

Received: 2003.07.07

Accepted: 2003.08.29

Published: 2004.03.03

Nanobakterie – charakterystyka mikrobiologiczna

Nanobacteria – microbiological characteristic

Iwona Wilk, Gayane Martirosian

Katedra i Zakład Mikrobiologii Śląskiej Akademii Medycznej

Streszczenie

Celem naszej pracy jest mikrobiologiczna charakterystyka i chorobotwórczość nanobakterii, Gram-ujemnych drobnoustrojów o bardzo małych rozmiarach, które umożliwiają im przechodzenie przez filtry bakteriologiczne i charakteryzującymi się bardzo powolnym wzrostem oraz zdolnością mineralizacji. Zostały one wykryte w bydłowej i ludzkiej krwi, moczu, kamieniach nerkowych oraz płynie pochodzącym z cyst nerkowych. Na podstawie homologii sekwencji podjednostki 16S rDNA, zaliczono nanobakterie do podgrupy α -2 *Proteobacteria*, do której zalicza się także bakterie z rodzaju *Brucella* i *Bartonella*. Nanobakterie są najmniejszymi znanymi bakteriami mającymi ścianę komórkową, ich średnica wynosi 0,2-0,5 μ m. Cechą charakterystyczną tych drobnoustrojów jest tworzenie kryształów apatytu w obojętnym pH i przy fizjologicznych stężeniach wapnia i fosforanów. Obecność apatytu w ścianie komórek bakterii powoduje ich dużą oporność na czynniki fizyczne i chemiczne, które są zabójcze dla innych bakterii. Powstała hipoteza, że nanobakterie mogą odgrywać rolę w chorobach, w których zachodzi proces mineralizacji. Fińscy naukowcy pod kierownictwem Olavi Kajendera sugerują, że apatyt wytwarzany przez te drobnoustroje może odgrywać główną rolę w powstawaniu wszystkich rodzajów kamieni nerkowych. Stanowi on jądro kamienia wokół, którego mogą odkładać się inne składniki.

Słowa kluczowe:**nanobakterie • mikrobiologiczna diagnostyka • kamienie nerkowe**

Summary

We have reviewed recent publications regarding the microbiological characteristic and pathogenicity of a novel infectious agent, the mineral-forming, sterile-filterable, slow-growing Gram-negative Nanobacteria, detected in bovine/human blood, kidney cyst fluid, urine and kidney stones. According to their 16S rDNA structure, nanobacteria belong to the α -2 *Proteobacteria*, subgroup, which includes the *Brucella* and *Bartonella* species. Their cell diameter is 0.2-0.5 μ m (the smallest known cell-walled bacteria). Their most remarkable characteristic is the formation of carbonate apatite crystals of neutral pH and at physiologic phosphate and calcium concentrations. The extracellular mineralization forms a hard protective shelter for these hardy microorganisms, and enables them to survive conditions of physical stress that would be lethal to most other bacterial species. The Olavi Kajander group (Finland) suggests that the apatite produced by nanobacteria may play a key role in the formation of all kidney stones, by providing a central calcium phosphate deposit around which other crystalline components can collect. Nanobacteria seems to be a causative agent of diseases related to biomineralization processes.

Key words:**nanobacteria • microbiology diagnostic • kidney stone****Full_text PDF:**http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_58/4830.pdf**Word count:**

3195

Tables:

-

Figures:

-

References:

26

Adres autorek:

Katedra i Zakład Mikrobiologii Śląskiej Akademii Medycznej, ul. Medyków 18, 40-752 Katowice, tel. (32) 2088-550, e-mail: mikrobiologia@slam.katowice.pl

WSTĘP

Nanobakterie odkryto na początku lat pięćdziesiątych XX w. Fińscy naukowcy z uniwersytetu w Kuopio próbowali wyjaśnić, dlaczego prowadzone przez nich hodowle komórek tkankowych, często kończyły się śmiercią tych komórek. Stwierdzili, że preparaty surowicy bydłowej, dodawane do płynów hodowlanych, były zanieczyszczone nieznanymi dotychczas, niezwykle małymi bakteriami. Dzięki bardzo małym wymiarom (stąd też nazwa – nanobakterie) umożliwiającym im przechodzenie przez filtry bakteriologiczne oraz specyficznym wymaganiom hodowlanym, drobnoustroje nie były wykrywane podczas kontroli jałowości surowic.

Badania przeprowadzone przez Finów wykazały, że nanobakterie były obecne nie tylko w próbkach krwi bydłowej, ale także we krwi 4% studentów Uniwersytetu w Kuopio [7]. Dowodzi to, że mogą one być obecne w wielu powszechnie stosowanych preparatach z krwi ludzkiej. Prowadzone badania sugerują, że nanobakterie mogą odgrywać rolę w tworzeniu kamieni nerkowych i różnych rodzajach zwapnień w organizmie człowieka. Wyniki badań dowodzą, że te drobnoustroje wytwarzają wokół siebie, związki mineralne, o składzie chemicznym podobnym do występującego w kamieniach nerkowych. Według naukowców komórki nanobakterii mogą stanowić centrum krystalizacji, wokół którego są odkładane dalsze warstwy mineralne, co prowadzi do powstania kamieni. Zespół badaczy kierowany przez Olavi Kajandera, odkrywcy nanobakterii, stwierdził obecność tych drobnoustrojów w większości przebadanych kamieni nerkowych [6, 16]. Te wyniki nie są, co prawda ostatecznym dowodem, że nanobakterie są jedyną przyczyną kamicy nerkowej, ale wskazują słusność dalszych badań w tym kierunku.

Ogólna charakterystyka nanobakterii

Na podstawie homologii sekwencji podjednostki 16S rDNA nanobakterie zaliczono do podgrupy α -2 *Proteobacteria*, do której należą też bakterie z rodzaju *Brucella* i *Bartonella* (pasożyty wewnątrzkomórkowe) [7, 15]. Nanobakterie są to najmniejsze jak dotąd poznane bakterie, nadano im nazwę gatunkową *Nanobacterium sanguineum* [7]. Charakteryzują się pleomorfizmem, czyli komórki mogą przebierać kształt kulisty i wtedy ich średnica wynosi 0,2 - 0,5 μm . Często jednak tworzą postacie wydłużone i wtedy ich wymiary wynoszą około 0,05 i 0,2 μm . Dzięki takim rozmiarom i zmiennym kształtom mogą przechodzić nawet przez filtry o średnicy porów 0,1 μm [17].

Nanobakterie mają ścianę komórkową o budowie podobnej do ściany komórkowej występującej u Gram-ujemnych bakterii [6]. Ich cechą charakterystyczną, niespotykaną u innych drobnoustrojów jest zdolność odkładania apatytu. Proces ten zachodzi *in vivo*, a także *in vitro* i przypomina proces tworzenia kości [14]. Mechanizm tworzenia takiej warstwy mineralnej jak dotąd nie został do końca poznany. Wiadomo, że proces ten zachodzi tylko w żywych komórkach nanobakterii i we wszystkich fazach wzrostu. Warstwa apatytu powoduje, że nanobakterie są odporne na wiele czynników fizykochemicznych. Odnaczają się opornością na wysuszenie i wysoką temperaturę (przeżywają w temperaturze 90°C przez jedną godzinę) [3, 17], niewielkie działanie wykazuje promieniowanie ultrafioletowe [17] oraz dezynfekcyjne środki chemiczne, takie jak detergenty, formalina czy alkohol [3]. Są wrażliwe na promieniowanie gamma w dawce 1,5 megarad [17]. Przeprowadzone badania *in vitro* wskazują, że nanobakterie są wrażliwe na chemioterapeutyki z grupy tetracyklin w stężeniu osiąganym przez te związki w surowicy, natomiast wykazują oporność na penicyliny i aminoglikozydy w dawkach terapeutycznych [8, 17]. Jednak nie dowodzi to skuteczności badanych leków *in vivo* i wymaga dalszych badań klinicznych. Związki wiążące wapń, takie jak EDTA i cytryniany hamują wzrost nanobakterii w warunkach *in vitro* [6]. Nie stwierdzono wytwarzania przez te mikroorganizmy ureazy czy fosfatazy alkalicznej [6, 15].

Nanobakterie mają specyficzne wymagania wzrostowe, dlatego w warunkach laboratoryjnych hoduje się je na podłożach używanych do hodowli tkankowych np. DMEM lub na liniach komórkowych. Podłoża hodowlane mogą być wzbogacane surowicą bydłową sterylizowaną promieniami gamma. Jednak jej stężenie nie może przekraczać 10%, ponieważ zawarte w surowicy białkowe inhibitory mogą hamować proces formowania kryształów apatytu [15].

Optymalne warunki wzrostu zapewnia im temperatura 37°C w warunkach tlenowych z dodatkiem 5% CO₂ [12,14,17]. Czas generacji tych drobnoustrojów wynosi około 3 dni, dlatego dopiero po upływie tygodnia od chwili założenia hodowli, wykorzystując mikroskop świetlny z nomarskim kontrastem interferencyjnym (DIC) można zaobserwować położone blisko dna naczynia hodowlanego, ledwie dostrzegalne kolonie nanobakterii.

Po dwóch tygodniach inkubacji bakterie stają się bardziej widoczne, tworząc skupiska. Po upływie miesiąca większość skupisk nanobakterii zaczyna się przyczepiać do dna naczynia hodowlanego, aby po okresie dwóch miesięcy utworzyć biofilm mlecznego

koloru, który można zaobserwować gołym okiem [15]. Morfologię komórek nanobakterii najlepiej obserwować w skaningowym mikroskopie elektronowym. Ukazuje ona komórki, wklęsłą z jednej strony, otoczoną kilkoma cienkimi warstwami mineralnymi. Makroskopowo kolonie nanobakterii można obserwować na zmodyfikowanym podłożu Loefflera po 6 tygodniach inkubacji. Wyrosłe kolonie są koloru szarobrazowego, skamieniałe zagłębiające się w warstwie podłoża hodowlanego o wielkości 1-5 mm [15]. Podczas wzrostu drobnoustrojów nie obserwuje się zmiany pH podłoża. Badane drobnoustroje wykazują podczas badań laboratoryjnych właściwości cytotoksyczne i inwazyjne w stosunku do linii fibroblastów 3T6 [6, 12]. Po 48 godzinach od zakażenia linii komórkowej zmienia się morfologia komórek. Najczęściej obserwuje się dużą wakuolizację komórek i obecność nieprawidłowych jąder (jądra olbrzymie i różnokształtne). Barwienie metodą von Kossa pozwala obserwować zwapnienia występujące wewnątrz i zewnątrz zakażonych komórek [15].

Diagnostyka

Bardzo małe wymiary bakterii, obecność wokół komórek apatytu, a przede wszystkim stosowanie rutynowych metod diagnostycznych w laboratoriach nie pozwalały na wykrycie nanobakterii w materiałach biologicznych. Dopiero zastosowanie specjalnych metod hodowlanych, mikroskopii elektronowej czy immunodiagnostyki pozwoliło na wykrycie i przebadanie tych drobnoustrojów [16]. Podczas badań stwierdzono, że nanobakterie wykazują silny tropizm do nerek [2], dlatego materiałem, w którym głównie są poszukiwane to: kamienie nerkowe, moc, płyn z torbieli nerkowych, biopaty z nerek. Kamienie nerkowe przed dalszymi badaniami należy sproszkować i zdeminalizować. Pozostałe materiały biologiczne przechowywać zamrożone w temperaturze -60°C , jeżeli badania nie są wykonywane bezpośrednio po ich pobraniu [12].

Metody hodowlane wymagają stosowania ściśle aseptycznych technik, jakie są wymagane przy zakładaniu hodowli tkankowych. Badany materiał przed posianiem poddaje się filtrowaniu z zastosowaniem filtrów o średnicy por $0,22\ \mu\text{m}$, w celu wyeliminowania innych drobnoustrojów. Hodowle prowadzi się w temperaturze 37°C i atmosferze wzbogaconej $5\% \text{CO}_2$, w podłożach używanych do hodowli komórek tkankowych. Metody hodowlane są jednak czasochłonne. Szybkie wykrycie nanobakterii w materiałach biologicznych umożliwia zastosowanie metod immunodiagnostycznych (np. immunofluorescencji pośredniej), z użyciem przeciwciał monoklonalnych-Nb8/0 oraz

Nb5/2. Pierwsze z nich wiążą się z białkiem porynowym, a drugie z epitopem peptydoglikanowym obecnym w ścianie nanobakterii [6, 12].

Chorobotwórczość

W niektórych chorobach występuje patologiczne odkładanie minerału, jakim jest fosforan wapnia. Mechanizmy wywołujące tego rodzaju zjawisko nie zostały na razie poznane. Istnieje duże prawdopodobieństwo, że nanobakterie mogą być czynnikiem etiologicznym w tego rodzaju przypadkach.

Kamica nerkowa jest jedną z najczęstszych chorób układu moczowego [6, 26]. Predysponują do wystąpienia tej choroby: zaburzenia metaboliczne, nieprawidłowości anatomiczne i fizjologiczne dróg moczowych, infekcje, warunki środowiska oraz nieodpowiednia dieta [22, 24]. Badania epidemiologiczne wskazują na ciągły wzrost zachorowań na kamicę nerkową, dlatego prowadzone są intensywne badania fizyko-chemicznych mechanizmów powstawania kamieni nerkowych. Powstawanie kamieni nerkowych jest związane z krystalizacją lub wytrącaniem mineralnych składników moczu, których stężenie w moczu przekracza ich próg rozpuszczalności. Następstwem tego procesu jest agregacja i powstawanie coraz większych złożeń związków mineralnych [22, 24]. Kamienie dróg moczowych sklasyfikowano i podzielono na kilka grup w zależności od rodzaju składników mineralnych wchodzących w ich skład. Najczęściej występują kryształy szczawianu wapnia i fosforanu wapnia, mniejszy udział ma fosforan amonowo-magnezowy (struwit) i węglan fosforowo-wapniowy (węglan apatytu) oraz kwas moczowy, natomiast cystyna i ksantyna stanowią około 2% kamieni moczowych [6, 22, 24]. Wapienne kamienie nerkowe są przeważnie umiejscowione na powierzchni brodawk nerkowych, składają się z organicznej macierzy stanowiącej prawie 3% masy kamienia i części krystalicznej zbudowanej ze szczawianu wapnia i/lub fosforanu wapnia [18].

Krystaliczne składniki kamieni układu moczowego są połączeniem dwóch lub więcej składników, jednak w przeważającej części tworzą je szczawian wapnia i apatyt [1, 11]. Kamienie zwane infekcyjnymi stanowiące $4-15\%$ wszystkich kamieni, zawierają w swoim składzie fosforan amonowo-magnezowy i apatyt. Bakterie hodowane z tych kamieni zwykle wytwarzają ureazę. Należy tu przede wszystkim wymienić bakterie z rodzaju *Proteus* spp., a także również inne bakterie Gram-ujemne z rodzajów *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Providencia*. Z bakterii Gram-dodatnich przeważają szczepy z rodzaju *Staphylococcus* i *Corynebacterium* [19, 23]. Powstawaniu tego rodzaju

kamieni sprzyjają procesy wynikające z działania ureazy, takie jak alkalizacja moczu i przesycenie moczu fosforanami magnezu i wapnia. Dodatkowymi czynnikami sprzyjającymi są: wzrost aktywności fosfatazy zasadowej, urokinazy i neuraminidazy wytwarzanych przez te drobnoustroje [10] oraz obecność polisacharydów na powierzchni komórki [21]. Polisacharyd komórkowy, czyli bakteryjny glikokaliks, ułatwia adhezję drobnoustrojów do nabłonka dróg moczowych, co prawdopodobnie sprzyja agregacji kryształów związków mineralnych [19, 20]. Jednak w wielu przypadkach powstawanie kamieni nie było związane z podwyższonym pH moczu i obserwowano je przy prawidłowych stężeniach wapnia i fosforanów. Drobnoustroje ureazoujemne takie jak *Escherichia coli*, czasami również mogą występować w kamieniach infekcyjnych [6]. Badania prowadzone nad nanobakteriami wykazały, że wytwarzają one węglan apatytu, mają właściwości cytotoksyczne oraz nie wytwarzają ureazy i fosfatazy zasadowej. Powstała hipoteza zakładająca, że mikroinfekcje występujące na brodawkach nerkowych mogą być wywołane przez nanobakterie, które będą spełniały jednocześnie funkcje elementarnego ogniska, na bazie, którego powstaje kamień [4]. Możliwe, że mechanizm powstawania kamieni nerkowych w wyniku infekcji nanobakteriami, będzie odpowiadał teorii Randalla [6,16]. Teoria ta została ogłoszona w 1936 roku i potwierdzona w 1985 roku przez Cifuentes-Delatte, Minon-Cifuentes i Medina [9]. Zakłada, że pod wpływem działania bakterii pod nabłonkiem brodawki nerkowej odkładają się związki wapnia. Rozrastająca się warstwa wapniowa powoduje uszkodzenie nabłonka brodawki. Jej ciągły kontakt z moczem, obecnym w kielichach nerkowych powoduje, że sole mineralne odkładane w warstwie wapiennej tworzą kamień. Podstawą kamienia jest odlew brodawki, natomiast jego szczyt jest skierowany do światła kielicha nerki [16, 22]. Kamienie występujące na brodawkach nerkowych są małe, okrągłe. Mają jedną wypukłą i gładką powierzchnię, zaś część kamienia odpowiadająca za wszczepienie do brodawki jest wklęsła. Związki apatytu występowały w różnych proporcjach we wszystkich kamieniach nerkowych. Podczas badań *in vitro* w hodowlach nanobakterii obserwowano podobne formacje. Obraz z mikroskopu elektronowego ukazuje wklęsłą powierzchnię komórki bakterii, którą przylega do dna naczynia hodowlanego. Widoczne są również miejsca mineralizacji, tworzące kilka cienkich warstw mineralnych, takich samych jak w kamieniach nerkowych [15]. Ponieważ, nanobakterie wykazują tropizm do nerek i mają zdolność odkładania apatytu na powierzchni swoich komórek mogą tworzyć mikroskopijne zwapnienia. Dalszy rozwój komórek

drobnoustrojów prowadzi do uszkodzenia nabłonka i rozrostu kamienia.

Za czynnym udziałem nanobakterii w procesie powstawania kamieni nerkowych przemawia wiele danych uzyskanych podczas badań. Z przeszło 90% przebadanych kamieni wyizolowano nanobakterie. Są one jedynymi znanymi drobnoustrojami w ludzkim organizmie wytwarzającymi apatyt i wykazującymi tropizm do nerek. Mają właściwości cytotoksyczne w stosunku do komórek ssaków. Przeważająca większość kamieni nerkowych w swoim składzie zawiera apatyt.

Podczas badań chorych na wielotorbielowatowość nerek wykryto w surowicy, płynie z cyst i moczu nanobakterie. Doświadczenia przeprowadzane na zwierzętach dowodzą, że te mikroorganizmy mogą być odpowiedzialne za anomalie występujące w nerkach podczas tej choroby. Nanobakterie podane dożylnie doświadczalnym zwierzętom wykazywały tropizm do nerek i wywoływały apoptozę komórek kanalików nerkowych. Nadmierna apoptoza i niedrożność kanalików nerek, występujące w wielotorbielowatowości nerek są wyrazem wzmożonego ich zwapnienia, co może sugerować udział nanobakterii w rozwoju tej choroby [15].

Naukowcy dopatrują się także udziału nanobakterii w malakoplakii. Jest to rzadka choroba o nieznannej etiologii. W układzie moczowo-płciowym (głównie w cewce i pęcherzu moczowym, moczowodach i nerkach) następuje rozrost nowotworowy. Powstałe guzy charakteryzują się intensywnym naciekaniami histiocytoz, zawierających wewnątrz- i zewnątrzkomórkowo skupiska zbudowane z apatytu (ciałka Michaelisa-Gutmana) [5, 13, 15].

Zwapnienia tkanek są wspólną cechą występującą w przebiegu wielu chorób o różnorodnej etiologii. W przebiegu np. arteriosklerozy w płytkach miażdżycowych odkładany jest fosforan wapnia. U hemodializowanych pacjentów czasami występują rozległe przerzuty nowotworowe ze zwapnieniem guzów o niewyjaśnionym mechanizmie [25]. W ostrym zapaleniu okołostawowym występują wewnątrzścięgliste zwapnienia. Wykazano również, że wiele komórek nowotworowych ma receptory nanobakterii, co umożliwia wnikanie bakterii do wnętrza guza i prowadzi do jego zwapnienia [9, 15]. W związku z powyższym nie można wykluczyć udziału nanobakterii jako czynnika etiologicznego w tego rodzaju chorobach. Wskazuje to na słuszność kontynuacji kompleksowych badań w celu wyjaśnienia roli nanobakterii w etiopatogenezie schorzeń cywilizacyjnych.

PIŚMIENICTWO

- [1] Abraham P.A., Smith C.L.: Evaluation of factors involved in calcium stone formation. *Miner. Electrol. Metab.* 1987, 13, 201-208.
- [2] Akerman K., Kuikka J.T., Ciftcioglu N., Parkkinen J., Bergstrom K., Kuronen I., Kajander E.O.: Radiolabeling and in vivo distribution of nanobacteria in rabbit. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.* 1997, 3111, 436-442.
- [3] Bjorklund M., Ciftcioglu N., Kajander E.O.: Extraordinary survival of nanobacteria under extreme conditions. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.* 1998, 3441, 123-129.
- [4] Bradbury J.: Nanobacteria may lie at the heart of kidney stones. *Lancet* 1998, 352, 121.
- [5] Carson D.A.: An infectious origin of extraskeletal calcification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 7846-7847.
- [6] Ciftcioglu N., Bjorklund M., Kuorikoski K., Bergstrom K., Kajander E.O.: Nanobacteria: an infectious cause for kidney stone formation. *Kidney Int.* 1999, 56, 1893-1898.
- [7] Ciftcioglu N., Kuronen I., Akerman K., Hiltunen E., Laukkanen J., Kajander E.O.: A new potential threat in antigen and antibody products: nanobacteria. W: *Vaccines 97*. red.: Brown F., Burton D., Doherty P., Mekalanos J., Norrby E., Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York 1997, 99-103.
- [8] Ciftcioglu N., Miller-Hjelle M.A., Hjelle J.T., Kajander E.O.: Inhibition of nanobacteria by antimicrobial drugs as measured by a modified microdilution method. *Antimicrob. Agents Chem.* 2002, 46, 2077-2086.
- [9] Cifuentes-Delatte L., Minon- Cifuentes J.L., Medina J.A.: Papillary stones: Calcified renal tubules in Randall's plaques. *J. Urol.* 1985, 133, 490-495.
- [10] Du Toit P.J., Van Asvegen C.H., Nel J.A., Stegn P.L., Lithelm A.J., Plessis D.J.: In vivo effects of urease-producing bacteria involved with the pathogenesis of infection-induced urolithiasis on renal urokinase and sialidase activity. *Urol. Res.* 1995, 23, 335-338.
- [11] Grases F., March J.G., Conte A., Costa-Bauza A.: New aspects on the composition, structure and origin of calcium oxalate monohydrate calculi. *Eur. Urol.* 1993, 24, 381-386.
- [12] Hjelle J.T., Miller-Hjelle M.A., Poxton I.R., Kajander E.O., Ciftcioglu N., Jones M.L., Caughey R. C., Brown R., Millikin P.D., Darras F.S.: Endotoxin and nanobacteria in polycystic kidney disease. *Kidney Int.* 2000, 57, 2360-2374.
- [13] Ho K.L.: Morphogenesis of Michaelis-Gutmann bodies in cerebral malacoplakia. An ultrastructural study. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1989, 113, 874-879.
- [14] Kajander E.O., Bjorklund M., Ciftcioglu N.: Mineralization by nanobacteria. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.* 1998, 3441, 86-94.
- [15] Kajander E.O., Ciftcioglu N.: Nanobacteria: an alternative mechanism for pathogenic intra-and extracellular calcification and stone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 8274-8279.
- [16] Kajander E.O., Ciftcioglu N., Miller-Hjelle M.A., Hjelle J.T.: Nanobacteria: controversial pathogens in nephrolithiasis and polycystic kidney disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2001,10, 445-452.
- [17] Kajander E.O., Kuronen I., Akerman K., Peltari A., Ciftcioglu N.: Nanobacteria from blood, the smallest culturable autonomously replicating agent on Earth. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.* 1997,3111, 420-428.
- [18] Khan S.R.: Animal models of kidney stone formation: An analysis. *World J. Urol.* 1997, 15, 236-242.
- [19] Lerner S.P., Gleeson M.J., Griffith D.P.: Infection stones. *J. Urol.* 1989,141, 753-758.
- [20] Mc Lean R.J., Nickel J.C., Noakes V.C., Cocterton J.W.: An in vitro ultrastructural study of infectious kidney stone genesis. *Infect. Immun.* 1985, 49, 805-811.
- [21] Nickel J.C., Emtage J., Consterton J.W.: Ultrastructural microbial ecology of infection-induced urinary stones. *J. Urol.* 1985, 133, 622-627.
- [22] Orłowski Z.: Kamica nerkowa. W: *Choroby nerek*, red.: Orłowski T. PZWL, Warszawa 1983, 386-394.
- [23] Stolarczyk J., Lorenz J., Otręba L., Dembowski J.: Zakażenie drobnoustrojami rozkładającymi mocznik. *Urol. Pol.* 1981,34, 47-50.
- [24] Zieliński J., Kokot F., Borkowski A., Leńko J.: Kamica moczowa. W: *Urologia*, t.2, red.: Zieliński J., Leńko J. PZWL, Warszawa 1993, 280-322.
- [25] Zins B., Zingraff J., Basile C., Urena P., Bardin T., Druke T.: Tumoral calcifications in hemodialysis patients: possible role of aluminium intoxication. *Nephron* 1992, 60, 260-267.
- [26] Verkoelen C.F., Van Der Boom B.G., Schroder F.H., Romijn J.C.: Cell cultures and nephrolithiasis. *World J. Urol.* 1997, 15, 229-235.