka, S., Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*, *Infect Immun.* **62**(9), 3604-3607 (1994).

Falkind, S., Stark, M., Albert, M.J., Uhlen, M., Lundeberg, J. and Weintraub, A., Cloning and sequencing of a region of a *Vibrio cholerae* O139 Bengal and its use in PCR based detection, *J Clin Microbiol.* **34**(12), 2904-2908 (1996).

Faruque, S.M., Ahmed, K.M., Abdul, A.R.M., Qadri, F., Siddique, A.K. and Albert, M.J., Emergence of a new clone of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 byotype El Tor displacing *V. cholerae* O139 Bengal in Bangladesh, *J Clin Microbiol.* **35**(3), 624-630 (1997).

Figura, N., Identifiable *Helicobacter pylori* strains or factors important in the development of duodenal ulcer disease, *Helicobacter.* **2**(1), S3-S12 (1997).

Fox, J.G., *Helicobacter* species and *in vivo* models of gastrointestinal cancer, *Aliment Pharmacol Ther.* **12**(Suppl.1), 37-60 (1998).

Garza, V.R., Peniche, Q.E. y Manero, B.S.M., El diagnóstico de laboratorio de las enfermedades ocasionadas por *Chlamydia trachomatis*, *Lab-acta.* **5**(1), 29-35 (1993).

Gloria, B.F., Meaney, M.E., Valero, E.G. y Vela, H.A., La relación entre *Chlamydia pneumoniae* y las lesiones aterosclerosas aórticas, *Arch Inst Cardiol Méx.* **67**, 17-23 (1997).

Gnarpe, H., Gnarpe, J., Gästrin, B. and Hallander, H., *Chlamydia pneumoniae* and myocarditis, *Scand J Infect Dis.* **104**, 50-52 (1997).

Goh, K.L., Parasakthi, N., Chuah, S.Y. and Toetsch M., Combination amoxicillin and metronidazole with famotidine in the eradication of *Helicobacter pylori*, a randomized, double-blind comparison of a three times daily and twice daily regimen, *Eur J Gastroenterol Hepatol.* **9**(11), 1091-1095 (1997).

Gupta, S., Elevated *Chlamydia pneumoniae* antibodies, cardiovascular events, and azithromycin in male survivors of myocardial infarction, *Circulation.* **96**(2), 404-407 (1997).

Ito, Y., Azuma, T., Ito S., Miyagi, H., Hirai, M., Yamazaki, Y., Sato, F., Kato, T., Kohli, Y. and Kuriyama, M., Analysis and typing of the *vacA* gene from *cagA*-positive strains of

- Helicobacter pylori* isolated in Japan, *J Clin Microbiol.* **35**(7), 1710-1714 (1997).
- Jaskowski, T.D., Martins, T.B., Hill, H.R. and Litwin, C.M., Immunoglobulin A antibodies to *Helicobacter pylori*, *J Clin Microbiol.* **35**(11), 2999-3000 (1997).
- Jerris, R.C., *Helicobacter* "in" Manual of Clinical Microbiology, 6th edition, Murray P.R. et al (Eds), American Society for Microbiology, Washington, D.C., (1995) 492-498.
- Juvonen, J., Juvonen, T., Laurila, A., Alakärppä, H., Lounatmaa, K., Surcel, H.M., Leinonen, M., Kairaluoma, M.I. and Saikku, P., Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in the walls of abdominal aortic aneurysms, *J Vasc Surg.* **25**(3), 505 (1997).
- Linnanmäki, E., Leinonen, M., Mattila, K., Nieminen, S., Valtonen, V. and Saikku, P., *Chlamydia pneumoniae*-specific circulating immune complexes in patients with chronic coronary heart disease, *Circulation.* **87**(4), 1130-1134 (1993).
- Madico, G., Checkley, W., Gilman, H., Bravo, N., Cabrera, L., Calderón, M. and Ceballos, A., Active surveillance for *Vibrio cholerae* O1 and vibriophages in sewage water as a potential tool to predict cholera outbreaks, *J Clin Microbiol.* **34**(12), 2968-2972 (1996).
- McLaughlin, J.C., *Vibrio* "in" Manual of Clinical Microbiology, 6th edition, Murray, P.R. et al (Eds), American Society for Microbiology, Washington, D.C., (1995), 465-476.
- Monteiro, L., Cabrita, J. and Megraud, F., Evaluation of performances of three DNA enzyme immunoassays for detection of *Helicobacter pylori*, *J Clin Microbiol.* **35**(11), 2931-2936 (1997).
- Mooi, F.R. and Bik, E.M., The evolution of epidemic *Vibrio cholerae* strains, *Trends Microbiol.* **5**(4), 161-165 (1997).
- Morris, J.G., Losonsky, G.E., Johnson, J.A., Tacket, C.O., Nataro, J.P., Panigrahi, P. and Levin, M.M., Clinical and immunologic characteristics of *Vibrio cholerae* O139 Bengal infection in North American volunteers, *J Infect Dis.* **171**, 903-908 (1995).
- Oksanen, A., Bergstrom, M., Sjostedt, S., Gad, A., Hammardlund, B. and Seensalu, R., Accurate detection of *Helicobacter pylori* infection with a simplified 13C urea breath test, *Scand J Clin Lab Invest.* **57**(8), 689-694 (1997).
- Osawa, R., Okitsu, T, Sata, S. and Yamai S., Rapid screening method for identification of cholera toxin-producing *Vibrio cholerae* O1 and O139, *J Clin Microbiol.* **35**(4), 951-953 (1997).
- Roth, J.A., Bolin, C.A., Brogden, K.A., Minion, F.C. and Wannemuehler, M.J., Virulence mechanisms of bacterial pathogens, 2nd edition, American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1995).
- Rudi, J., Kolb, C., Maiwald, M., Zuna, I., von Herbay, A., Galle, P.R. and Stremmel, W., Serum antibodies against *Helicobacter pylori* proteins VacA and CagA are associated with increased risk for gastric adenocarcinoma, *Dig Dis Sci.* **42**(8), 1652-1659 (1997).
- Sachs, G., Prinz, C.K. and Hersey, S.J., Acid Related Disorders: Mystery to Mechanism: Mechanism to Management, SUSHU Communications, Inc, Palm Beach, Florida, (1995) 42-63
- Saikku, P., *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis - an update, *Scand J Infect Dis.* **104**, 53-56 (1997).
- Salyers, A.A. and Whitt, D.D., Bacterial pathogenesis, a molecular approach, American

- Society for Microbiology, Washington, D.C. (1994).
- Secretaría de Salud, Boletín “Epidemiología”, Dirección General de Epidemiología, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, **13**(52), 7 (1996).
- Secretaría de Salud, Boletín “Epidemiología”, Dirección General de Epidemiología, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, **14**(53), 8 (1998).
- Spohn, G., Beier, D., Rappuoli, R. and Scarlato, V., Transcriptional analysis of the divergent *cagAB* genes encoded by the pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, *Trends Microbiol.* **35**(7), 1710-1714 (1997).
- Thomas, G.N., Scheel, O., Koehler, A.P., Bassett, D.C.J. and Cheng, A.F.B., Respiratory chlamydial infections in a Hong Kong teaching hospital and association with coronary heart disease, *Scand J Infect Dis.* 104S, 30-33 (1997).
- Wimmer, M.L.J., Sandmann-Strupp, R., Saikku, P. and Haberl, R.L., Association of chlamydial infection with cerebrovascular disease, *Stroke.* **27**(12), 2207-2210 (1996).