

ELS PREMIS NOBEL
DE L'ANY 2005
SOBRE EL
PREMI NOBEL DE FISIOLOGIA
O MEDICINA
CONCEDIT A
BARRY J. MARSHALL
I J. ROBIN WARREN,
PER RICARD GUERRERO,
CATEDRÀTIC DE MICROBIOLOGIA
DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA
I MEMBRE DE LA SECCIÓ
DE CIÈNCIES BIOLÒGIQUES
DE L'INSTITUT D'ESTUDIS CATALANS

**DE LA HIPÒTESI AL PARADIGMA: EL CAS
D'*HELICOBACTER PYLORI***

RESUM

El Premi Nobel de Fisiologia o Medicina de l'any 2005 es va concedir a dos metges australians, Barry J. Marshall i J. Robin Warren, per un descobriment en el camp de la microbiologia que van fer el 1982, quan van descriure la presència d'un bacteri, *Helicobacter pylori*, en l'estómac humà, i van relacionar-lo amb la producció de gastritis i úlceres pèptiques. Es podria pensar que, davant l'evidència, la comunitat mèdica va acceptar immediatament la proposta de Marshall i Warren. No va ser així en absolut; canviar una idea tan profundament arrelada entre els metges de tot el món no va ser una tasca fàcil. Calia un canvi radical de pensament, un canvi de paradigma, que conduís a modificar la pràctica mèdica i la producció de medicaments específics. Aquest canvi solament es va produir cap al 1994, dotze anys després del descobriment. Durant molts mil·lennis d'evolució, els éssers humans han desenvolupat una relació íntima i complexa amb els microorganismes. Encara que ara coneixem moltes de les seves activitats, quan parlem dels microorganismes sempre en recordem la vessant negativa, com a agents causants de malalties infeccioses, de la contaminació i del deteriorament de productes alimentaris. No obstant això, comencem a adonar-nos que els microorganismes també poden contribuir al manteniment de la salut. El descobriment que ha merescut el Premi Nobel de l'any 2005 ens ensenya que la interacció microbi-malaltia és una relació ecològica complexa, que necessita un estudi més profund per tal de comprendre millor les malalties infeccioses i per a aconseguir un tractament més eficaç contra els microorganismes patògens.

PARAULES CLAU: *Helicobacter*, malalties infeccioses, úlcers gastroduodenal, cultiu axènic, microbiota normal o patògena.

ABSTRACT

The 2005 Nobel Prize in Physiology or Medicine was awarded to two Australian physicians, Barry J. Marshall and J. Robin Warren, for a discovery in the field of microbiology that they made in 1982, when they described the presence of a bacterium, *Helicobacter pylori*, in the human stomach, and they related it to the production of gastritis and peptic ulcers. It would be sensible to think that, in the face of such an evidence, the medical community would have immediately accepted the audacious proposal by Marshall and Warren. It was not so, however; to change an idea so deeply rooted among physicians worldwide was not an easy task. A radical change of thinking was needed, a change of paradigm that led to modify the medical practice and the production of specific drugs. Only in 1994 did this change take place, twelve years after Marshall and Warren's discovery. Over many millenia of evolution, human beings have developed a close, complex relationship with microorganisms. Even though we currently know many of their activities, when we talk about microorganisms, we always think of their negative role as causal agents of infectious diseases, pollution and food spoilage. However, we have realized that microorganisms can also contribute to maintaining health. The discovery that deserved the 2005 Nobel Prize shows us that microbe-disease interactions are complex ecological relationships that need further study for a better understanding of infectious diseases and to find more efficient treatments against pathogenic microorganisms.

KEY WORDS: *Helicobacter*, infectious diseases, gastroduodenal ulcer, axenic culture, normal or pathogenic microbiota.

El Premi Nobel de Fisiologia o Medicina de l'any 2005 ha estat concedit a dos metges australians, Barry J. Marshall i J. Robin Warren, per un descobriment en el camp de la microbiologia que van fer el 1982, quan van descriure la presència d'un bacteri, *Helicobacter pylori*, en l'estómac humà, i van relacionar el microorganisme amb la producció de gastritis i úlceres pèptiques. El discurs de recepció del Premi Nobel de Marshall es titulava «*Helicobacter. The Good, the Bad and the Ugly*»; una referència no solament a la famosa pel·lícula de Sergio Leone, sinó també al fet que la medicina ha de canviar la manera de considerar les malalties infeccioses i els microorganismes. Els microorganismes colonitzen totes les superfícies externes del cos humà, proliferen en el tub digestiu i mantenen un equilibri dinàmic amb el nostre organisme, mantenint-lo habitualment en estat sa, perquè impedeixen que hi proliferin microorganismes patògens. La relació entre els microorganismes sapròfits, fins i tot beneficiosos i imprescindibles, i els clarament nocius, fins i tot mortals, no sempre és clara. Depèn d'un delicat equilibri entre l'hoste i els microorganismes i, per tant, de les variacions de les condicions del medi. Aquest equilibri és allò que marca la profunda diferència entre la salut i la malaltia i, finalment, entre la vida i la mort.

Barry J. Marshall (nascut el 1951, a Kalgoorlie, Austràlia) i J. Robin Warren (nascut el 1937, a Adelaide, Austràlia) van aportar proves que la presència d'*Helicobacter pylori* en l'estómac estava associada a la inflamació de la mucosa gàstrica. Per a la comunitat mèdica, el fet de reconèixer que l'úlcera pèptica o gastroduodenal podia estar causada per un microorganisme significava un profund canvi de paradigma: la malaltia havia de deixar de ser considerada una afecció psicosomàtica, sovint hereditària i que, en casos greus, tenia com a únic remei la cirurgia. Segons Marshall i Warren, la malaltia era infecciosa, estava produïda per un bacteri i, per tant, podia ser tractada amb antibiòtics.

BARRY J. MARSHALL

Barry J. Marshall va néixer el 30 de setembre de 1951 a Kalgoorlie, Austràlia Occidental. Es va llicenciar en medicina a la Universitat d'Austràlia Occidental el 1974. Va treballar com a investigador en el Royal Perth Hospital; posteriorment es va traslladar a la Universitat de Virgínia, i finalment a la Universitat d'Austràlia Occidental (des de 1997). Entre els premis rebuts durant la seva carrera investigadora i docent cal destacar: el Premi Warren Alpert (compartit amb J. R. Warren, 1994), el Premi Paul Ehrlich (també compartit amb J. R. Warren, 1997), la Medalla Buchanan (Royal Society, 1998), la Medalla Benjamin Franklin de les Ciències de la Vida (Filadèlfia, 1999) i la Medalla Australiana del Centenari (2003).

J. ROBIN WARREN

J. Robin Warren va néixer l'11 de juny de 1937 a Adelaide, Austràlia del Sud. Es va llicenciar en medicina a la Universitat d'Adelaide el 1961. Va treballar, per ordre d'antiguitat, al

65



FIGURA 1. Fotografia de Barry J. Marshall (esquerra) i J. Robin Warren, el desembre de 2005. Copyright © Nobel Web AB 2005. Fotografia: Hans Mehlin.

Queen Elizabeth Hospital, Royal Melbourne Hospital i Royal Perth Hospital. És membre distingit del Royal College of Pathologists d' Austràlia. Va fer la conferència inaugural en el primer congrés sobre *Helicobacter* del Pacífic occidental. Alguns altres mèrits i premis són compartits amb B. J. Marshall.

TOTHOM HO HAVIA VIST PERÒ NINGÚ NO S'HO CREIA

En una mica més de cent anys d'història dels premis Nobel, poques vegades el de Fisiologia o Medicina havia estat concedit al descobriment d'una malaltia infecciosa d'origen bacterià (taula 1).

TAULA 1

Premis Nobel de Fisiologia o Medicina relacionats amb la microbiologia (adaptat de Guerrero, 2005)

Any	Científic	Treball	Camp*
1901	Emil Adolf von Behring	Pel treball en teràpia sèrica, concretament per la seva aplicació contra la diftèria	I
1902	Ronald Ross	Pel treball sobre la malària	P
1905	Robert Koch	Per les investigacions i el descobriment de la tuberculosi	B
1907	Alphonse Laveran	En reconeixement del paper que tenen els protists com a agents causants de determinades malalties	P
1908	Paul Ehrlich Ilya Mechnikov	En reconeixement del treball en immunitat	I
1919	Jules Bordet	Pels treballs relacionats amb la immunitat	I
1926	Johannes Fibiger	Pel descobriment de <i>Spiroptera carcinoma</i> (un nematode —un cuc— que semblava que produïa càncer!)	P
1927	Julius Wagner von Jauregg	Pel valor terapèutic de la inoculació de la malària en el tractament de la demència paralítica	P
1928	Charles-Jules-Henri Nicolle	Pel treball sobre el tifus epidèmic	B
1939	Gerhard Domagk	Pel descobriment dels efectes antibacterians del prontosil	A

TAULA 1 (Continuació)

Any	Científic	Treball	Camp*
1945	Ernst B. Chain Alexander Fleming Howard Walter Florey	Pel descobriment i desenvolupament de la penicil·lina i dels seus efectes curatius en diferents malalties infeccioses	A
1951	Max Theiler	Pel descobriment de la febre groga i de com combatre-la	V
1952	Selman A. Waksman	Pel descobriment de l'estreptomicina, el primer antibiòtic efectiu contra la tuberculosi	A
1954	John F. Enders Frederick C. Robbins Thomas H. Weller	Pel descobriment de la capacitat del virus de la poliomièlitis en créixer en diferents teixits cel·lulars	V
1960	Frank Macfarlane Burnet Peter Brian Medawar	Pel descobriment de la tolerància immunitària adquirida	I
1966	Francis Peyton Rous [Charles B. Huggins]	Pel descobriment de la inducció de tumors per virus (treballs fets el 1912!) [Pel descobriment del tractament hormonal del càncer de pròstata]	V
1972	Gerald M. Edelman Rodney R. Porter	Pel descobriment de l'estructura química dels anticossos	I
1975	David Baltimore Renato Dulbecco Howard M. Temin	Pel descobriment de la interacció dels virus tumorals i el material genètic de la cèl·lula	V
1976	Baruch S. Blumberg D. Carleton Gajdusek	Pels estudis de l'origen i disseminació de les malalties infeccioses	V-B-P
1997	Stanley B. Prusiner	Pel descobriment dels prions	V
2005	Barry J. Marshall J. Robin Warren	Pel descobriment del bacteri <i>Helicobacter pylori</i> i del seu paper en les malalties gastroduodenals	B

*Camp (o relacionat): A, antibiòtics; B, bacteriologia; I, immunologia; P, parasitologia i protistologia; V, virus i prions.

Els histopatòlegs havien detectat la presència de bacteris espirals en l'estómac humà des d'abans de 1906. I encara que observacions similars es van fer en repetides ocasions, no cridaven l'atenció perquè els bacteris observats no podien ser cultivats. A més, es pensava que l'estómac no podia tenir microorganismes de manera permanent, a causa del baix pH (de 0 a 1) del suc gàstric. El cultiu fet per Marshall d'un nou bacteri a partir de la mucosa gàstrica, el 1982, va fer trontollar

les idees anteriors; el bacteri aïllat va ser anomenat *Helicobacter pylori* (bacteri helicoides del pílor). Marshall i Warren van descriure bacteris espirals o corbats en seccions histològiques de la mucosa gàstrica; a més, podien trobar bacteris de la mateixa forma en teixits gàstrics ulcerats o malignes. La prova definitiva van ser els assaigs que mostraven que l'eliminació dels bacteris canviava totalment el desenvolupament clínic de l'úlcera. Aquestes observacions van ser confirmades per Marshall mateix, qui va ingerir (voluntàriament) un cultiu del bacteri aïllat i en pocs dies va tenir gastritis, un prelude de l'úlcera. Però el tractament amb antibiòtics el va guarir. (Warren no podia afegir-se a l'experiment perquè ja patia d'úlcera gastroduodenal.) Després, altres persones que patien úlceres gastroduodenals van ser tractades amb èxit amb antibiòtics antibacterians; això va demostrar clarament que la causa de la malaltia era un bacteri. El 1994, *Helicobacter pylori* va ser el primer bacteri, i el segon organisme infecciós, després del virus de l'hepatitis B, que va ser considerat un carcinogen de classe I, segons els criteris de l'Organització Mundial de la Salut.¹

Es podria pensar que, davant l'evidència, la comunitat mèdica va acceptar immediatament l'agosarada proposta de Marshall i Warren. No va ser així en absolut; canviar una idea tan profundament arrelada entre els metges de tot el món no va ser una tasca fàcil. Moltes persones es van resistir durant anys a creure que les úlceres tenien origen infecciós. La idea anava en contra del «dogma» tradicional, acceptat sense dubte per dècades: que la causa de la malaltia era l'estrès i l'excés d'àcid. Si la causa real era un bacteri, les freqüents extirpacions del teixit ulcerat s'haurien d'aturar. La gran quantitat de medicaments produïts per moltes empreses farmacèutiques deixarien de

1. Com a curiositat històrica, es pot mencionar aquí que el Premi Nobel de 1926 (taula 1) va ser concedit per la proposta que un nematode «era carcinogen».

vendre's. Calia un canvi radical de pensament, un canvi de paradigma, que conduís a modificar la pràctica mèdica i la producció de medicaments específics. Aquest canvi solament es va produir cap al 1994, dotze anys després del descobriment.

Per a entendre què significava el canvi de paradigma, és a dir, el reconeixement de l'origen microbià d'una malaltia perfectament coneguda, molts anys després de l'època gloriosa dels descobriments de Koch i Pasteur, i dels seus col·laboradors o deixebles directes (finals del segle XIX i principis del XX), cal anar enrere en el temps i repassar històricament la visió que els científics han anat tenint de l'immens i «invisible» món dels microbis.

LES TRES EDATS DE LA MICROBIOLOGIA

El desenvolupament científic és una contínua interacció entre fets i idees. Els avenços en el coneixement del món natural van normalment precedits d'alguna innovació tecnològica que permet mesurar i observar alguna cosa nova, o bé realitzar nous plantejaments experimentals, prèviament impossibles. Les tècniques només són eines; cal tenir una preparació intel·lectual per a assolir un avançament real en el coneixement científic («la casualitat només es presenta en les ments preparades», va dir Louis Pasteur).

En el descobriment dels microorganismes podem destacar tres grans edats o etapes epistemològiques: l'edat microscòpica, l'edat patogènica i l'edat ecològica.

L'edat microscòpica

En la primera, un progrés tecnològic, el microscopi, va permetre l'observació d'unes «bestioles diminutes», d'un món prèviament desconegut i que s'estenia per tot arreu on es mirés: les aigües, els sòls, els cossos dels animals, les plantes, el mateix organisme

humà. Però aquesta presència «universal» no va produir cap avançament intel·lectual, fora del coneixement mitjançant l'observació. Era un món nou i «invisible» que no tenia cap paper aparent, si no ho era el de ser-hi. Els microorganismes existien, tenien una forma definida en l'espai i perduraven en el temps, però només es consideraven simples «curiositats». Era impossible pensar que aquelles criatures tinguessin alguna funció. I aquest coneixement exclusivament observacional va durar pràcticament dos segles, des de la meitat del XVII fins a la meitat del XIX.

Ben avançat el segle XVII, una complexa sèrie de circumstàncies i l'interès comú pels microscopis van conduir dues persones, Robert Hooke (1635-1703), científic anglès, membre de la Royal Society de Londres, i Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723), comerciant holandès de teles, al descobriment de l'univers microbià. El llibre *Micrographia or some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses with observations and inquiries thereupon* (1665) és la primera descripció publicada del món microscòpic i l'acta fundacional de les ciències biològiques. És, a més, un dels primers llibres científics de l'edat moderna escrits en llengua vulgar (anglès), no en llatí. Hooke disposava d'un microscopi compost, és a dir, essencialment com els microscopis fotònics actuals, encara que molt menys potent i amb moltes aberracions òptiques. El llibre il·lustra i descriu diversos objectes biològics: esponges, rotífers, el fong *Mucor*, un diminut «cargol»,² la famosa primera observació de cel·les (*cells*) en el suro, etc.

Leeuwenhoek construïa els seus microscopis, que eren molt potents per a l'època, malgrat que eren pròpiament lupes, ja que tenien una sola lent. Va construir-ne més de tres-cents, amb els quals va observar i descriure l'esperma i els eritròcits de molts animals, molts invertebrats microscòpics, els llevats, etc. Però la seva contribució transcendental per a la biologia va ser el

2. Que era en realitat una globigerina, és a dir, un protist.

descobriments dels protists i dels bacteris. Leeuwenhoek, sense formació científica però dotat d'una gran paciència, habilitat i curiositat, va observar els primers protists (principalment ciliats) en l'aigua el 1674. Els va anomenar *beesjes* (petites bèsties), o *cleijne Schepsels* (organismes diminuts), segons va escriure en holandès, o *animalculi* (animalons), en llatí, d'acord amb el que va aparèixer quan les seves cartes van ser publicades per la Royal Society.³ Anys després, el 1683, va observar per primera vegada bacteris, en la superfície de les seves dents. Curiosament, alguns eren espiroquetes, éssers petitíssims comparats fins i tot amb la resta del diminut món microbià. A *Microscopium* (1678), Hooke confirma les observacions de Leeuwenhoek, fet que augmenta la reputació i celebritat del botiguer holandès.

És important destacar aquí que, com ha passat en altres ocasions en la història de la ciència, la curiositat, l'esforç i la constància d'una persona van compensar la manca de formació científica o de preparació intel·lectual per a fer un descobriment. Leeuwenhoek no era un científic, no va escriure articles ni llibres sobre les seves observacions. A la seva casa de Delft, on va viure gairebé tota la seva vida, construïa els seus propis diminuts microscopis, examinava tots els materials que tenia al voltant i escrivia seguidament multitud de cartes amb les seves observacions (en holandès, l'única llengua que coneixia) a molts diferents corresponents. Alguns editors murrins van reunir part de les cartes i les van publicar en una magnífica col·lecció en cinc volums, sota el títol general d'*Arcana Naturae Detecta* («Descobriments dels secrets de la natura»), impresa encara en vida de l'autor.⁴

3. DOBELL (1932).

4. Una d'aquestes col·leccions és un dels tresors bibliogràfics del Fons Salvador de l'Institut Botànic de Barcelona (*Arcana Naturae Detecta*, Leiden, Joh Arnold Langerak, cinc volums, de 1718 a 1722, amb un total de 165 cartes, de les 375 que Leeuwenhoek va escriure a la Royal Society).

L'edat patogènica

La importància dels microorganismes com a causants de les malalties infeccioses no va ser coneguda per la comunitat científica, ni molt menys per la població en general, fins ben avançat el segle XIX. Tradicionalment es creia que les malalties eren conseqüència o bé de forces sobrenaturals (vapors verinosos o «miasmes», un càstig diví), o bé del desequilibri entre els quatre humors del cos humà (sang, flegma, bilis groga [còlera] i bilis negra [malenconia]).

Entre les moltes malalties infeccioses tradicionalment conegudes per tothom, cal destacar-ne dues pels seus efectes ràpids i evidents: la pesta i la sífilis. La sífilis es comença a conèixer els primers anys del segle XVI. El 1530, per expressar la seva idea de l'origen de la malaltia, el metge italià Girolamo Fracastoro (1478-1553) va escriure en vers l'obra *Syphilis, sive morbus gallicus* (sífilis o mal francès; Sífilis és el nom del personatge protagonista), en què va proposar que aquesta malaltia de transmissió sexual es dispersava mitjançant éssers vius invisibles (unes «llavors») i per contacte íntim (figura 2). Pocs anys després, va descriure el contagi de les malalties per contacte directe a través de les mans o de la roba, com també el «contagi a distància» per «llavors» dispersades per l'aire (*De contagione et contagiosis morbis*, 1546). Fracastoro es va anticipar tres-cents cinquanta anys a un dels principals canvis de paradigma en la medicina, la consolidació de la teoria microbiana de la malaltia per Louis Pasteur (1822-1895) i Robert Koch (1843-1910), en la dècada de 1880.

La pesta és una malaltia coneguda al llarg de tota la història de la humanitat. Ha causat greus epidèmies a Europa en moltes ocasions, fins ben avançat el segle XIX. L'epidèmia més «famosa», la pesta negra, és la que es va estendre des del port de Gènova en totes direccions a partir de l'any 1347 i va causar la mort d'un terç de la població europea durant la se-



FIGURA 2. Original per al cartell de Casas *Sífilis* que anunciava el sanatori del doctor Abreu, que tenia la seu al carrer Major de la Bonanova de Barcelona, dedicat a la cura de malalties de transmissió sexual. El cartell, imprès per la casa Thomas, incloïa les llegendes següents: «Sífilis» amb les eses en forma de serp, a la part superior; «Curación absoluta y radical en el sanatorio para sífilíticos», a la inferior, i, en lletres més petites, les dades de l'establiment. L'artista fa servir una figura d'una dona tapada amb un mantó de Manila, com en altres cartells d'anuncis seus, però aquí aporta un sentit diferent en introduir-hi elements clarament simbòlics al·lusius a la malaltia i a la perillositat del contacte sexual.

La dona ofereix un lliri blanc amb la mà esquerra, però amaga la malaltia, representada per la serp que té agafada amb la mà dreta i que s'enfila pel mantó. Casas no podia saber que la sífilis està produïda per *Treponema pallidum*, una espiroqueta petitíssima que podria recordar una serp microscòpica. Atès que la sífilis era una malaltia que els homes contracten principalment a través del contacte amb prostitutes, Casas va triar la imatge colpidora d'una d'aquelles dones, que va representar demacrada i amb aspecte malaltís. A començament del segle XX, la sífilis era la malaltia de transmissió sexual més temuda, no únicament pels efectes i les complicacions que podia causar en les persones afectades, sinó perquè el reconeixement públic de la malaltia era un estigma social. (Original per a cartell; llapis conté i pastel; 46 × 28 cm; Barcelona, 1900. Museu Nacional d'Art de Catalunya [MNAC/GDG 108770].) Figura proporcionada per l'autor de l'article.

gonia meitat del segle XIV. També va servir com a «justificació» del ferotge atac al call de Barcelona el 1348, en què es va acusar els jueus, com era freqüent en casos de calamitats, de ser els responsables de l'epidèmia. Els calls de Cervera, Tàrraga, Lleida i Girona també van ser atacats.

Ja des de l'antiguitat, per evitar la dispersió de la malaltia, es van establir una sèrie de normes higièniques de relativa eficàcia, com ara cremar la roba, tancar les cases, establir períodes d'aïllament o quarantena, etc. El metge i poeta valencià Lluís Alcanyís (c. 1440-1506) comença així el seu llibre *Regiment preservatiu e curatiu de la pestilència* (València, Nicolau Spindeler, 1490): «Mirant natura humana a tants innumerables perills e casos mortals, no he vist de totes les causes de morir nenguna més trista, més aguda e més cruel que aquesta epidèmia, que així prestament e amagada per nostres membres principals devalla segons que per diverses experiències se comprova, mortificant les obres del cor, cervell e fetge en tal grau que l'ànima, no tenint disposició complida de instruments, necessàriament lo desempara» (figura 3).

El microorganisme causant de la pesta és *Yersinia pestis*. El gènere *Yersinia* és un bacil curt gramnegatiu, flagel·lat, que pertany al grup dels anomenats *alfaproteobacteris*. Els

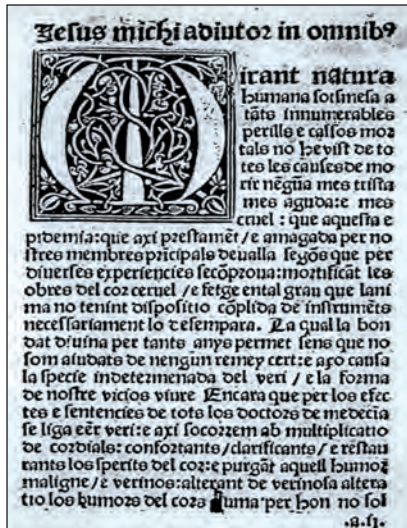


FIGURA 3. Primera pàgina del llibre de Lluís Alcanyís *Regiment preservatiu e curatiu de la pestilència* (València, Nicolau Spindeler, 1490), un tractat de mesures preventives i guaridores de la pesta. Figura proporcionada per l'autor de l'article.

bacteris de la pesta són mòbils quan s'aïllen de l'ambient, però immòbils dins de l'hoste. Tres espècies poden causar malaltia als humans: *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* i *Y. pestis*. Les dues primeres són enteropatògenes, infecten diversos mamífers i normalment no són mortals. La via d'entrada principal és la ingestió d'aigua o aliments contaminats. La tercera espècie, *Y. pestis*, infecta principalment els rosegadors i, indirectament, els humans a través de les puces, que actuen com a vectors entre les rates i els humans. Hi ha dues formes principals de manifestació de la pesta humana: la pesta bubònica (transmissió a través d'una picada de puça) i la pesta pneumònica (transmissió de persona a persona per aerosols, és a dir, gotetes de saliva en l'expectoració, etc.). La picada d'una puça infectada amb *Y. pestis* introdueix en el corrent sanguini els bacteris, que «viatgen» per la sang fins a arribar als nòduls limfàtics. Allà, els bacteris proliferen dins dels macròfags. La resposta inflamatòria generada provoca el creixement patològic dels ganglis (els bubons). Molts bacteris passen de nou a la sang i causen septicèmia (una infecció greu generalitzada). El trencament d'aquests bacteris en la sang allibera lipopolisacàrids (components de la membrana externa típica dels bacteris gramnegatius), la qual cosa provoca en l'hoste un xoc sèptic i la mort. Ocasionalment, alguns bacteris poden arribar als pulmons, on entren en els macròfags pulmonars (pesta pneumònica). En aquest estat, com s'acaba de dir, la transmissió a altres persones és a través d'aerosols (a través de l'expectoració) o per contacte directe. La inhalació d'aquests aerosols produeix una forma de malaltia que progressa molt més ràpidament que la transmissió a través de les puces, probablement perquè el bacteri presenta immediatament tots els factors de virulència necessaris per a colonitzar el cos humà.

En la segona meitat del segle XIX, els avenços tecnològics (autoclau, filtres, estufes, etc.) i el desenvolupament de

les tècniques bàsiques per a l'aïllament i cultiu axènic (o «pur») van permetre als fundadors de la microbiologia moderna, Pasteur i Koch, confirmar que els microorganismes eren la causa de les malalties infeccioses i eren agents contaminants dels aliments i de les aigües. A més, per demostrar que microorganismes específics causen malalties específiques, Koch va desenvolupar uns principis, o postulats, que proven irrefutablement que un determinat microorganisme produeix una determinada malaltia (figura 4). Els postulats de Koch són quatre:

1r. El microorganisme causant de la malaltia ha de trobar-se en tots els individus afectats.

2n. Aquest microorganisme ha de poder ser aïllat en cultiu axènic.

3r. Quan aquest microorganisme s'inocula en un animal d'experimentació, a partir d'un cultiu axènic, ha de produir-se la mateixa malaltia.

4t. El microorganisme causant de la malaltia ha de poder ser aïllat de nou a partir de l'animal d'experimentació i ha de poder ser cultivat axènicament.

El cultiu axènic, amb el sentit que coneixem avui dia, no va ser obtingut per Pasteur. Pasteur feia créixer els bacteris en medi líquid; quan el medi de cultiu es feia tèrbol, n'inoculava una petita quantitat en un altre medi «fresc» (sense bacteris), i així successivament. Fent aquesta sèrie de transferències, Pasteur suposava que tenia un cultiu axènic, però amb aquest mètode, l'obtenció d'un cultiu axènic és totalment fortuïta i poc reproduïble. Joseph Lister (1827-1912) va utilitzar el mètode de la dilució seriada fins a suposar que en l'últim tub de la sèrie quedava un únic microorganisme. Però, com en el cas de Pasteur, el mètode era complicat i sovint poc fiable. Els que van resoldre definitivament el problema, utilitzant un medi sòlid, van ser Koch i els seus col·laboradors.

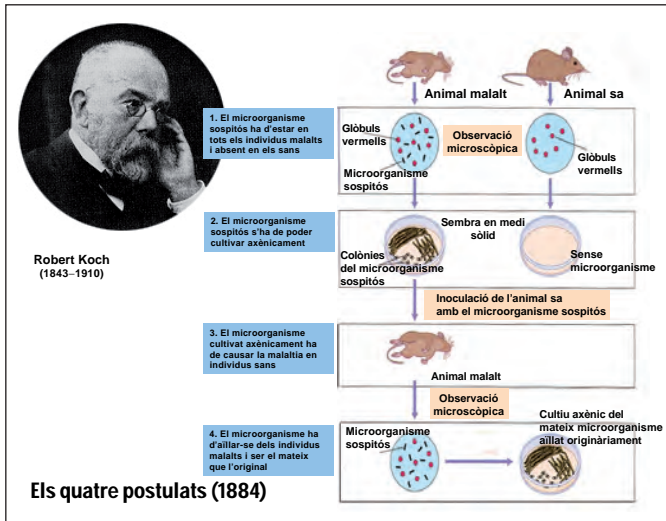


FIGURA 4. Els postulats de Koch. Conjunt de procediments seriatos per a identificar l'agent etiològic responsable d'una malaltia infecciosa.

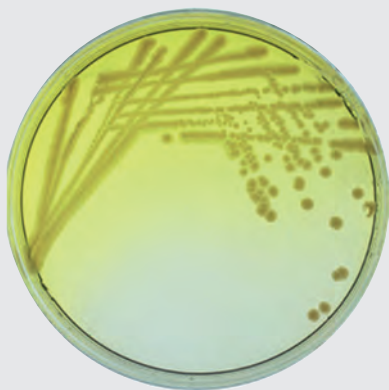
La base de la tècnica per a l'aïllament de bacteris en medis sòlids o semisòlids va ser proposada el 1875 per Joseph Schroeter (1835-1894), un estudiant de Ferdinand Cohn (1828-1898), que utilitzava talls de patata bullida dins de recipients esterilitzats. Koch estava totalment familiaritzat amb els treballs de Schroeter, ja que visitava molt sovint el laboratori de Cohn; no obstant això, Koch no el va citar en els seus treballs. La patata bullida servia de medi de suport i nutritiu per als microorganismes, però molts microorganismes patògens no hi podien créixer. A més, la patata regalimava líquid, cosa que feia que els microorganismes creïessin i es dispersessin per la superfície, ajuntant-se o tocant-se diferents colònies. (Koch volia trobar uns medis que poguessin suportar el creixement dels microorganismes patògens, sense tocar-se, sobre una superfície sòlida.)

QUADRE 1
El cultiu axènic

El cultiu axènic (o «pur») és la tècnica microbiològica que permet obtenir colònies separades d'un microorganisme, de manera que podem pensar que tenim aquest microorganisme «aïllat», és a dir, que no està contaminat amb cap altre organisme. Koch va utilitzar primer la gelatina com a agent per a solidificar els diferents medis líquids (brous) que feia servir per al creixement dels microorganismes patògens. Aquest medi sòlid el cobria amb una campana de vidre per evitar la contaminació amb els microorganismes existents en l'ambient. Els brous amb gelatina eren un bon medi de cultiu per a l'aïllament de microorganismes, però presentaven un inconvenient important: la gelatina no es manté sòlida a 37 °C, que és la temperatura òptima de creixement de la majoria de microorganismes patògens humans. Calia un altre agent solidificant més resistent a la digestió per microorganismes. Un col·laborador de Koch, Walter Hesse (1846-1911), per suggeriment de la seva esposa Fanny Angelina Eilshemius Hesse (1850-1934, nascuda als Estats Units), va introduir en els medis de cultiu una substància que es deia *agar-agar*. L'agar és un polisacàrid derivat de les algues roges (rodòfits), que s'utilitzava com a agent gelificant de pastissos i postres, especialment en les zones tropicals. Hesse es va interessar per la microbiologia principalment per fer estudis d'higiene ambiental, com la contaminació microbiana de l'aire, de les aigües de distribució urbanes o de les aigües residuals. Angelina treballava com a tècnic en el mateix laboratori, i a més era una magnífica dibuixant d'observacions microscòpiques de microorganismes.

L'agar va aportar molts avantatges respecte a la gelatina: era sòlid a 37 °C, resistent a la degradació enzimàtica i es podia emmagatzemar durant bastant de temps. Hesse va comunicar la descoberta a Koch, que immediatament va afegir l'agar en un nou medi destinat al cultiu del bacil de la tuberculosi.

El 1887, Richard Petri (1852-1921), també en el laboratori de Koch, va escriure un petit article on descrivia la utilització de plaques (capses) dobles circulars —que van rebre el seu nom— en què es posava el medi de cultiu. Les plaques de Petri es podien esterilitzar i emmagatzemar independentment del medi. En la part inferior de la capsa es ficava el medi de cultiu fos i es podia tancar amb una placa d'una mida un xic més gran per a evitar les contaminacions. Les plaques de Petri, que encara avui s'utilitzen, ja siguin de vidre o de plàstic, constitueixen un material imprescindible en un laboratori de microbiologia, de biologia cel·lular, d'embriologia, etc.



Placa de Petri, la base del cultiu axènic.
Imatge preparada per la doctora Mercè Berlanga.

Un altre predecessor de la tècnica del cultiu axènic fou el micòleg Oscar Brefeld (1839-1925), qui l'any 1875 va proposar els principis per a l'obtenció de cultius axènics de fongs: *a*) la inoculació d'un medi ha de ser amb una única espora de fong; *b*) el medi utilitzat ha de ser transparent i ha de tenir les característiques adients per a permetre el creixement del microorganisme, i *c*) el cultiu s'ha de mantenir

completament protegit de les contaminacions externes durant tot el temps d'incubació. (A Brefeld se li atribueix la contundent observació següent: «Fora del cultiu pur, tot és confusió i *Penicillium glaucum* [un contaminant habitual dels medis de cultiu]». Aquesta frase, posteriorment, se la va apropiari Selman Waksman (1888-1973), la qual cosa no va ser l'única que es va apropiari immerescudament Waksman.)

Potser la principal contribució de Koch al desenvolupament de la microbiologia hagi estat la introducció de la tècnica del cultiu axènic utilitzant medis sòlids o semisòlids. El cultiu axènic i la utilització dels postulats van permetre l'aïllament, abans de finalitzar el segle XIX, dels microorganismes causants de les principals malalties bacterianes dels humans.

Tot el coneixement del món microbià (especialment dels procarïotes), de la seva genètica i de la seva fisiologia, s'ha basat fins fa poc en el creixement axènic dels microorganismes. I encara que continua sent imprescindible per a la microbiologia clínica i d'aliments, per a l'obtenció de productes microbians, etc., resulta insuficient per als estudis actuals d'ecologia microbiana.

L'edat ecològica

L'ecologia microbiana és una de les ciències microbiològiques més destacades de l'últim quart del segle XX. Encara que ja comença amb els treballs pioners de Martinus Beijerinck (1851-1931) i Sergei Winogradsky (1856-1952), a principis del segle XX, el primer llibre de text amb el nom de *ecologia microbiana* no va ser publicat fins al 1966.⁵ L'objectiu de l'ecologia microbiana és estudiar el paper dels microorganismes en la natura i les relacions existents entre els microorganismes

5. BROCK (1966).

mes i els altres éssers vius i la relació que s'estableix amb l'ambient. Al principi, l'ecologia microbiana estava fragmentada en moltes disciplines, com la microbiologia del sòl, la microbiologia dels aliments, la microbiologia marina, etc. Però ara s'intenta integrar tots els camps d'estudi en una visió unificada i unificadora. La nova visió del paper dels microorganismes en les malalties infeccioses n'és un exemple. De fet, es creu que és un problema ecològic del microbi i el seu ambient, és a dir, de l'hoste que pateix la malaltia.⁶ Sabem ara que els microorganismes i les seves activitats tanquen els cicles de la matèria, són la base de totes les xarxes tròfiques, controlen els gasos de l'atmosfera, contribueixen de manera essencial al funcionament global del planeta i ajuden al desenvolupament sostenible de la biosfera.⁷

La nostra percepció dels bacteris com a poblacions clonals úniques (unicultiu), aïllades de la diversitat del medi, té l'origen en el paradigma del cultiu axènic. No obstant això, a la natura, els bacteris rarament es troben sols i nedant en el medi (de vida planctònica). Els bacteris normalment s'adhereixen a les superfícies i formen biopel·lícules. Es troben en qualsevol superfície en contacte amb un medi líquid: pedres d'un riu, fonts termals, canonades, catèters, dents, etc. Són sèssils (o de vida bènica). Una biopel·lícula és una associació complexa de microorganismes, constituïda per una o diferents espècies, unides a una superfície i incloses en una matriu de polímers extracel·lulars que fabriquen els mateixos microorganismes.⁸ La formació de la biopel·lícula és un fenomen de *percepció de quòrum* (*quorum-sensing*).⁹ Generalment, cada cèl·lula secreta petites quantitats d'una molè-

6. HALL-STOODLEY *et al.* (2004).
7. MALOY i SCHAECHTER (2006).
8. STOODLEY *et al.* (2002).
9. HENKE i BASSLER (2004).

cula de comunicació (per exemple *N*-acilhomoserina lactona). Quan s'agreguen un nombre suficient de bacteris (quan la població ha assolit la densitat mínima necessària), la concentració d'aquesta substància en el medi augmenta. Aquest augment fa que s'activin diversos gens de cada cèl·lula de la població i, com a conseqüència, totes les cèl·lules comencen a actuar de la mateixa manera (per exemple, produint llum, agrupant-se, etc.). La formació de biopel·lícules es considera una estratègia de supervivència (que permet la hidratació, la concentració de nutrients, la impermeabilitat als antibiòtics o a altres substàncies tòxiques, l'intercanvi genètic, etc.).

La formació de biopel·lícules com a mecanisme de protecció pot tenir profundes implicacions per a l'hoste, perquè els microorganismes que estan creixent en aquestes superfícies són molt més resistents als antibiòtics i al sistema immunitari de l'hoste. Els catèters, les vàlvules cardíaques, les pròtesis, els tubs endotraqueals, etc., salven moltes vides, però també suposen un risc intrínsec d'infeccions a causa de l'adhesió de microorganismes a les seves parets.¹⁰

EL COS HUMÀ, UNA GRAN VARIETAT D'HÀBITATS PER ALS MICROORGANISMES

Durant molts mil·lennis d'evolució, els éssers humans han desenvolupat una relació íntima i complexa amb els microorganismes. Ara que coneixem moltes de les seves activitats, quan parlem dels microorganismes sempre en recordem la vessant negativa, com a agents causants de malalties infeccioses, de la contaminació i del deteriorament de productes alimentaris. No obstant això, comencem a adonar-nos que els microorganismes també poden contribuir al manteniment de la salut.

10. HALL-STOODLEY *et al.* (2004).

Si calculem la relació existent entre l'alçada d'un humà mitjà d'1,70 m i el diàmetre de la Terra, 12.756 km, dona $7,5 \times 10^6$; si fem el mateix càlcul entre un humà (1,70 m) i el bacteri de vida lliure més petit conegut, *Mycoplasma genitalium*, que pot tenir uns 230 nm de longitud, la relació obtinguda és aproximadament la mateixa, $7,4 \times 10^6$. Per a un bacteri, el cos humà és la seva biosfera; biosfera que, com la de la Terra, conté una enorme diversitat d'hàbitats. La microbiota humana colonitza totes les superfícies externes del cos: l'àrid desert del front, els boscos freds de l'avantbraç, les selves humides de l'aixela, els llacs àcids de l'estómac, etc. La distribució dels tàxons no és homogènia, sinó que depèn de quatre factors principals: *a*) les variables fisicoquímiques de l'hàbitat (boca, vagina, aixelles, etc.); *b*) la competència biològica amb altres microorganismes existents; *c*) les característiques genètiques i metabòliques de cada microorganisme en concret, i *d*) el grau de tolerància del sistema immunitari de l'hoste.

83

Només durant els nostres primers nou mesos d'existència estem lliures de microorganismes. Des del naixement fins a la mort, i definitivament després d'aquesta, el nostre cos està colonitzat per molts tipus de virus, bacteris i fongs. Una persona adulta pot tenir deu vegades més cèl·lules microbianes (procariotes, com ara els bacteris, o eucariotes, com ara els llevats i altres fongs) que cèl·lules humanes: el cos humà té 10^{13} cèl·lules eucariotes i 10^{14} cèl·lules procariotes. Els procariotes representen aproximadament 1,25 kg del nostre pes total. Som la llar de més de mil cinc-cents tàxons microbians diferents, que no es distribueixen homogèniament per tot el cos, sinó que cadascun ocupa uns hàbitats determinats, com ara la pell, l'intestí, l'aparell respiratori superior, l'aparell genital, les vies urinàries o la conjuntiva. Certs microorganismes mantenen un pacte de permanència (el sistema immunitari en tolera la presència) sobre determinades

superfícies del cos. No obstant això, un mateix microorganisme en zones diferents pot provocar respostes diverses (per exemple, *Escherichia coli*, que és un bacteri comensal molt abundant en l'intestí, si es troba en les vies urinàries pot causar una infecció i una malaltia).

La microbiota sapròfita o simbiònt del cos humà canvia al llarg del temps. L'aparició de les dents en els nens, per exemple, aporta nous ambients habitables. Les dents proporcionen una nova superfície d'adhesió. A més, es formen zones sense oxigen (anòxiques) entre la dent i la geniva, i això permet la colonització de bacteris anaerobis com ara *Fusobacterium*. El canvi de dieta progressiu en un nen determina profunds canvis en la microbiota intestinal, els quals faciliten la digestibilitat dels aliments. Al principi, la microbiota intestinal del noutat està constituïda principalment per *Bifidobacterium* spp. i *Lactobacillus* spp., que mantenen un ambient lleugerament àcid en l'intestí, protegint-lo de la colonització de possibles microorganismes patògens.

De manera similar, el nivell d'estrògens condiona la microbiota de la vagina. En el moment del naixement d'una nena, els estrògens de la mare passen a través de la placenta i afavoreixen la colonització dels lactobacils. Després de dues o tres setmanes, la influència dels estrògens materns disminueix. El revestiment epitelial de la vagina es fa més prim, els lactobacils desapareixen i el pH esdevé alcalí. Aquestes condicions es mantenen durant la infància. En la pubertat, augmenten els nivells d'estrògens que estimulen la producció de glucogen per les cèl·lules epitelials de la vagina. Els lactobacils consumeixen el glucogen i proliferen. En fer-ho, produeixen àcid làctic, el qual fa baixar el pH vaginal. L'acidesa protegeix la vagina de la infecció per molts microorganismes patògens.

El cos d'un adult conté més de vuit-centes espècies microbianes, que pertanyen a vuit de les cinquanta-cinc divi-

TAULA 2
Descobriment o identificació dels principals patògens bacterians humans

<i>Any</i>	<i>Malaltia o afecció</i>	<i>Microorganisme (nom actual)</i>	<i>Descobridor</i>
1877	Carboncle	<i>Bacillus anthracis</i>	R. Koch
1878	Supuració	<i>Staphylococcus</i> spp.	R. Koch
1879	Gonorrea	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	A. L. S. Neisser
1880	Febre tifoide	<i>Salmonella typhi</i>	K. J. Eberth
1881	Supuració	<i>Streptococcus</i> spp.	A. Ogston
1882	Tuberculosi	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	R. Koch
1883	Còlera	<i>Vibrio cholerae</i>	R. Koch
1883	Difèria	<i>Corynebacterium diptheriae</i>	E. Klebs, F. Löffler
1884	Tètan	<i>Clostridium tetani</i>	A. Nicolaier
1885	Diarrea	<i>Escherichia coli</i>	T. Escherich
1886	Pneumònia	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	A. Fraenkel
1887	Meningitis	<i>Neisseria meningitidis</i>	A. Weischelbaum
1888	Infecció alimentària	<i>Salmonella enteritidis</i>	A. A. H. Gaertner
1892	Gangrena gasosa	<i>Clostridium perfringens</i>	W. H. Welch
1894	Pesta bubònica	<i>Yersinia pestis</i>	S. Kitasato, A. J. E. Yersin (independentment)
1896	Botulisme	<i>Clostridium botulinum</i>	E. M. P. van Ermengem
1898	Disenteria bacil·lar	<i>Shigella dysenteriae</i>	K. Shiga
1903	Sífilis	<i>Treponema pallidum</i>	F. R. Schaudinn, E. Hoffmann
1906	Tos ferina (catarro)	<i>Bordetella pertussis</i>	J. Bordet, O. Gengou
1909	Tifus	<i>Rickettsia prowazekii</i>	H. T. Ricketts, S. von Prowazek (independentment)
1976	Legionel·losi	<i>Legionella pneumophila</i>	Un grup de metges
1982	Malaltia de Lyme	<i>Borrelia burgdorferi</i>	W. Burgdorfer
1982	Úlcera gastroduodenal	<i>Helicobacter pylori</i>	B. J. Marshall, J. R. Warren

sions del domini *Bacteria* descrites fins ara.¹¹ Com veiem, diferents tipus de microorganismes habiten en molts ambients diferents del cos humà i solament alguns són patògens (taula 2). La relació entre microorganismes sapròfits, fins i tot beneficiosos i imprescindibles, i els clarament nocius, fins i tot mor-

11. BÄCKHED *et al.* (2005).

tals, no sempre és clara. Depèn d'un delicat equilibri entre l'hoste i el microbi, i de les condicions del medi. Aquest equilibri és el factor que marca la profunda diferència entre salut i malaltia, i, finalment, entre vida i mort.

***HELICOBACTER PYLORI*: AMIC O ENEMIC?**

ABANS DEL DESCOBRIMENT: L'ENIGMA

Com s'ha esmentat abans, alguns anatomopatòlegs ja van observar la presència de bacteris en forma d'espitals en els estòmacs dels humans abans de 1906, però les observacions no van rebre gaire atenció, principalment perquè aquests bacteris no es podien cultivar. A més, es pensava que l'estómac no podia tenir bacteris, a causa del baix pH degut a l'àcid gàstric. El cultiu d'un nou microorganisme (el bacteri *Helicobacter*) de la mucosa gàstrica en 1982 va ser el punt d'inici d'una nova era en l'estudi de l'ecologia de la microbiota gastrointestinal i de la malaltia.

Tradicionalment, les úlceres gàstriques eren considerades una conseqüència de l'estrès i d'un excés d'àcid. Aquesta suposició va trobar suport en la disminució del dolor en pacients tractats amb agents que reduïen l'acidesa gàstrica. En alguns casos semblava que el pacient es guaria, però l'acidesa tornava a «aparèixer» quan s'interrompia la medicació. Aquests fàrmacs eren una important font d'ingressos per a les indústries farmacèutiques que els fabricaven, les quals van mostrar poc interès per promoure i acceptar altres alternatives per explicar la malaltia d'úlceres gastroduodenal.

Com s'ha dit, el Premi Nobel de Fisiologia o Medicina de l'any 2005 reconeix el treball de dos metges australians, Marshall i Warren, pel descobriment de l'origen infeccios de l'úlceres gàstrica. Aquest descobriment ha canviat no sola-

ment el diagnòstic, pronòstic i tractament de la gastritis, l'úl-
cera o, fins i tot, el càncer d'estómac, sinó que també ha
modificat el pensament respecte a les relacions que els micro-
organismes poden establir amb el cos humà.

EL DESCOBRIMENT: MARSHALL I WARREN, 1982

Marshall i Warren havien observat sovint bacteris helicoides
en teixits ulcerats i malignes. Van buscar una raó de la
presència dels bacteris i van avançar la hipòtesi que era el
bacteri la causa de l'úlcer gastroduodenal, i no l'estrès com
establia el dogma mèdic. Per provar aquesta idea, Marshall
va ingerir voluntàriament un cultiu axènic del bacteri aïllat
d'un pacient malalt amb úlceres i va desenvolupar els símpto-
mes inicials típics de la malaltia. Afortunadament, el tracta-
ment amb antibiòtics el va curar. Pràcticament cent anys
després de Koch, i seguint la mateixa base conceptual, s'ha-
via arribat a la identificació de l'agent etiològic d'una malal-
tia.¹² El bacteri aïllat era gramnegatiu, tenia una forma espi-
ral, presentava flagels en ambdós pols de la cèl·lula i es va
classificar dins el grup dels epsilonproteobacteris. Al principi,
es pensava que el nou microorganisme era una nova espècie
de *Campylobacter*, però després se li va donar el nom actual,
Helicobacter pylori (figura 5).

Helicobacter és un microorganisme *exigent* (*fasti-
dious*, en anglès), que s'ha de cultivar en un medi ric comple-
mentat amb sang, ciclodestrina, etc. Necessita condicions de
microaerofília, i algunes soques són auxotròfiques per a l'ar-
ginina, histidina, leucina, isoleucina, metionina i fenilalanina.
Quan Marshall intentava aïllar els bacils que observava
en les biòpsies gàstriques, els incubava com si es tractés d'un

12. MARSHALL I WARREN (1984).

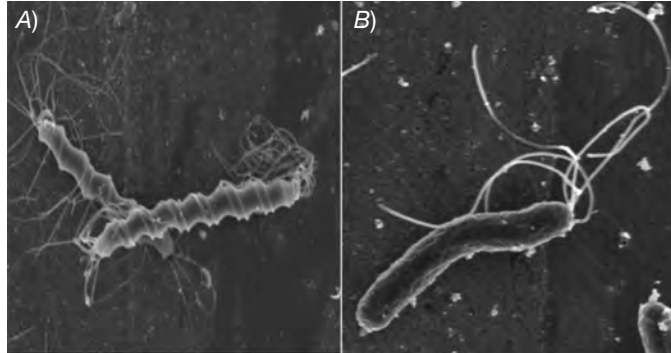


FIGURA 5. A) Micrografia amb el microscopi electrònic de rastreig d'*Helicobacter pylori* aïllat de l'epiteli gàstric humà. S'aprecia la forma corbada del bacteri, la presència de flagels múltiples en els dos pols i l'absència de fibril·les en l'espai periplasmàtic (al voltant de tota la cèl·lula). B) Micrografia amb el microscopi electrònic de rastreig d'*Helicobacter felis* aïllat de la mucosa gàstrica d'un gat. S'aprecia la forma espiral del bacteri i la presència de fibril·les periplasmàtiques. (Micrografies de Lucinda Thompson, publicades a *Int. Microbiol.*, núm. 8, p. 231-234, amb permís de la revista.)

88

Campylobacter (microaerofília i 48 hores), però el nou bacteri, aparentment, no creixia. L'èxit va arribar quan va marxar de vacances uns dies i es va oblidar de treure les plaques de l'estufa d'incubació. A la tornada, cinc dies després, va trobar colònies diminutes del bacteri que tantes vegades havia intentat cultivar. *Helicobacter* s'ha d'incubar un mínim de cinc dies a 37 °C i no utilitza carbohidrats, perquè necessita altres fonts de carboni més especialitzades.

En cultius recents (frescos), les cèl·lules tenen una morfologia espiral o helicoide, però després de prolongats períodes d'incubació o de tractament amb concentracions subinhibitòries d'antibiòtics canvien a una forma coccoide. Encara es desconeix si aquestes cèl·lules coccoïdes d'*Helicobacter* es troben en un estat *viable però no cultivable* (VBNC,

QUADRE 2

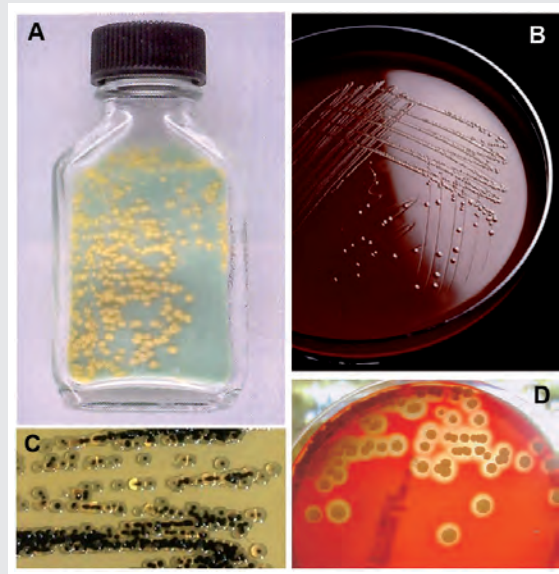
Diagnòstic i cultiu d'*Helicobacter pylori*: un microorganisme exigent

Els microorganismes exigents són aquells que són difícils de cultivar en medis habituals i requereixen medis molt rics i períodes d'incubació llargs. Dins d'aquesta categoria de microorganismes s'inclouen molts patògens, com ara *Legionella* (legionel·losi), *Neisseria* (meningitis, gonorrea), *Haemophilus* (infeccions de l'aparell respiratori, meningitis infantils), *Mycobacterium* (tuberculosi), *Mycoplasma* (infeccions genitals), *Helicobacter* (úlceres), i d'altres. Algunes de les recomanacions per a la detecció i cultiu d'aquests microorganismes són les següents: *Legionella* (medi amb carbó actiu, extracte de llevat, incubació en aerobiosi a 35 °C, atmosfera humida durant cinc dies); *Neisseria* (un medi molt ric, com ara agar de Thayer-Martin o agar xocolata, incubació a 37 °C, atmosfera humida i enriquida amb CO₂, durant 24 h); *Haemophilus* (medi base BHI [*brain heart infusion*], hemina i NADH, incubació a 37 °C durant 24-48 h); *Mycobacterium* (medi Löwenstein-Jensen, a 37 °C, 5-10 % CO₂ de sis a vuit setmanes); *Mycoplasma* (medi SP4 o medi base BHI amb glucosa, arginina, extracte de llevat, sèrum boví i penicil·lina; a 35 °C en una atmosfera de CO₂ al 5 %, quatre dies o més).

Per cultivar *Helicobacter pylori* s'utilitza agar Skirrow o agar Thayer-Martin, complementat amb sang; de vegades també s'hi afegeixen alguns antibiòtics (per exemple, vancomicina, 6 mg/l; àcid nalidíxic, 20 mg/l; amfotericina, 2 mg/l), als quals el bacteri és resistent. *Helicobacter* necessita condicions de microaerofília (l'òptim és un 5 % d'oxigen), una elevada humitat i incubació a 35-37 °C de cinc a set dies.

La detecció d'*Helicobacter pylori* es pot fer mitjançant un mètode invasiu, a partir d'una mostra del teixit que s'inocula en plaques de medi de cultiu. Entre els mètodes no invasius hi ha el test de la urea i el test serològic amb anticossos. El test de la urea consisteix a administrar per via oral una solució d'àcid cítric i deu minuts després urea-¹³C (és a dir, marcada amb un isòtop

del carboni pesant, però no radioactiu). Una de les característiques d'*H. pylori* és la producció d'ureasa, un enzim que trenca la urea en amoni i CO_2 . Si una persona està infectada amb *H. pylori*, és capaç de trenca la urea administrada, amb la qual cosa el $^{13}\text{CO}_2$ passa al torrent sanguini i als pulmons, on és alliberat a l'exterior. Les mostres d'alè s'agafen deu, vint, trenta i seixanta minuts després d'administrar la urea- ^{13}C . Amb un espectrofotòmetre de masses es mesura la relació $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$. Si hi ha un excés de $^{13}\text{CO}_2$, el pacient està infectat per un *H. pylori* actiu (Guerrero i Berlanga, 2000).



Diferents medis de cultiu bacterians: A) *Mycobacterium tuberculosis* en agar Löwenstein-Jensen. B) *Helicobacter pylori* en agar xocolata. C) *Salmonella typhimurium* en medi Salmonella-Shigella. D) *Staphylococcus aureus* betahemolític en agar sang.
Imatge preparada per la doctora Mercè Berlanga.

viable but non-culturable; nom proposat per Rita R. Colwell en 1982), si tenen alguna rellevància epidemiològica o si aquest estat es correlaciona amb la degeneració i mort cel·lular en teixits.

Les cèl·lules d'*Helicobacter* en estat VBNC són resistents als medicaments que s'utilitzaven abans en el tractament de les úlceres. Això suggereix que la recurrència d'aquestes lesions podria estar causada per la «reanimació» de les cèl·lules que estaven en l'estat VBNC després d'interrompre el tractament. A més, podria explicar la via de transmissió a través d'aigua contaminada amb *Helicobacter* (encara no està provada aquesta hipòtesi). *Helicobacter* podria persistir en l'ambient en aquest estat «inactiu» fins a trobar un hoste susceptible, per a iniciar així un nou cicle infecciós.

Els microorganismes es troben normalment en medis hostils i canviant. Sembla raonable, doncs, que hagin desenvolupat estratègies de supervivència, sistemes de defensa per a fer front a les condicions adverses i mecanismes de control actius que facilitin l'adaptació de la cèl·lula microbiana a les noves situacions. Moltes espècies bacterianes alternen dos estats morfològics, que constitueixen una especialització funcional: un estat «actiu» de creixement i un estat «d'espera» (*stand-by*). Aquests dos estats permeten als bacteris créixer quan les condicions són òptimes i restar «adormits» a l'espera de noves condicions favorables.

Els bacteris en estat VBNC no poden formar colònies en els medis sòlids habituals. Són cèl·lules amb una dràstica reducció metabòlica. Les cèl·lules entren en aquest estat com a resposta a algun tipus d'estrès natural, a la manca de nutrients, temperatures desfavorables, concentracions osmòtiques elevades, concentració d'oxigen alta, etc. La possibilitat de presentar un estat VBNC s'ha descrit en unes seixanta espècies bacterianes. Entre aquestes espècies es troben molts patògens humans, com *Campylobacter* spp., *Helicobacter*

pylori, *Escherichia coli* (incloent soques EHEC), *Francisella tularensis*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, algunes *Salmonella*, *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *V. parahae-molyticus* i *V. vulnificus*.

En països en vies de desenvolupament, del 70 al 90 % de la població és portadora d'*Helicobacter pylori*; en canvi, en els països desenvolupats la prevalença és menor, entre el 25 i el 50 %, encara que hi ha diferències segons les classes socials, i que algunes minories ètniques en registren una elevada incidència a pesar de l'avançament econòmic general. Normalment, el bacteri s'adquireix durant la infància i, un cop colonitzat, l'hoste pot estar infectat de per vida, si no rep un tractament amb antibiòtics.

La capacitat de colonitzar l'estómac humà i de persistir-hi durant anys indica que *Helicobacter pylori* s'ha adaptat específicament a ocupar aquest hàbitat, i que aquesta adaptació és conseqüència d'unes capacitats fisiològiques úniques, com ara la colonització, l'adhesió, la resistència a la rentada d'estómac, la protecció contra el sistema immunitari del receptor i la capacitat de transmissió a un altre hoste.

La via de transmissió d'*Helicobacter pylori* d'un individu a un altre encara no es coneix bé. L'únic reservori conegut és l'espècie humana. S'ha suggerit que la transmissió de persona a persona podria fer-se per la via fecal-oral, oral-oral o gàstrica-oral; això podria explicar la seva incidència alta en poblacions en què les condicions higièniques són deficientes. Les mosques són abundants en aquests llocs i estan en contacte directe amb la femta humana i les restes de menjar. S'han fet experiments per a veure si les mosques són un reservori o vector d'*Helicobacter pylori* o no. Després de criar mosques en contacte amb plaques amb cultius axènics d'*Helicobacter pylori*, s'ha aïllat el bacteri en el cos, intestí i excrements dels insectes. En mosques «lliures» (no del labo-

ratori) s'ha detectat només la presència de DNA d'*Helicobacter*; tampoc no s'ha aïllat de mosques contaminades amb femta humana. El control efectiu de la població de mosques no impedeix la infecció amb *Helicobacter pylori*.¹³

DESPRÉS DEL DESCOBRIMENT: EL PARADIGMA

Alguns microorganismes en el cos humà utilitzen les mucoses com a protecció. És el cas d'*Helicobacter pylori*, que per la seva forma i per la possessió de flagels pot nedar per la capa de mucus de l'estómac. En aquesta zona, *Helicobacter* troba protecció contra l'inhòspit ambient àcid del lumen gàstric. De fet, *in vitro* s'ha demostrat que *Helicobacter pylori* mor ràpidament quan el pH del medi és de 2 o inferior. És possible que el bacteri entri a l'estómac amb els aliments, que el «protegeixen» contra l'àcid. A més, *Helicobacter* té una característica metabòlica molt especial: produeix una gran quantitat d'ureasa, un enzim que descompon la urea en amoni i CO₂ i eleva a 6 el pH que envolta els bacteris. Aquesta estratègia li permet sobreviure prou temps per a arribar a la capa de mucus gàstric, on hi ha un gradient de pH que va des de l'acidesa, en el lumen, fins a la neutralitat, en la superfície de les cèl·lules de l'epiteli. *Helicobacter pylori* utilitza aquest gradient per orientar-se dins d'aquesta capa.¹⁴

Helicobacter pylori pot causar una inflamació aguda i crònica de l'estómac, però la magnitud de la inflamació pot variar de persona a persona. En la majoria de persones infectades, no hi ha conseqüències clíniques. No obstant això, entre un 10 i un 20 % dels infectats poden desenvolupar algunes de les quatre malalties que s'han descrit per a *Helicobacter pylori*.

13. ALLEN *et al.* (2004).

14. MARSHALL i WINDSOR (2005).

cobacter pylori: gastritis, úlcera gastroduodenal, limfoma associat a la mucosa (MALT, *mucosal-associated lymphoid tissue*) i, amb baixa freqüència, adenocarcinoma. Normalment, el tractament amb antibiòtics eradica l'organisme en un 80 % de les persones infectades. El tractament estàndard consisteix en l'administració de tres fàrmacs, dos cops al dia, durant una setmana: un inhibidor de la bomba de protons i dos antibiòtics, amoxicil·lina i claritromicina. Atès l'augment de resistència a aquest tractament, s'ha canviat a una terapèutica quàdruple (bismut, inhibidor de la bomba de protons i dos antibiòtics) de deu a catorze dies.¹⁵

Per a la colonització i supervivència a l'estómac, *Helicobacter pylori* necessita ureasa i flagels. La ureasa, com s'ha indicat anteriorment, metabolitza la urea a amoni i CO₂, que amorteixen l'àcid gàstric. Els flagels permeten que el bacteri nedi en aquest medi viscos fins a trobar el pH idoni. Quant a altres factors de patogenicitat, *Helicobacter pylori* utilitza com a mínim cinc adhesines (factors bacterians d'adhesió) diferents per unir-se a l'epiteli gàstric. Els aïllats clínics es poden agrupar en dos tipus, tipus I i II, que s'associen amb diferents manifestacions clíniques, que van des d'úlcera i gastritis fins a la colonització asimptomàtica. Les soques de tipus I tenen dues proteïnes relacionades amb la infecció, CagA i VacA. Les soques de tipus II només tenen VacA. La proteïna CagA, codificada en un illot de patogenicitat i de 120 kDa, és una citotoxina associada a l'antigen A i molt immunògena. La proteïna VacA indueix múltiples activitats cel·lulars, com la vacuolització, la formació de canals en la membrana, l'alteració de la funció endosomal-lisosomal, la destrucció de la integritat de l'epiteli, l'apoptosi i la immunomodulació.¹⁶

15. McLOUGHLIN *et al.* (2005).

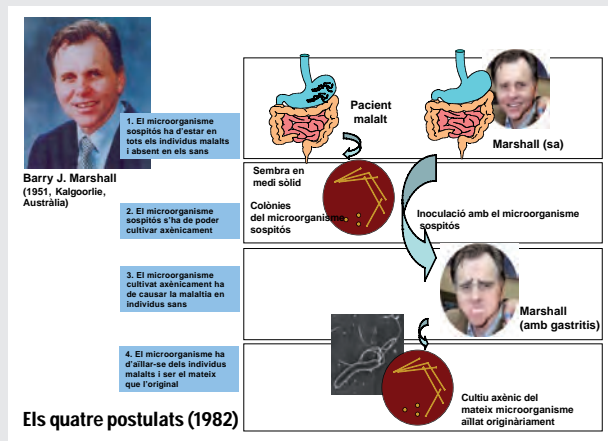
16. RADOSZ-KOMONIEWSKA *et al.* (2005).

QUADRE 3

Vigència dels postulats de Koch. El cas d'*Helicobacter*

Si una cosa recorden els estudiants de microbiologia del que va fer Koch són els seus famosos postulats. Una altra història és que també recordin què diuen aquests postulats (vegeu la p. 76) i la seva importància clínica i microbiològica. Els postulats de Koch són un conjunt de procediments seriatos destinats a provar que un microorganisme específic és l'agent causal d'una malaltia determinada (figura 4). Koch va proposar diferents criteris per establir la relació de causalitat microorganisme-malaltia, però fins al 1884 no va publicar els postulats tal com els coneixem ara. El 1883, Friedrich Löffler (1852-1915) havia descrit com es podia demostrar que la diftèria era causada per un microorganisme: 1r) l'organisme ha d'estar present en una forma característica en el teixit infectat; 2n) l'organisme que pel seu comportament sembla la causa de la malaltia, ha d'aïllar-se en cultiu axènic; 3r) el cultiu axènic ha d'induir la malaltia experimentalment. De fet, són els postulats de Koch (el primer que hem dit inclou el primer i el segon postulat de Koch), però escrits abans per Löffler! Amb el treball sobre la tuberculosi (fet el 1882), Koch discuteix la necessitat d'aïllar el patògen en cultiu axènic i d'induir la malaltia experimentalment en un animal de laboratori com el ratolí. Però amb el còlera (1883) es va enfrontar a un repte: produir la malaltia en un animal experimental. Koch va trobar que totes les persones amb còlera tenien un bacteri molt mòbil en forma de coma (*Vibrio cholerae*), i va aconseguir obtenir-lo en cultiu axènic, però els ratolins inoculats amb el bacteri aïllat no presentaven la malaltia. La dificultat de disposar de models animals adequats ha estat un problema en la investigació mèdica des dels temps de Koch. De vegades cal recórrer a les infeccions humanes degudes a accidents en el laboratori, com és el cas d'un investigador del laboratori de Koch (Max von Pettenkofer), que va ingerir accidentalment un cultiu de *V. cholerae* i va manifestar, ara sí, la malaltia.

Els postulats de Koch no són l'única via per a demostrar l'etiologia d'una malaltia, ja que hi ha malalties que se sap quin microorganisme les produeix però no compleixen el segon postulat. Per exemple, *Treponema pallidum*, agent causal de la sífilis, no ha pogut ser cultivat *in vitro*. Un cas similar és la lepra, produïda per *Mycobacterium leprae*. Tampoc en els virus es pot aplicar el segon postulat, ja que només poden multiplicar-se en cultius bimembres (amb virus i cèl·lules hostes). Per determinar l'agent etiològic d'una infecció vírica s'utilitzen els postulats de Rivers, enunciats en 1932: 1r) l'agent víric ha de trobar-se en els fluids o cèl·lules infectades d'un hoste; 2n) l'agent víric obtingut a partir d'un hoste infectat ha de causar la malaltia en un altre hoste si i ha d'induir la síntesi d'anticossos; 3r) els agents vírics aïllats de l'hoste infectat d'aquesta manera han de transmetre la malaltia a un altre hoste.



Els postulats de Marshall: cent anys després de Koch, continuen sent vàlides les idees fundacionals de la microbiologia. Imatge preparada per la doctora Mercè Berlanga.

El 1900, el d'estómac era el càncer més letal als EUA; l'any 2000, en canvi, la seva incidència i mortalitat havien baixat més del 80 %, i s'havia situat per sota del càncer de còlon, de pròstata, de mama o de pulmó. Existeix una relació entre la regressió d'*Helicobacter pylori* i aquest canvi. No obstant això, durant aquest mateix període i coincidint amb la «desaparició» d'*Helicobacter*, s'ha produït un augment en la incidència d'unes altres malalties esofàgiques (per exemple, l'esòfag de Barrett —Barrett's syndrome— i l'adenocarcinoma) degudes al reflux del contingut gàstric. Sembla que la colonització de l'estómac per *Helicobacter* protegeix l'esòfag. Les soques amb CagA (les més virulentes pel que fa a provocar úlcers i càncer) són les que proporcionen una major protecció de l'esòfag.¹⁷

El grau d'acidesa determina la persistència o eliminació d'*Helicobacter*. Massa àcid el mata, però un nivell baix podria permetre la colonització d'altres bacteris com *Escherichia coli*, que podrien envair el seu nínxol ecològic. *Helicobacter* ha desenvolupat la capacitat de regular l'acidesa del seu entorn. Quan l'acidesa és molt alta, sintetitza la proteïna CagA en gran quantitat. Aquest fet provoca una resposta inflamatòria en l'hoste, que disminueix l'acidesa mitjançant la regulació hormonal de les cèl·lules productores. Una acidesa baixa fa disminuir la síntesi de CagA i la inflamació. Les soques CagA augmenten el risc d'úlcers perquè poden provocar una inflamació crònica, però regulen el pH de l'estómac. Les malalties de l'esòfag sembla que tenen l'origen en l'exposició del teixit a un contingut gàstric d'elevada acidesa.¹⁸

17. BLASER (1999).

18. BLASER i ATHERTON (2004).

Com s'ha esmentat, al principi es va pensar que el bacteri causant de l'úlcer era un membre del gènere *Campylobacter*, i va rebre el nom de *Campylobacter pyloridis*. Posteriorment, es va corregir per *Campylobacter pylori* i, finalment, a *Helicobacter pylori* (el nou gènere *Helicobacter* es va establir el 1989). Hi ha més de vint espècies d'*Helicobacter* que poden colonitzar la mucosa gàstrica, el tub digestiu o el fetge (enterohepàtiques) dels humans i altres mamífers (hi trobem patògens entèrics humans, com ara *H. fennelliae* i *H. cinaedi*; patògens de la vesícula biliar i fetge de rosegadors, com ara *H. hepaticus* i *H. bilis*; etc.) (figura 5). Els *Helicobacter* enterohepàtics d'alguns mamífers es consideren components de la microbiota resident. No està clar si poden causar alguna malaltia en rosegadors normals o immunocompetents. En el cas de les espècies enterohepàtiques d'*Helicobacter* que afecten els humans, encara no se n'ha determinat ni la prevalença ni la possible associació amb una activitat patògena.¹⁹

Com altres bacteris que viuen en un ambient especialitzat, *Helicobacter pylori* té un genoma petit. La primera soca seqüenciada, el 1997, va ser la 26695, que té un cromosoma circular d'1,66 Mb (és a dir, 1,66 milions de parells de bases en el DNA). El segon genoma seqüenciat, el 1999, va ser la soca J99 (que té 1,64 Mb).²⁰ Les soques aïllades presenten molta diversitat al·lèlica (variacions d'un mateix gen). Es pensa que les causes que podrien contribuir a generar aquesta extraordinària diversitat genètica són una elevada freqüència de mutació i una elevada freqüència de recombinació de petits fragments de DNA d'altres soques d'*Helicobacter pylori*. L'aparent absència d'alguns gens de reparació

19. SOLNICK i SCHAUER (2001).

20. ALM *et al.* (1999).

en el genoma d'*Helicobacter* podria explicar aquesta freqüència de mutació tan gran. Però, d'altra banda, es desconeix la raó per la qual *Helicobacter* integra petits trossos de DNA aliè en el seu cromosoma; es podria pensar que és per a adaptar-se a cada hoste i d'aquesta manera persistir-hi.²¹

L'estudi de l'evolució del polimorfisme i variació de seqüències en les poblacions d'*Helicobacter pylori* des d'un punt de vista global contribueix a entendre la història de la migració humana i la coevolució amb aquest «patogen». L'anàlisi d'aïllats en poblacions d'Àsia oriental, d'Europa i d'Àfrica mostra que les seqüències de fragments de set gens fonamentals (*housekeeping*) i un gen de virulència (*vacA*, al·lels m1 i m2) són diferents segons el continent d'origen. La geografia genètica d'*Helicobacter* coincideix amb les propostes de Cavalli-Sforza i Diamond. Segons aquests arguments, *Helicobacter* deu formar part de la microbiota de l'estómac humà com a mínim des de fa cent mil anys, abans de les primeres migracions humanes.²²

99

* * *

Com a conseqüència de tot el que hem exposat, veiem que la relació patogen-malaltia no sempre és unívoca; que un microorganisme patogen (*Helicobacter pylori*) que ha estat present en les poblacions humanes des de fa molts mil·lennis, pot prevenir contra altres malalties (com l'esòfag de Barrett i l'adenocarcinoma); que molts individus que tenen el patogen no manifesten la malaltia, i que en diferents hostes (com el gat i els rosegadors) microorganismes molt semblants (altres espècies del gènere *Helicobacter*) no tenen cap efecte patogènic i poden ser considerats components de la microbiota nor-

21. KRAFT i SUERBAUM (2005).

22. COVACCI *et al.* (1999).

mal. El descobriment que ha meregut el Premi Nobel de l'any 2005 ens ensenya que la interacció patògen-malaltia és una relació ecològica complexa que necessita ser estudiada més profundament per tal d'arribar a una millor comprensió de les malalties infeccioses i per aconseguir un tractament més eficaç contra els microorganismes patògens.

BIBLIOGRAFIA

Obres i articles citats

- ALLEN, S. J.; THOMAS, J. E.; ALEXANDER, N. D. E.; BAILEY, R.; EMERSON, P. M. (2004). «Flies and *Helicobacter pylori* infection». *Archives of Disease in Childhood*, núm. 89, p. 1037-1038.
- ALM, R. A.; LING, L. S. L.; MOIR, D. T. [et al.](1999). «Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*». *Nature*, núm. 397, p. 176-180.
- BÄCKHED, F.; LEY, R. E.; SONNENBURG, J. L.; PETERSON, D. A.; GORDON, J. I. (2005). «Host-bacterial mutualism in the human intestine». *Science*, núm. 307, p. 1915-1920.
- BLASER, M. J. (1999). «Hypothesis: the changing relationships of *Helicobacter pylori* and humans: Implications for health and disease». *Journal of Infectious Diseases*, vol. 179, núm. 6, p. 1523-1530.
- BLASER, M. J.; ATHERTON, J. C. (2004). «*Helicobacter pylori* persistence: biology and disease». *Journal of Clinical Investigation*, núm. 113, p. 321-333.
- BROCK, T. D. (1966). *Principles of Microbial Ecology*. Englewood Cliffs (Nova Jersey, EUA): Prentice Hall.
- COVACCI, A.; TELFORD, J. L.; DEL GIUDICE, G.; PARSONNET, J.; RAPPUOLI, R. (1999). «*Helicobacter pylori* virulence

- and genetic geography». *Science*, núm. 284, p. 1328-1333.
- DOBELL, C. (1932). *Antony van Leeuwenhoek and his 'Little Animals'*. Nova York: Russell & Russell.
- GUERRERO, R. (2005). «Year's comments». *International Microbiology*, núm. 8, p. 231-234.
- GUERRERO, R.; BERLANGA, M. (2000). «Isótopos estables: fundamento y aplicaciones». *Actualidad SEM*, núm. 30, p. 17-23.
- HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. (2004). «Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases». *Nature Reviews Microbiology*, núm. 2, p. 95-108.
- HENKE, J. M.; BASSLER, B. L. (2004). «Bacterial social engagements». *Trends in Cell Biology*, vol. 14, núm. 11, p. 648-656.
- KRAFT, C.; SUERBAUM, S. (2005). «Mutation and recombination in *Helicobacter pylori*: Mechanisms and role in generating strain diversity». *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 295, núm. 5, p. 299-305.
- MALOY, S.; SCHAECHTER, M. (2006). «The era of microbiology: a Golden Phoenix». *International Microbiology*, vol. 9, núm. 1, p. 1-7.
- MARSHALL, B. J.; WARREN, J. R. (1984). «Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration». *The Lancet*, núm. 16, p. 1311-1315.
- MARSHALL, B. J.; WINDSOR, H. M. (2005). «The relation of *Helicobacter pylori* to gastric adenocarcinoma and lymphoma: pathophysiology, epidemiology, screening, clinical presentation, treatment, and prevention». *Medical Clinics of North America*, vol. 89, núm. 2, p. 313-344.
- McLOUGHLIN, R. M.; O'MORAIN, C. A.; O'CONNOR, H. J. (2005). «Eradication of *Helicobacter pylori*: recent

advances in treatment». *Fundamental and Clinical Pharmacology*, núm. 19, p. 421-427.

RADOSZ-KOMONIEWSKA, H.; BEK, T.; JÓZWIAK, J.; MARTIROSIAN, G. (2005). «Pathogenicity of *Helicobacter pylori* infection». *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 11, núm. 8, p. 602-610.

SOLNICK, J. V.; SCHAUER, D. B. (2001). «Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases». *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 14, núm. 1, p. 59-97.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J. W. (2002). «Biofilms as complex differentiated communities». *Annual Review of Microbiology*, núm. 56, p. 187-209.

Articles generals

BLASER, M. J. (1996). «Origen bacteriano de la úlcera de estómago». *Investigación y Ciencia*, núm. 235 (abril), p. 54-59.

BLASER, M. J. (2005). «*Helicobacter pylori*». *Investigación y Ciencia*, núm. 343 (abril), p. 6-13.

MARSHALL, B. J. «Helicobacter connections». A: *Nobelprize.org* [en línea]. <http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2005/marshall-lecture.pdf>.

MARTÍN DE ARGILA, C. (2001). «*Helicobacter pylori* y enfermedades extradigestivas». *Actualidad SEM*, núm. 31, p. 15-18.

WARREN, J. R. «Helicobacter - The ease and difficulty of a new discovery». A: *Nobelprize.org* [en línea]. <http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2005/warren-lecture.pdf>.

Obres generals

MARSHALL, B. [ed.] (2002). *Helicobacter pioneers: Firsthand accounts from the scientists who discovered helicobacters 1892-1982*. Oxford: Blackwell. ISBN 0-86793-035-7.

MOBLEY, H. L.; MENDZ, G. L.; HAZELL, S. L. [ed.] (2001). *Helicobacter pylori: Physiology and genetics*. Washington: ASM Press. ISBN 1-55581-213-9.

WEBS

<http://www.helicobacterspain.com>: web d'*Helicobacter* en espanyol, feta pels departaments de microbiologia de diferents hospitals i universitats.

<http://www.helico.com>: web de l'*Helicobacter* Foundation, creada per B. J. Marshall el 1994.

<http://www.cdc.gov>: web dels Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, EUA.

<http://www.asm.org>: web de l'*American Society for Microbiology*, Washington, EUA.

