

纳米细菌研究

王利民, 沈文律, 张士莲

王利民, 唐山工人医院肝胆外科 河北省唐山市 063000
沈文律, 汕头大学医学院附属第二医院 广东省汕头市 515041
张士莲, 开滦矿务局医院 河北省唐山市 063000
通讯作者: 王利民, 063000, 河北省唐山市文化路27号, 唐山工人医院肝胆外科, g_lmwang@sina.com.cn
电话: 0315-3722208 传真: 0315-3722104
收稿日期: 2005-08-26 接受日期: 2005-11-04

摘要

纳米细菌(nanobacteria, Nb)是近年来才被发现的超微细菌. 纳米细菌体积小极其微小, 其最小直径仅50 nm, 大大低于理论上细菌体积的下限. 因此纳米细菌在被发现的初期, 其存在的真实性就受到许多学者的质疑, 并且由此引发了一场关于微生物最小体积的争论. 随着研究的不断深入, 纳米细菌的生物学特性不断地被揭示, 纳米细菌已经成为当前研究的一个热点问题. 在医学界, 纳米细菌被认为与肾结石、胆囊结石、动脉粥样硬化等病理性钙化疾病的发生有关系. 本文在复习大量文献的基础上, 针对纳米细菌的生物学特性以及纳米细菌与人类疾病等方面作一简单的回顾与总结.

关键词: 纳米细菌; 生物矿化; 细菌被膜; 胆囊结石; 肾结石

王利民, 沈文律, 张士莲. 纳米细菌研究. 世界华人消化杂志 2005;13(23): 2783-2787
<http://www.wjgnet.com/1009-3097/13/2783.asp>

0 引言

芬兰科学家Ciftcioglu *et al*^[1]进行哺乳动物细胞培养时发现细胞内存在一种原核微生物, 能通过100 nm的滤菌器, Kajander将其命名为纳米细菌 (nanobacteria). 纳米细菌广泛存在于自然界的矿物质中和生物体内, 能感染人类、牛、鹿和其它哺乳动物, 是一种人畜共患的致病原. 纳米细菌能感染人体任何组织和细胞, 分泌钙化的脂多糖生物膜, 具有较大的毒性, 能引起受感染细胞发生空泡样改变, 与人类多种疾病的发生密切相关^[2-8]. 纳米细菌的发现及其生物学特性的揭示, 引起了众多国内外学者的关注^[9-38].

1 纳米细菌的发现

芬兰科学家Ciftcioglu *et al*^[1]在其细胞培养过程中, 发现在胎牛血清中存在一种直径50-500 nm的微粒; 这种颗粒物对伽玛射线具有很强的耐受性; 针对包括支原体在内的所有已知微生物的特异性检测实验均为阴性; 这种颗粒物在血琼脂培养基以及支原体培养基中无法生长, 通常的细菌染色方法难以着色. 因此, Kajander判定这是一种新的微生物, 根据其体型微小并且栖息在血

液中的特点, 将其命名为Nanobacterium sanguineum, 简称Nanobacteria^[39], 中文译名纳米细菌, 并将菌种保存于德国微生物存储中心 (DSM No: 5819-5821, the German Collection of Micro-organisms, Braunschweig, Germany).

2 纳米细菌的生物学特性

2.1 纳米细菌——哺乳动物体内最小的细菌 细胞培养时所使用的血清通常采用过滤法达到无菌的目的, 通常采用直径0.1 μm 的滤膜过滤除菌. Kajander研究发现, 0.1 μm 的滤膜过滤并不能有效地清除血清中的纳米细菌, 但是血清经过0.05 μm 的滤膜过滤则能有效清除纳米细菌污染. 细胞培养条件下的纳米细菌经过0.2 μm 的滤膜过滤后约有3%的纳米细菌可以通过滤膜, 而在加压过滤的情况下, 约有50%的纳米细菌可以通过0.2 μm 的滤膜. 刚刚经过过滤的纳米细菌在相差显微镜下无法发现, 但在不含血清添加剂的细胞培养液中培养24 h后, 即可以用相差显微镜观测到. 电子显微镜观察显示, 纳米细菌的平均直径为200 nm, 而子代纳米细菌的最小直径仅50 nm. 传统的观点认为, 只有当细胞直径在不低于140 nm时, 才能维持其最基本的新陈代谢^[40,41]. Kajander认为, 纳米细菌可能是地球形成早期、在原始大气条件下的一种最原始的生命形式, 因此不能用衡量已经经过几十亿年进化的生命形式的观点去衡量这种古老的生命形式^[42], 并且推测, 纳米细菌遭受不良因素的侵害后可以形成许多的体形微小的碎片, 并将其释放到环境中, 每一个碎片都可能携带部分遗传信息, 在特定条件下, 这些"基本"颗粒聚集在一起形成群落, 当足够数量的"基本"颗粒提供完整的遗传信息时, 则可以形成新的纳米细菌.

2.2 纳米细菌缓慢的增殖周期 微生物学家通常是通过某种微生物进行培养, 进而了解该种微生物的特性. 然而, 并非每种微生物都是可以在实验室中进行培养的, 主要原因在于这些微生物的培养条件我们并不清楚, 其生存环境以及是否与其他微生物存在共生关系我们并不十分了解^[43]. 纳米细菌就是一种对生长环境要求非常苛刻的微生物, 其新陈代谢率极为缓慢, 仅为普通细菌的1/10 000^[44]. 研究发现, 纳米细菌主要利用环境中的氨基酸而不是葡萄糖来提供能量, 谷氨酰胺、天冬酰胺以及精氨酸均可被其利用. 在37 $^{\circ}\text{C}$ 有50-10 mL/L的二氧化碳及900-950 mL/L的空气存在的潮湿环境下, 并且在含有100 mL/L胎牛血清和适量谷氨酰胺的pH值7.4的细胞培养基中, 纳米细菌能够缓慢生长, 平均倍增时间为3 d,

而在无血清的细胞培养基中,其增殖速度变慢,细菌倍增时间可延长至5-6 d,在添加适量促纳米细菌生长因子BGF(一种杆菌培养上清的超滤液)或N3(纳米细菌培养上清的超滤液)的条件下,其增殖速度加快,倍增时间可缩短至0.6-1 d.在有促纳米细菌生长因子BGF存在的条件下,纳米细菌甚至可以在固体培养基中生长,并形成直径1 mm大小的细菌集落.

2.3 纳米细菌独特的生物矿化现象 当在含血清的培养基中培养的纳米细菌被转移至不含血清的培养基中继续培养时(DMEM或RPMI-1640),在1 a之内就可以观察到纳米细菌出现贴壁现象,在1 wk之内,就可以在纳米细菌的周围形成几微米厚的生物被膜(biofilm),并且紧紧贴附于培养瓶底部,而纳米细菌栖息其中^[20](这与在含血清培养基中培养的纳米细菌的形态明显不同),此时其大小接近于一个酵母细胞,2-3 wk以后,由于生物被膜的增厚,其直径已近似于一个红细胞的大小.用EDX法对这种生物被膜的化学组成进行分析,显示其钙磷的峰值与羟基磷灰石极其相似,电子显微镜观察以及傅立叶转换红外频谱(fourier transform IR spectroscopy, FTIR)分析显示其主要成分为碳酸羟基磷灰石(carbonate hydroxyapatite)^[2],而且,不论在有无血清作为添加剂的情况下,都可以见到这种被羟基磷灰石包绕的纳米细菌,这种情况甚至可以在处于分裂期的纳米细菌中见到.纳米细菌并不产生尿激酶和碱性磷酸酶,并且即便经过长达数周的培养,其培养基的pH值也不会出现明显的变化,一直稳定在7.4左右,这表明在纳米细菌细胞膜表面所生成的羟基磷灰石结晶是源自于生物大分子的,即生物矿化现象,而并非是由于pH值改变所导致的简单的物理结晶现象.

纳米细菌利用培养体系中的钙、磷合成羟基磷灰石作为其生物被膜的主要成分,这种生物矿化过程受到生长环境中某些因素的调控,从而使其呈现不同的外观,如羟基磷灰石形、细菌被膜形、沙粒形、结石形和类似肿瘤的外形.在含有新鲜血清的培养基中纳米细菌的生物矿化现象程度较轻微,这是由于血清中含有强效羟基磷灰石合成抑制因子,骨钙素^[45](osteocalcin)和胎球蛋白(fetuin)^[46],由于这些抑制蛋白的存在,所以在有血清存在的情况下,纳米细菌的生物矿化作用受到明显抑制.当血清浓度降低时,纳米细菌的生物矿化现象增强,在不含血清的培养体系中,生物矿化现象剧烈而迅速.尽管改良的Loeffler固体培养基中含有750 mL/L血清成分,但血清蛋白成分在灭菌过程中受到破坏,所以在此培养基中的纳米细菌的矿化作用并不受抑制,在此培养基中生长的纳米细菌其菌落直径可达1-5 mm.另外,当有乙二胺四乙酸(EDTA)存在时,纳米细菌的生物现象会受到明显的抑制.

由于矿化生物被膜的保护作用以及极其缓慢的新陈代谢率,使纳米细菌能够耐受各种不利的物理条件^[47]和化学损伤因素^[25]以及多种抗生素^[48]的打击.

2.4 纳米细菌的检测方法 由于纳米细菌在标准微生物培养基中无法生长,并且即便是在最适宜其生长的细胞培养环境中,纳米细菌的生长也极为缓慢,其新陈代谢率仅为普通细菌的万分之一,这使得许多基于检测细菌新陈代谢的微生物学方法无法检测纳米细菌的存在.由于纳米细菌难以用传统的火焰法和乙醇法固定,并且大多数染料无法穿透其细胞壁,而且不能用普通显微镜对其进行观察,因此常规的细菌学染色法并不能检测到纳米细菌的存在.通过Kajander *et al*^[43]的研究,发现70℃干烤10 min,可以将其有效固定;另外,用茜素红S、刚果红以及硝酸银染料可以使纳米细菌着色;而培养状态下的纳米细菌可以在放大400倍的相差显微镜下清晰地观察其生长情况;用DNA荧光染料(Dapi或Hoechst)按普通细菌DNA染色的条件对纳米细菌DNA进行染色均不成功,而当按照线粒体DNA以及病毒DNA染色条件,对纳米细菌DNA进行染色时,荧光显微镜下可以观察到特征性的荧光;用纳米细菌特异性抗体进行荧光染色也可以清晰地显示纳米细菌的存在;利用电子显微镜对经过负染的纳米细菌进行观察,可以清晰的显示80-350 nm大小、单独或聚集成簇的纳米细菌以及其表面的生物被膜(biofilm)结构;而用透射电镜对纳米细菌的超薄切片进行观察,可以清晰的显示其内部结构^[2,21].

2.5 纳米细菌的核酸 因为蛋白酶K、蛋白激酶、脂肪酶、淀粉酶以及超声波不能有效地破坏、裂解纳米细菌,所以不能采用标准的核酸抽提法^[49]抽提纳米细菌的核酸.Kajander *et al*^[43]用HCl对纳米细菌进行消化:室温时,将纳米细菌置于1 mol/L的HCl中数分钟后,其羟基磷灰石外壳便会消失,随后,纳米细菌的蛋白和核酸成分逐渐被释放到裂解液中.用HCl裂解法从纳米细菌中抽提的"核酸"成分的最大紫外吸收峰在270 nm处,而按常规方法抽提的普通细菌的核酸的最大紫外吸收峰在260 nm处^[43].由于用盐酸裂解法抽提的"核酸"产物在pH值高于2-3时发生凝聚现象,所以未能对其进行进一步分析.

经过实验,发现除用1 mol/L的HCl消化外,EDTA-SDS溶液二次煮沸消化、EDTA-EGTA-枯草杆菌蛋白酶(subtilisin)消化、液氮研磨法以及木瓜蛋白酶-SDS消化,均能达到消化纳米细菌的目的.用后面几种方法消化纳米细菌后都可以获得白色纤维素样的抽提物,虽然这种物质在其抽提过程中表现出与DNA相似的沉淀、溶解特征,然而并不能被EB(溴苯乙啶)染色,而针对胞嘧啶及其修饰物的特异性探针检测均呈现非特异性结合,从而显示其并非核酸成分.

紫外光谱研究显示,这种假想的"核酸"与HCl裂解纳米细菌所得"核酸"具有相似的紫外吸收峰,其最大紫外吸收峰在269-270 nm,这与核酸中胸腺嘧啶(T, 269-270 nm)和胞嘧啶(C, 271-275 nm)含量高而腺嘌呤、鸟嘌呤(A、G, 250-260 nm)含量低的情况相吻合.而高效液

相色谱(HPLC)分析显示, 这种假想的“核酸”不能被蚁酸水解成单个的核苷酸。而在3 mol/L或5 mol/L的HCl中煮沸5 h, 再经葡聚糖凝胶G-50柱层析后, HPLC分析其水解产物表现出比较纯的核苷酸 (nucleobase) 的峰值, 其中两个峰值与methyldeoxyadenosine(甲基脱氧嘧啶)和7-deazaadenosine特征性的峰值相同^[43]。

2.6 纳米细菌的系统发生学分类 用纳米细菌中提取的核酸作为PCR模板扩增16S rRNA基因。使用通用引物1492 RPL (GGCTCGAGCGGCCGCGGGTTAC CTTGTTACGACTT) 和细菌特异性引物8FPL(GCGGATCCGCGGCCGCTGC AGAGTTTGATCTGGCTCAG)进行PCR反应^[38,50]。结果显示, 纳米细菌16S rRNA基因序列含有1 406个碱基, 其系统发生学分类显示, 纳米细菌属于Proteobacteria属的 α 2亚群。与其近缘的细菌大多栖息于土壤、温泉、哺乳动物细胞和植物体内。例如: Rhizobia (根瘤菌) 可以侵入植物的细胞中与宿主形成共生, 而Agrobacteria和Phyllobacteria可以导致宿主患病, Brucella (布鲁氏菌) 和Bartonella (巴尔通氏体菌) 能在哺乳动物的细胞内寄生, 从而造成人与动物患病, 纳米细菌可与这两种细菌产生交叉免疫反应。而与纳米细菌最为近源的细菌是Thiobacillus, 这种细菌生存在温泉中, 能导致温泉中的碳酸盐沉淀^[51,52]。

3 纳米细菌的致病性

3.1 纳米细菌的细胞毒作用 纳米细菌对体外培养的细胞具有细胞毒性作用^[53]。将成纤维细胞和纳米细菌共同培养时, 纳米细菌在十几分钟之内便开始吸附于细胞膜的特定区域, 并逐渐通过受体介导的胞饮作用被转移至细胞内部, 分布在包涵体富集的细胞核周围, 在溶酶体的消化作用下形成细胞核周围的空泡状结构, 纳米细菌在其中被缓慢降解, 细胞感染纳米细菌1-3 d后, 开始出现凋亡的形态特征。如果纳米细菌在含血清的培养基中经过数次传代培养, 其细胞毒性作用会明显减弱甚至消失。研究表明, 纳米细菌细胞毒性作用的发生机制, 与其在细胞内被降解释放出内毒素有关, 其细胞毒性与纳米细菌浓度和细胞在纳米细菌中暴露时间成正比。

Kari *et al*^[54]用^{99m}Tc标记纳米细菌后通过耳缘静脉注入到实验兔体内, 用SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) 观察纳米细菌在实验兔体内的分布。发现纳米细菌注入兔子静脉内10-12 min时, 在脾脏、心脏、肾脏及胃肠道中具有较高的放射活性; 45 h后, 在实验兔子尿液以及肝脏、肾脏、脾脏等组织中仍具有较高的放射活性。

由于800 mL/L的牛血清制品中存在纳米细菌感染^[38], 因此牛可能是纳米细菌的自然宿主。纳米细菌通过污染牛血液制品而对全世界范围内与细胞培养有关的科研工作与临床医疗安全造成不利影响。由于纳米细菌不仅体形微小能够侵入细胞内, 而且其新陈代谢极为缓慢

并且能够合成矿化的生物被膜, 具有极强的抵抗不利环境的特点, 因此纳米细菌一旦造成人和动物的感染, 则很难被机体的防御机制清除, 进而造成受感染者的生理机能紊乱。大约8%的正常人血液中存在纳米细菌抗原^[38,55], 现研究表明纳米细菌与肾结石、胆结石、前列腺炎、多囊肾、多囊肝、动脉粥样硬化等疾病有关^[2-8,56]。

3.2 纳米细菌与肾结石 肾结石是一种泌尿系统常见病^[57-65], 肾绞痛发作时患者异常痛苦。肾结石患者可以并发泌尿系统感染、肾盂积水, 严重时 can 导致肾功能衰竭。肾结石的晶体成分包括草酸钙、磷酸钙、细菌、嘌呤、胱氨酸等, 其中绝大多数为草酸钙与磷灰石的复合物。部分肾结石的形成与细菌感染有关, 尿液中的细菌产生尿素酶、尿酸酶、碱性磷酸酶, 使尿液的pH值升高, 从而有利于肾结石的形成。但Grases *et al*^[66]发现部分患者肾结石的形成并不是由尿液的pH值升高所致, 从而推测尿液中存在其他微生物的感染。Kajander *et al*^[2]对30例肾结石患者进行纳米细菌培养, 均得到阳性结果, 在其后的动物实验中, 发现静注^{99m}Tc标记的纳米细菌15 min后, 纳米细菌可在实验兔肾脏中聚集并排泄至尿液中^[64], 因此认为纳米细菌在体内可能诱导钙化和促进肾结石的形成, 其依据主要有以下几方面: (1)在人类的血液发现了纳米细菌; (2)纳米细菌作为有生命的微生物可从血液排泄到尿液中; (3)在人肾结石中发现了纳米细菌抗原; (4)纳米细菌攻击成纤维细胞, 发生细胞内、外钙化, 并具有细胞毒性作用。Ciftcioglu *et al*^[67]对72例肾结石患者进行纳米细菌培养和单克隆抗体免疫荧光染色鉴定, 其中70例阳性(97.2%)。Garcia Cuerpo *et al*^[68]应用培养的纳米细菌经皮做肾穿刺注射, 成功地建立了纳米细菌致肾结石的动物模型, 从而证实纳米细菌感染可以导致肾结石发生。

3.3 纳米细菌与肾囊性病 多囊肾是一种常染色体显性遗传病, 患者常常死于肾功能衰竭。Hjelle *et al*^[4]在84.7%多囊肾患者的血清、囊液、囊壁及尿液中培养出纳米细菌, 并发现囊液中的内毒素主要由纳米细菌产生。纳米细菌在多囊肾的发生、发展中起着重要的作用, 其发病机制可能为: 纳米细菌依靠其周围的矿化外壳作为载体, 吸附尿液中的各种毒素, 并通过胞饮作用使细菌溶酶体破裂释放出毒素和自由基, 损害肾小管上皮细胞, 使其脱落至尿液中, 久之造成肾小管梗阻和肾组织不可复性损害, 形成肾囊肿。

3.4 纳米细菌与动脉粥样硬化 近年来, 有学者认为感染因素可能与动脉粥样硬化的发生有关, 有关动脉粥样硬化感染学说的研究受到广泛的关注。众所周知, 动脉硬化是一个脂质沉积于动脉壁局部和斑块形成的过程, 此过程由一种炎症反应介导。与炎症反应有关的感染物质有肺炎衣原体、幽门螺杆菌、巨细胞病毒和各种致病微生物。肺炎衣原体是与动脉粥样硬化因果关系研究中论据最多的病原微生物, 离体和体内实验研究表明肺炎衣原体致病机制可能是加速局部脂质沉积, 但这一学说无法

解释粥样斑块中存在大量钙化物的现象. 由于纳米细菌本身具有矿化能力, 一些学者认为其可能参与了动脉粥样斑块的形成. Miller *et al* [6]从粥样斑块中培养出纳米细菌, 从而推断纳米细菌在动脉粥样斑块形成中起到重要的作用. Maniscalco *et al* [69]对77例血清学检查纳米细菌阳性的冠状动脉硬化患者采用comET治疗4 mo, 57%患者冠脉狭窄程度明显改善, 14%患者冠脉狭窄中度改善, 约84%(16/19) 患者的心绞痛症状缓解, 从而认为此药物可能是通过杀灭粥样斑块中的纳米细菌达到治疗作用.

3.5 纳米细菌与胆结石 胆石病发病率高, 危害严重, 发病机制至今尚未完全明了^[70-73]. 中南大学湘雅二医院Wen *et al* [74]对75例胆道疾病患者的胆汁标本进行纳米细菌培养, 经免疫组织化学染色和电子显微镜观察证实, 胆道疾病患者胆汁纳米细菌感染阳性率为61.3%; 用ELISA法检测76例胆囊结石患者血清中纳米细菌抗原, 24例纳米细菌呈阳性, 阳性率为31.6%, 而338例正常人群血清中仅有27例呈阳性, 阳性率为8%, 两者比较差异显著^[55]. 以上结果说明, 胆汁纳米细菌感染, 可能与胆囊结石的发生有关, 我们在这方面进行了进一步的研究, 动物实验显示, 注射纳米细菌的实验兔胆囊结石的发生率为83%(25/30), 而对照组动物胆囊结石的发生率仅为17%(5/30), 两组比较差异显著, 说明胆汁纳米细菌感染确实能引起兔胆囊结石的发生. 有必要对其成石机制进行深入研究.

4 参考文献

- Ciftcioglu N, Kuronen I, Akerman K, Hiltunen E, Laukkanen J, Kajander EO. A new potential threat in antigen and antibody products: Nanobacteria. *Vaccines* 97, eds. Brown F, Burton D, Doherty P, Mekalanos J, and Norrby E. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1997; 99-103
- Kajander EO, Ciftcioglu N. Nanobacteria: an alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8274-8279
- Wainwright M. Nanobacteria and associated 'elementary bodies' in human disease and cancer. *Microbiology* 1999; 145: 2623-2624
- Hjelle JT, Miller-Hjelle MA, Poxton IR, Kajander EO, Ciftcioglu N, Jones ML, Caughey RC, Brown R, Millikin PD, Darras FS. Endotoxin and nanobacteria in polycystic kidney disease. *Kidney Int* 2000; 57: 2360-2374
- Jelic TM, Malas AM, Groves SS, Jin B, Mellen PF, Osborne G, Roque R, Rosencrance JG, Chang HH. Nanobacteria-caused mitral valve calciphylaxis in a man with diabetic renal failure. *South Med J* 2004; 97: 194-198
- Miller VM, Rodgers G, Charlesworth JA, Kirkland B, Severson SR, Rasmussen TE, Yagubyan M, Rodgers JC, Cockerill FR 3rd, Folk RL, Rzewuska-Lech E, Kumar V, Farell-Baril G, Lieske JC. Evidence of nanobacterial-like structures in calcified human arteries and cardiac valves. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: H1115-H1124
- Hudelist G, Singer CF, Kubista E, Manavi M, Mueller R, Pischinger K, Czerwenka K. Presence of nanobacteria in psammoma bodies of ovarian cancer: evidence for pathogenetic role in intratumoral biomineralization. *Histopathology* 2004; 45: 633-637
- Wen Y, Li YG, Yang ZL, Wang XJ, Wei H, Liu W, Miao XY, Wang QW, Huang SF, Yang J, Kajander EO, Ciftcioglu N. Detection of nanobacteria in serum, bile and gallbladder mucosa of patients with cholecystolithiasis. *Chin Med J* 2005; 118: 421-424
- Puskas LG, Tiszlavicz L, Razga Z, Torday LL, Krenacs T, Papp JG. Detection of nanobacteria-like particles in human atherosclerotic plaques. *Acta Biol Hung* 2005; 56: 233-245
- Sommer AP. Primordial proteins and HIV-Part II. *J Proteome Res* 2005; 4: 1022-1024
- Silay YS, Altundag K, Altundag O, Atik MA, Ozen M. Bisphosphonates may inhibit development of atherosclerosis formation through its bactericidal effect on nanobacteria. *Med Hypotheses* 2005; 64: 1239-1240
- Sommer AP, Pavlath AE. Primordial proteins and HIV. *J Proteome Res* 2005; 4: 633-636
- Sommer AP, Wickramasinghe NC. Functions and possible provenance of primordial proteins-Part II: microorganism aggregation in clouds triggered by climate change. *J Proteome Res* 2005; 4: 180-184
- Ciftcioglu N, Haddad RS, Golden DC, Morrison DR, McKay DS. A potential cause for kidney stone formation during space flights: enhanced growth of nanobacteria in microgravity. *Kidney Int* 2005; 67: 483-491
- Ciftcioglu N, McKay DS, Kajander EO. Association between nanobacteria and periodontal disease. *Circulation* 2003; 108: e58-e59
- Sommer AP, McKay DS, Ciftcioglu N, Oron U, Mester AR, Kajander EO. Living nanovesicles-chemical and physical survival strategies of primordial biosystems. *J Proteome Res* 2003; 2: 441-443
- Drancourt M, Jacomo V, Lepidi H, Lechevallier E, Grisoni V, Coulange C, Ragni E, Alasia C, Dussol B, Berland Y, Raoult D. Attempted isolation of Nanobacterium sp. microorganisms from upper urinary tract stones. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 368-372
- Sommer AP, Hassinen HI, Kajander EO. Light-induced replication of nanobacteria: a preliminary report. *J Clin Laser Med Surg* 2002; 20: 241-244
- Morgan MB. Nanobacteria and calcinosis cutis. *J Cutan Pathol* 2002; 29: 173-175
- Conte Visus A, Grases Freixedas F, Costa-Bauza A, Piza Reus P. Microinfections and kidney lithiasis. *Arch Esp Urol* 2001; 54: 855-860
- Schulz HN, Jorgensen BB. Big bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2001; 55: 105-137
- Sears DW, Kral TA. Martian "microfossils" in lunar meteorites? *Meteorit Planet Sci* 1998; 33: 791-794
- Tsuchiyama A. Meteoritics and mineralogy on possible ancient Martian life. *Biol Sci Space* 1996; 10: 262-270
- Dasch P, Kross J. My favorite Martians: NASA uncovers evidence of ancient life on Mars. *Ad Astra* 1996; 8: 27-29
- Olson WP. Dealing with the nanobacteria. *PDA J Pharm Sci Technol* 2000; 54: 364
- Olson WP. Dealing with the nanobacteria, if we must. *PDA J Pharm Sci Technol* 2000; 54: 359-360
- Olson WP. Opinion: Kajander's nanobacteria. *PDA J Pharm Sci Technol* 2000; 54: 150-151
- Vainshtein MB, Kudriashova EB. About nannobacteria. *Mikrobiologiya* 2000; 69: 163-174
- Kramer G, Klingler HC, Steiner GE. Role of bacteria in the development of kidney stones. *Curr Opin Urol* 2000; 10: 35-38
- Hughes-Stamm SR, Cribb TH, Jones MK. Structure of the tegument and ectocommensal microorganisms of *Gyaliuchen nahaensis* (Digenea: Gyaliuchenidae), an inhabitant of herbivorous fish of the Great Barrier Reef, Australia. *J Parasitol* 1999; 85: 1047-1052
- Abbott A. Battle lines drawn between 'nanobacteria' researchers. *Nature* 1999; 401: 105
- Dorrell S. Nanobacteria linked to kidney disease. *Mol Med Today* 1999; 5: 373
- Psenner R, Loferer M. Nannobacteria: size limits and evidence.

- Science* 1997; 276: 1776-1777
- 34 Neelson KH. Nannobacteria: size limits and evidence. *Science* 1999; 276: 1776
 - 35 Maniloff J. Nannobacteria: size limits and evidence. *Science* 1997; 276: 1776
 - 36 Folk RL. In defense of nannobacteria. *Science* 1996; 274: 1288
 - 37 Sillitoe RH, Folk RL, Saric N. Bacteria as mediators of copper sulfide enrichment during weathering. *Science* 1996; 272: 1153-1155
 - 38 Barr SC, Linke RA, Janssen D, Guard CL, Smith MC, Daugherty CS, Scarlett JM. Detection of biofilm formation and nanobacteria under long-term cell culture conditions in serum samples of cattle, goats, cats, and dogs. *Am J Vet Res* 2003; 64: 176-182
 - 39 Kajander EO. Culture and detection method for sterile-filterable autonomously replicating biological particles. *US patent No:5* 1992; 135, 851
 - 40 Himmelreich R, Hilbert H, Plagens H, Pirkel E, Li BC, Herrmann R. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 4420-4449
 - 41 Mushegian AR, Koonin EV. A minimal gene set for cellular life derived by comparison of complete bacterial genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 10268-10273
 - 42 Kajander EO, Bjorklund M, Ciftcioglu N. Mineralization by nanobacteria. *Proc SPIE Int* 1998; 3441: 86-94
 - 43 Kajander EO, Kuronen I, Kari KA, Pelttari A, Ciftcioglu N. Nanobacteria from blood: the smallest culturable autonomously replicating agent on Earth. *Proc SPIE Int* 1997; 3111: 420-428
 - 44 Kajander EO, Ciftcioglu N. Nanobacteria as extremophiles. *Proc SPIE Int* 1999; 3755: 106-112
 - 45 Robey PG, Boskey AI. The biochemistry of bone. *San Diego: Academic press* 1996: 95-183
 - 46 Schinke T, Amendt C, Trindl A, Poschke O, Muller-Esterl W, Jahnke-Dechent W. The serum protein alpha2-HS glycoprotein/fetuin inhibits apatite formation *in vitro* and in mineralizing calvaria cells. A possible role in mineralization and calcium homeostasis. *J Biol Chem* 1996; 271: 20789-20796
 - 47 Bjorklund M, Ciftcioglu N, Kajander EO. Extraordinary survival of nanobacteria under extreme conditions. *Proc SPIE Int* 1998; 3441: 123-129
 - 48 Ciftcioglu N, Miller-Hjelle MA, Hjelle JT, Kajander EO. Inhibition of nanobacteria by antimicrobial drugs as measured by a modified microdilution method. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2077-2086
 - 49 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory manual. 2nd ed. *Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press* 1989
 - 50 Angert ER, Clements KD, Pace NR. The largest bacterium. *Nature* 1993; 362: 239-241
 - 51 Folk RL. SEM imaging of bacteria and nannobacteria in carbonate sediments and rocks. *J Sedim Petrol* 1993; 63: 990-999
 - 52 Folk RL. Interaction between bacteria, nannobacteria, and mineral precipitation in hot springs of central Italy. *Geo Phys Quarter* 1994; 48: 233-246
 - 53 Ciftcioglu N, Kajander EO. Interaction of nanobacteria with cultured mammalian cells. *Pathophysiology* 1998; 4: 259-270
 - 54 Kari K, Akerman, Jyrki T, Kuikka, Ciftcioglu N, Jyrki P, Kim A, Bergstroem IK, Kajander EO. Radiolabeling and *in vivo* distribution of nanobacteria in rabbit. *Proc. SPIE Int* 1997; 3111: 436-442
 - 55 Wang XJ, Liu W, Yang ZL, Wei H, Wen Y, Li YG. The detection of nanobacteria infection in serum of healthy Chinese people. *Zhonghua Liuxingbingxue Zazhi* 2004; 25: 492-494
 - 56 Shoskes DA, Thomas KD, Gomez E. Anti-nanobacterial therapy for men with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and prostatic stones: preliminary experience. *J Urol* 2005; 173: 474-477
 - 57 Friedlander G. Phosphate transport and kidney stones. *Bull Acad Natl Med* 2005; 189: 309-316
 - 58 Santa Cruz F, Cabrera W, Barreto S, Mayor MM, Baez D. Kidney disease in Paraguay. *Kidney Int Suppl* 2005; 97: S120-S125
 - 59 Traba Villameytide ML. Porphyrins in renal calculi. *Actas Urol Esp* 2005; 29: 163-169
 - 60 Maloney ME, Springhart WP, Ekeruo WO, Young MD, Enemchukwu CU, Preminger GM. Ethnic background has minimal impact on the etiology of nephrolithiasis. *J Urol* 2005; 173: 2001-2004
 - 61 Dall'era JE, Kim F, Chandhoke PS. Gender Differences among Hispanics and Caucasians in symptomatic presentation of kidney and ureteral stones. *J Endourol* 2005; 19: 283-286
 - 62 Perez-Brayfield MR, Baseman A, Kirsch AJ. Adolescent urology. *Adolesc Med Clin* 2005; 16: 215-227
 - 63 Rieu P. Infective lithiasis. *Ann Urol* 2005; 39: 16-29
 - 64 Conort P, Dore B, Saussine C. Guidelines for the urological management of renal and ureteric stones in adults. *Prog Urol* 2004; 14: 1095-1102
 - 65 Knoll T, Wendt-Nordahl G, Trojan L, Wenke A, Roeder N, Alken P. Current aspects of stone therapy. *Aktuelle Urol* 2005; 36: 47-54
 - 66 Grases F, March JG, Conte A, Costa-Bauza A. New aspects on the composition, structure and origin of calcium oxalate monohydrate calculi. *Eur Urol* 1993; 24: 381-386
 - 67 Ciftcioglu N, Bjorklund M, Kuorikoski K, Bergstrom K, Kajander EO. Nanobacteria: an infectious cause for kidney stone formation. *Kidney Int* 1999; 56: 1893-1898
 - 68 Garcia Cuerpo E, Olavi Kajander E, Ciftcioglu N, Lovaco Castellano F, Correa C, Gonzalez J, Mampaso F, Liano F, Garcia de Gabiola E, Escudero Barrilero A. Nanobacteria. An experimental neo-lithogenesis model. *Arch Esp Urol* 2000; 53: 291-303
 - 69 Maniscalco BS, Taylor KA. Calcification in coronary artery disease can be reversed by EDTA-tetracycline long-term chemotherapy. *Pathophysiology* 2004; 11: 95-101
 - 70 Venneman NG, Buskens E, Besselink MG, Stads S, Go PM, Bosscha K, van Berge-Henegouwen GP, van Erpecum KJ. Small gallstones are associated with increased risk of acute pancreatitis: potential benefits of prophylactic cholecystectomy? *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2540-50
 - 71 Kratzer W, Haenle MM, Mason RA, von Tirpitz C, Kaechele V. Prevalence of cholelithiasis in patients with chronic inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6170-6175
 - 72 Lammert F, Sauerbruch T. Mechanisms of disease: the genetic epidemiology of gallbladder stones. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005; 2: 423-433
 - 73 Zuber-Jerger I, Kullmann F, Schneidewind A, Scholmerich J. Diagnosis and treatment of a patient with gallstone ileus. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005; 2: 331-335
 - 74 Wen Y, Li YG, Yang ZL, Wang XJ, Wei H, Liu W, Tan AL, Miao XY, Wang QW, Huang SF, Kajander EO, Ciftcioglu N. Nanobacteria in serum, bile and gallbladder mucosa of cholecystolithiasis patients. *Zhonghua Waike Zazhi* 2003; 41: 267-270