

INHIBICIÓN SEROLÓGICA DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE *Helicobacter Pylori*

Dr. Rodolfo González Segovia ¹
Dra. Ma. Elena Montañez Díaz ²
Dr. Jesús Enrique Armenta Yaumer ³
Dr. Juan González Macías ⁴
Montserrat Arana Lira ⁵

INTRODUCCIÓN

Desde su descubrimiento en 1982 por Marshall y Warren, el estudio de la bacteria gástrica *Helicobacter pylori* ha tenido una gran importancia médica, ya que su infección está altamente asociada con problemas gastroduodenales tales como úlcera gástrica (UG), úlcera duodenal (UD), gastritis atrófica crónica (GAC) y cáncer gástrico. Algunas de estas enfermedades representan un problema de salud muy importante a nivel mundial. En México, la UG así como la UD presentan índices de prevalencia de un 4.6% en admisiones médicas en Hospitales de descarga (14). Mientras que en Hospitales de países asiáticos como la India la cifra es mayor pues el 6.2% de los ingresos médicos pueden estar relacionados con estas enfermedades (7).

Los mecanismos mediante los cuales ocurre la instalación y propagación de agentes patógenos en los tejidos, son pasos muy importantes para que el patógeno

pueda llegar a ocasionar daño en el organismo hospedero. Muchos microorganismos se valen de la producción de enzimas proteolíticas para poder colonizar un tejido. Dichas enzimas les permiten degradar la matriz extracelular y así facilitar su ingreso y colonización al tejido. Como en el caso de *Trichomonas vaginalis* que para su invasión se une primero a la mucina de la mucosa vaginal y luego mediante la acción de enzimas realiza la degradación proteolítica de sus componentes para poder penetrar a través de esta barrera mucosa (11).

Así mismo se ha observado que las enzimas proteolíticas en *Porphyromonas gingivalis* tienen una gran importancia en procesos de invasión, pues mutantes que no expresan la enzima cistein proteasa producto del gen *rgp-1*, muestran una marcada disminución en el proceso de colonización (10).

Se ha detectado que *H. pylori* tiene la capacidad de degradación de proteínas (12). Esta actividad proteolítica reside principalmente en una metaloproteasa dependiente de zinc con un peso molecular de aproximadamente 200 kDa, la cual puede ser liberada al medio o encontrarse ligada a la membrana externa de la bacteria (17). La capacidad de hidrólisis proteica que tiene *H. pylori* podría contribuir al proceso de colonización, así como participar coordinadamente con otros mecanismos de patogenicidad bacterianos para desarrollar lesiones en el epitelio gástrico. Se ha demostrado que drogas utilizadas en el tratamiento de úlceras gástricas como el sucralfato, inhiben la actividad proteolítica de la bacteria y bloquean su capacidad invasora. A pesar de la importancia que pudiera tener la actividad proteolítica como un mecanismo de patogenicidad en *H. pylori*, su estudio ha sido escaso y no se han realizado suficientes trabajos para conocer la posible participación de la actividad proteolítica de *H. pylori* en el desarrollo de las al-

- 1 Profesor –Investigador, Departamento de Microbiología, Centro de Ciencias Básicas.
Teléfono 910-84-24; correo electrónico: rgonzals@correo.uaa.mx
- 2 Profesor –Investigador, Departamento de Microbiología, Centro de Ciencias Básicas.
Correo electrónico: mmonta@correo.uaa.mx
- 3 Médico Gastroenterólogo, Hospital de Especialidades "Miguel Hidalgo", Aguascalientes, Ags.
- 4 Médico Gastroenterólogo, Hospital de Especialidades "Miguel Hidalgo", Aguascalientes, Ags.
- 5 Asistente de investigación, laboratorio de Inmunología, Centro de Ciencias Básicas.

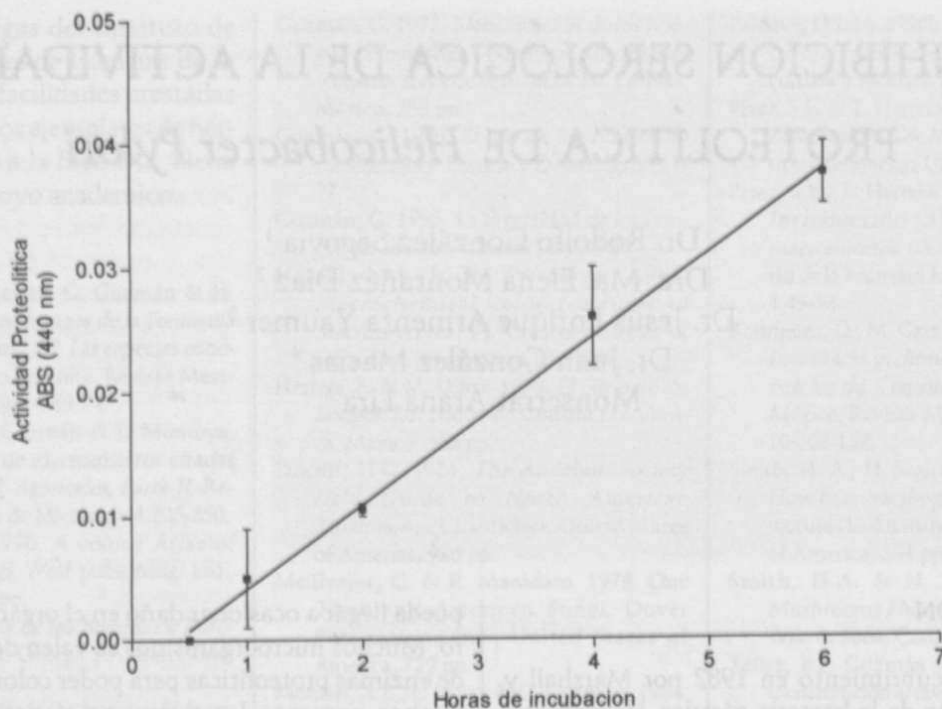


Figura 1. Efecto del tiempo de incubación sobre la degradación de azocaseína utilizando una concentración constante de proteínas del EB (150 µg/mL). Cada punto representa la media (+/- el error estándar) de un ensayo por triplicado.

teraciones patológicas y las manifestaciones clínicas relacionadas con la infección de la bacteria.

La respuesta inmunológica humoral es un mecanismo de defensa muy importante en la neutralización de algunos factores de virulencia microbianos. Por ejemplo, la producción de anticuerpos específicos contra la adhesina FimH de *E. coli* reduce considerablemente la infección en el tracto genitourinario en un modelo en ratón (15). Se sabe también que la producción de anticuerpos hacia proteasas puede ser un sistema de defensa efectivo en contra de los microorganismos, pues se ha observado que la inmunización de ratones con el péptido que representa el sitio catalítico de la proteasa gingipain R de *Porphyromonas gingivalis* induce una protección inmunológica contra la infección por este microorganismo (6). Por tal razón la detección de anticuerpos específicos para las proteasas de *H. pylori* puede ser un buen indicador para conocer la relevancia de su actividad proteolítica en el desarrollo de las manifestaciones clínicas relacionadas con la infección. La finalidad de este trabajo fue inducir la producción de anticuerpos en contra de *H. pylori* y detectar su probable función neutralizante de la actividad proteolítica de la bacteria, en suero de ratones inmunizados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales. Se utilizaron ratones adultos Balb/c (hembras) de 6 a 8 semanas de vida obtenidos del Bioterio de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Aislamiento de las cepas bacterianas. Se realizó a partir de biopsias de tejido gástrico (antro-pilórico y cuerpo gástrico), obtenidas de pacientes con diagnóstico probable de UG, UD o GAC. El tejido homogenizado se inculó en cajas de petri con agar base sangre complementado con 5% de sangre desfibrinada de carnero. Las cajas fueron incubadas a 37°C en una atmósfera microaerofílica durante 3 a 5 días.

Obtención del extracto bacteriano (EB). Las distintas cepas obtenidas (n=6) fueron propagadas utilizando las condiciones de cultivo antes mencionadas. Las muestras fueron cosechadas al tercer día de cultivo en amortiguador salino de fosfatos (PBS; pH 7.2). Para realizar la lisis bacteriana, la muestra se sometió a sonicación mediante 6 ciclos de 30 segundos a una potencia 100 V. El lisado bacteriano se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos; el sobrenadante fue colectado y filtrado mediante membrana de 0.22 µm. El filtrado resultante fue liofilizado y resuspendido en aproximadamente una

cuarta parte del volumen original con agua destilada estéril.

Cuantificación de proteínas. La concentración de proteínas totales en el EB, así como la cantidad de proteínas séricas en las muestras de sueros se determinó mediante la técnica de Bradford. Fue utilizado como patrón de referencia una solución de albúmina (1 mg/mL) en PBS. Las lecturas se realizaron a 595 nm.

Inmunización. La inmunización oral se realizó según protocolo descrito por Czinn et al (4). Se aplicaron 4 dosis, consistiendo cada una de ellas en 10 µg de toxina del cólera como adyuvante y 1 mg/ml de proteínas del EB como antígeno. Para la inmunización intraperitoneal, el antígeno (EB) se aplicó en 4 inmunizaciones semanales donde cada dosis consistió de 0.25 mg de proteínas de EB emulsificadas con aceite mineral.

Obtención de sueros: Las muestras de sangre de cada ratón fueron obtenidas por punción intraocular (previa anestesia con éter etílico) a la semana siguiente de la última aplicación del antígeno. La sangre se dejó en reposo durante 24 horas a 4 °C para favorecer la coagulación. Se separó el suero mediante una centrifugación a 10,000 r.p.m. durante 1 minuto.

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la titulación de anticuerpos anti-*H. pylori* en suero. El ensayo se realizó mediante variación al método reportado por

Quintanar et al (13). Se utilizaron 200 ng por pozo de proteínas del EB como antígeno, en buffer de carbonatos pH=9.6, para sensibilizar las placas. Los sueros provenientes de los ratones pertenecientes a los distintos grupos de trabajo, se aplicaron en volúmenes de 50 µL en dilución de 1:50. El segundo anticuerpo (anti-IgG de ratón unida a peroxidasa de rábano) se utilizó a una dilución de 1:2000.

Ensayo de actividad proteolítica. Para la detección de proteólisis se utilizó un ensayo espectrofotométrico utilizando azocaseína como sustrato cromogénico según método descrito por Beynon et al (1). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente en períodos de incubación variable (ver resultado). Para cuantificar los índices de actividad proteolítica se realizaron lecturas a 440 nm.

Ensayos de inhibición de Actividad Proteolítica del extracto bacteriano. Los inhibidores de proteasas TLCK (1-Cloro-3-Tosylamido-7-amino-2-heptano), TPCK (1-Cloro-3 Tosylamido-4-fenil-2-butano), PMSF ((Fenilmetil sulfonil-Fluoruro) o EDTA (Acido dietilanamino Tetra-acético) se agregaron al momento de preparar la mezcla de reacción a las concentraciones siguientes TLCK 1mM, TPCK 1mM, PMSF 2 mM y EDTA 10 mM. La inhibición serológica se llevó a cabo adicionando concentraciones de proteínas séricas variables (especificadas en cada experimento) también al momento de preparar la mezcla de reacción.

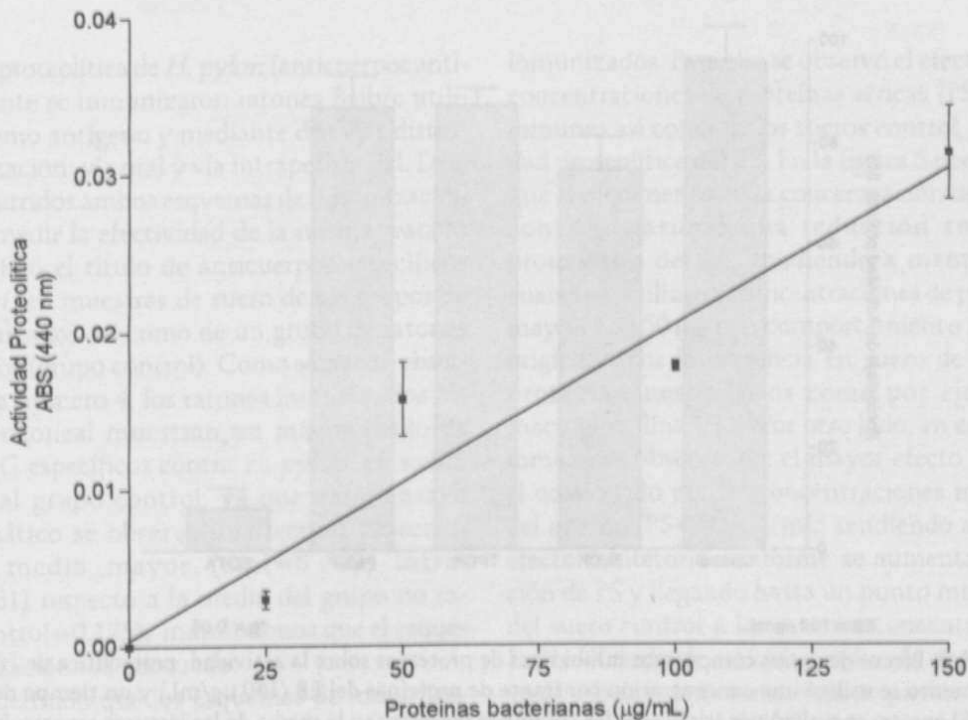


Figura 2. Degradación de azocaseína utilizando distintas concentraciones de proteínas del EB. Las muestras se incubaron 5 horas a temperatura ambiente. Cada punto representa la media (+/- el error estándar) de un ensayo por triplicado.

Análisis estadístico. Las diferencias entre las medias se compararon mediante el análisis de t student's utilizando el programa *GRAPHPAD INSTAT (1993)*. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Para conocer los índices de hidrólisis proteica de *H. pylori*, se preparó un extracto bacteriano (EB) proveniente de una mezcla de distintos aislados clínicos. En un primer experimento en el que se variaron los tiempos de incubación del EB con el sustrato azocaseína (Figura 1), se observó una relación directamente proporcional entre el incremento en el índice de proteólisis (indicado por el aumento de la densidad óptica) y el tiempo de incubación de la muestra, dato que nos indica que el EB induce la degradación del sustrato proteico.

Posteriormente, para confirmar que el EB realmente presentaba esta actividad de proteólisis se realizó un segundo experimento en el que se observó el efecto de diferentes concentraciones de proteínas del EB sobre la degradación de azocaseína. Para este experimento se mantuvo constante el tiempo de incubación y la concentra-

ción de sustrato, variando únicamente la cantidad de proteínas presentes en el EB (Gráfica 2). De igual forma se observó un aumento directamente proporcional entre la actividad proteolítica, pero ahora con respecto a la concentración de proteínas del extracto. Este resultado nos confirma la existencia de actividad proteolítica en el extracto de *H. pylori*.

La naturaleza de esta actividad proteolítica se caracterizó, estudiando el efecto de los siguientes inhibidores de proteasas: PMSF, TLCK, TPCK y EDTA sobre la capacidad de hidrólisis proteica de *H. pylori*. En la figura número 3 se puede observar que el único compuesto que mostró una inhibición estadísticamente significativa con respecto a las lecturas del control fue la inducida por el EDTA, indicándonos que existe una inhibición específica de la actividad proteolítica por este compuesto. Debido a la propiedad quelante de metales que tiene el EDTA, este dato nos indica que la acción proteolítica en el extracto bacteriano es provocada principalmente por metaloproteasas. Este resultado es consistente con lo reportado por Windle et al (17).

Una vez realizada la identificación y caracterización plena de la actividad proteolítica presente en el EB, se llevó a cabo la detección de anticuerpos neutralizantes

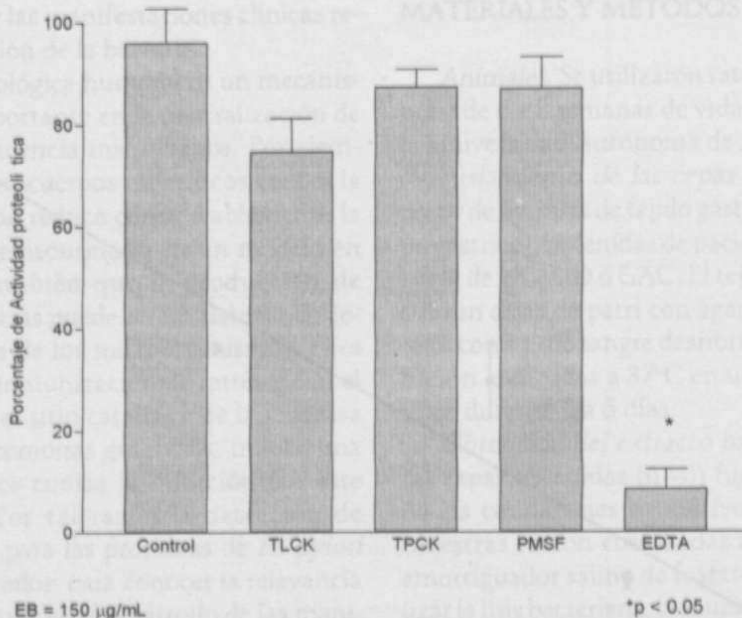


FIGURA 3. Efecto de varios compuestos inhibidores de proteasas sobre la actividad proteolítica de *H. pylori*. En el experimento se utilizó una concentración constante de proteínas del EB (150 µg/mL) y un tiempo de incubación de 5 horas. El ensayo se realizó por triplicado, las columnas representan la media de las lecturas espectrofotométricas (+/- el error estándar) expresadas en por ciento, considerando como 100% el promedio de las lecturas control (reacción sin inhibidores). La comparación estadística se realizó mediante la prueba de t student's. * $p < 0.05$ en comparación con el control.

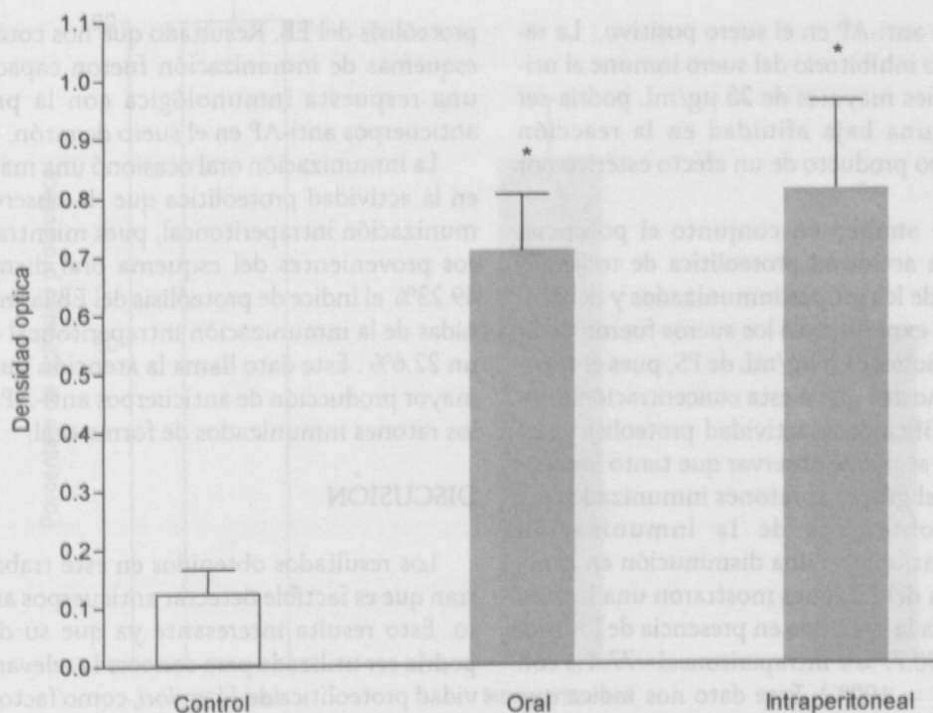


Figura 4. Determinación por ELISA del título de anticuerpos contra *H. pylori* en muestras de suero de ratón.

Control = no inmunizados; Oral = inmunizados vía oral con EB; Intraperitoneal = inmunizados vía intraperitoneal con el EB. Cada columna representa la media (+/- el error estándar) del total de muestras analizadas por cada grupo de experimentación; Control (n=15), Oral (n=14) e Intraperitoneal (n=15). La comparación estadística se realizó mediante la prueba de t student's. *p<0.0001 en comparación con el control.

de la actividad proteolítica de *H. pylori* (anticuerpos anti-AP). Inicialmente se inmunizaron ratones Balb/c utilizando el EB como antígeno y mediante dos vías distintas de inmunización: vía oral y vía intraperitoneal. Después de transcurridos ambos esquemas de inmunización se procedió a medir la efectividad de la misma, para lo cual se cuantificó el título de anticuerpos específicos hacia *H. pylori* en muestras de suero de los grupos de ratones inmunizados así como de un grupo de ratones no inmunizados (grupo control). Como se puede observar en la figura número 4, los ratones inmunizados vía oral e intraperitoneal muestran un mayor título de anticuerpos IgG específicos contra *H. pylori* en suero, con respecto al grupo control, ya que en el ensayo inmunoenzimático se observa una lectura espectrofotométrica media mayor (oral=0.708; intraperitoneal=0.81) respecto a la media del grupo no inmunizado (control=0.125), indicándonos que el esquema de inmunización fue adecuado.

Habiendo definido que los esquemas de inmunización utilizados indujeron una respuesta humoral específica, se procedió a continuación a la determinación de anticuerpos anti-AP en el suero de los ratones

inmunizados. Para ello se observó el efecto de diferentes concentraciones de proteínas séricas (PS) de los sueros inmunes así como de los sueros control, sobre la actividad proteolítica del EB. En la figura 5 podemos observar que el incremento en la concentración de PS en el suero control ocasionó una reducción en la actividad proteolítica del EB, tendiendo a mantenerse estable cuando se utilizaron concentraciones de proteínas séricas mayores de 50 µg/mL, comportamiento probablemente originado por la presencia en suero de inhibidores de proteasas inespecíficos como por ejemplo la alfa-macroglobulina (3). Por otro lado, en el caso del suero inmune se observa que el mayor efecto inhibitorio fue el ocasionado por las concentraciones más bajas de PS del mismo (PS < 25 µg/mL) tendiendo a reducirse este efecto inhibitorio conforme se aumenta la concentración de PS y llegando hasta un punto muy semejante al del suero control a las mismas concentraciones de PS. Esta reducción de actividad inducida por el suero positivo al utilizar concentraciones pequeñas de PS tuvo una alta significancia estadística si se compara con el suero control, poniendo en evidencia una inhibición específica de la actividad proteolítica ocasionada por la presen-

cia de anticuerpos anti-AP en el suero positivo. La reducción en el efecto inhibitorio del suero inmune al utilizar concentraciones mayores de 25 µg/mL podría ser consecuencia de una baja afinidad en la reacción antígeno-anticuerpo producto de un efecto estérico por exceso de PS.

Finalmente, se analizó en conjunto el potencial neutralizante de la actividad proteolítica de todas las muestras de suero de los grupos inmunizados y del grupo control. En este experimento los sueros fueron utilizados a concentraciones de 5 µg/mL de PS, pues el experimento anterior mostró que a esta concentración existe inhibición específica de la actividad proteolítica. En la figura número 6 se puede observar que tanto los sueros provenientes del grupo de ratones inmunizados vía oral como los obtenidos de la inmunización intraperitoneal ocasionaron una disminución en la actividad proteolítica del EB, pues mostraron una lectura promedio, inferior a la obtenida en presencia de los sueros control (oral=50.77% e intraperitoneal=77.4% con respecto al control = 100%). Este dato nos indica que los sueros provenientes de los grupos de inmunización tuvieron un considerable efecto inhibitorio sobre la

proteólisis del EB. Resultado que nos confirma que los esquemas de inmunización fueron capaces de inducir una respuesta inmunológica con la producción de anticuerpos anti-AP en el suero de ratón.

La inmunización oral ocasionó una mayor reducción en la actividad proteolítica que la observada en la inmunización intraperitoneal, pues mientras que los sueros provenientes del esquema oral disminuyeron en 49.23% el índice de proteólisis del EB las muestras obtenidas de la inmunización intraperitoneal lo hicieron en un 22.6%. Este dato llama la atención pues indica una mayor producción de anticuerpos anti-AP en el suero de los ratones inmunizados de forma oral.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo nos muestran que es factible detectar anticuerpos anti-AP en suero. Esto resulta interesante ya que su determinación podría ser utilizada para conocer la relevancia de la actividad proteolítica de *H. pylori*, como factor de patogenicidad, pues la presencia o ausencia de anticuerpos que específicamente inhiban la actividad de enzimas

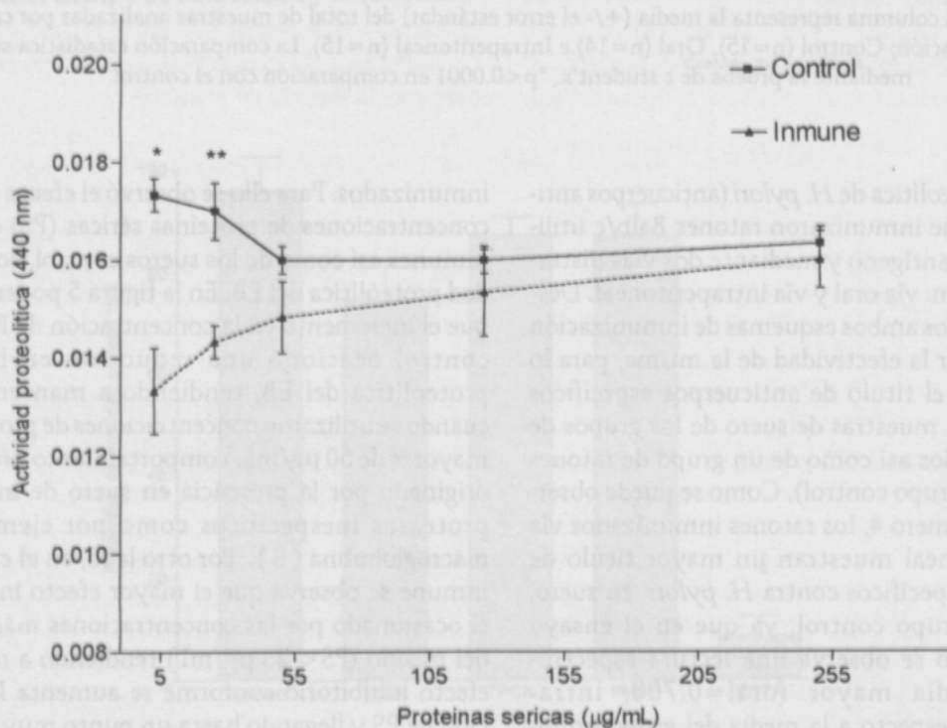


Figura 5. Efecto del suero de ratón sobre la actividad proteolítica de *H. pylori*. Inmune = mezcla del suero de 4 ratones inmunizados con EB (vía oral e intraperitoneal); Control = mezcla de suero de 4 ratones no inmunizados.

La concentración de proteínas séricas utilizadas de cada suero fue de 5, 25, 50, 125 y 250 µg/mL.

Se utilizó una concentración de proteínas EB de 75 µg/mL en un período de incubación de 5 horas. Cada punto representa la media (+/- el error estándar) de un ensayo realizado por triplicado. La comparación estadística se realizó mediante la prueba de t student's y se confrontan las lecturas contra el valor obtenido en el control a la concentración respectiva (*p=0.0006 y **p=0.05).

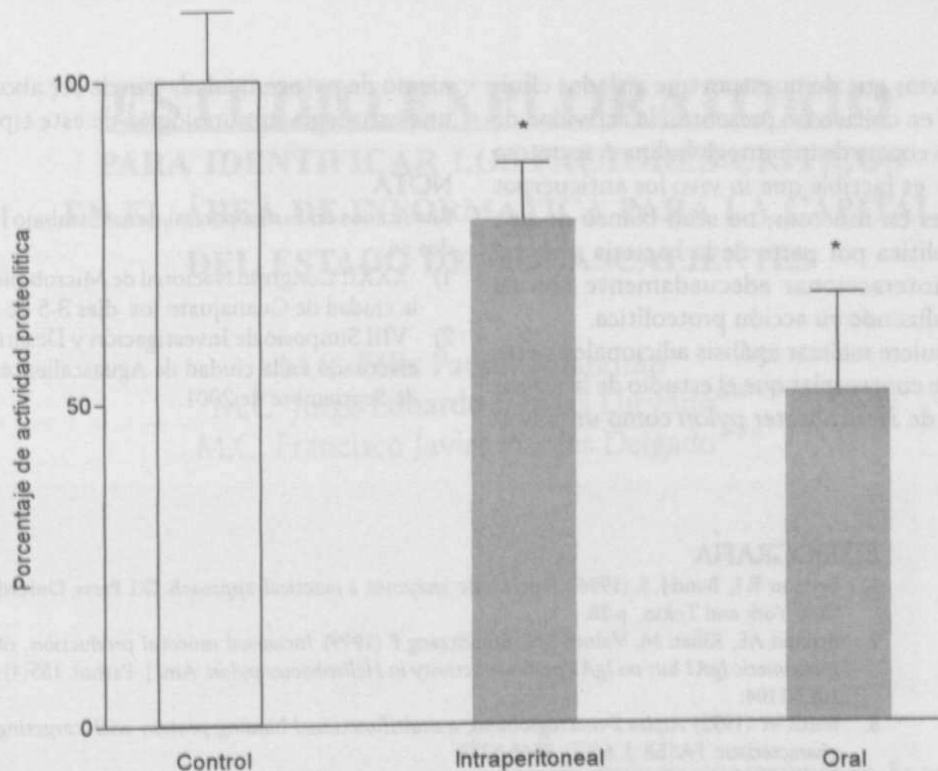


Figura 6. Bloqueo de la actividad proteolítica de *H. pylori* con suero de ratón. Control = no inmunizados (n=15); Oral = inmunizados vía oral con EB (n=14); Intraperitoneal = inmunizados vía intraperitoneal con EB (n=15). Todos los sueros se adicionaron a una concentración de proteínas séricas de 5 µg/mL. El EB se manejó a una concentración de proteínas de 75 µg/mL. Las muestras fueron incubadas en un período de incubación de 5 horas. Cada columna representa la media (+/- el error estándar) del total de lecturas expresadas en por ciento, con respecto al control. La comparación estadística se realizó mediante la prueba de t students. *p<0.05

proteolíticas en asociación con niveles de daño gástrico tales como el desarrollo de úlceras o atrofia funcional del epitelio gástrico, son datos que pueden aportar importante información al respecto. La determinación de anticuerpos anti-AP se realizó a partir de suero completo y mediante un ensayo relativamente sencillo, por lo que este método podría ser aplicado en el desarrollo de estudios epidemiológicos en pacientes. El manejo de suero nos permite realizar una colecta accesible a un gran número de muestras, facilitando la realización de un estudio completo.

La producción de una respuesta inmunológica a nivel de mucosas es el mecanismo que está principalmente involucrado con la defensa de microorganismos tales como *Helicobacter pylori*. Por lo tanto aún es necesario conocer en qué forma se relaciona la producción de anticuerpos anti-AP en suero de ratones inmunes con los títulos presentes en mucosa gástrica en este modelo. Al respecto existen estudios previos que muestran que la inmunización vía oral en ratón utilizando como adyuvante la toxina de cólera, despierta una fuerte respuesta de anticuerpos IgA e IgG en contra de *H. pylori* tanto en mucosa gástrica como a nivel sistémico (4), in-

dicándonos que es muy posible encontrar una actividad neutralizante en mucosas muy semejante a la encontrada en suero. Además esta respuesta de anticuerpos IgA e IgG de forma local y sistemática es un fenómeno que se sucede en infecciones *in vivo* en seres humanos (16), por lo que podemos considerar una correlación inmunológica entre este modelo y la infección *in vivo* en seres humanos.

La degradación de inmunoglobulinas mediante la acción de enzimas proteolíticas es un mecanismo de evasión de la respuesta inmune del hospedero muy importante en algunos microorganismos (8). La actividad proteasa IgA1 es uno de los sistemas de este tipo más difundidos en microorganismos que interactúan en mucosas. Dicho sistema se encuentra presente en bacterias tales como *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* y *Streptococcus pneumoniae* (9). En nuestros experimentos mostramos que los sueros inmunes tienen la capacidad de neutralizar la actividad proteolítica de la bacteria, dato que nos sugiere de una forma indirecta que las proteasas producidas por *H. pylori* no presentan un efecto digestivo de consideración en contra de los anticuerpos anti-AP. Además exis-

ten estudios previos que demuestran que aislados clínicos de *H. pylori* en cultivo no presentan la actividad de proteasa IgA1 en contra de inmunoglobulina A secretora (2). Por lo tanto es factible que *in vivo* los anticuerpos anti-AP presentes en mucosas, no sean blanco de una digestión proteolítica por parte de la bacteria y de tal forma puedan interaccionar adecuadamente con su antígeno, neutralizando su acción proteolítica.

Si bien se requiere realizar análisis adicionales a este modelo, se puede contemplar que el estudio de la actividad proteolítica de *Helicobacter pylori* como un meca-

nismo de patogenicidad, puede ser abordado mediante una estrategia inmunológica de este tipo.

NOTA

Resultados en forma parcial de este trabajo han sido presentados en:

- 1) XXXII Congreso Nacional de Microbiología, efectuado en la ciudad de Guanajuato los días 3-5 de abril de 2001.
- 2) VIII Simposio de Investigación y Desarrollo Tecnológico, efectuado en la ciudad de Aguascalientes los días 10 al 14 de Septiembre de 2001.

BIBLIOGRAFÍA

1. Beynon R J, Bond J. S. (1996), *Proteolytic enzymes, a practical approach*. IRL Press, Oxford New York and Tokio, p 28.
2. Berstad AE, Kilian M, Valnes KN, Brandtzaeg P (1999) *Increased mucosal production of monomeric IgA1 but no IgA1 protease activity in Helicobacter pylori*. Am. J. Pathol. 155(4): 1097-1104.
3. Borth W (1992) *Alpha 2-macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristic*. FASEB J. 6(15): 3345-3353
4. Czinn SJ, Nedrud JG (1991), *Oral immunization against Helicobacter pylori*. Infect. Immun. 59(7): 2359-2363.
5. Ellis, AE. (1987) *Inhibition of the Aeromonas salmonicida extracellular protease by alpha 2-macroglobulin in the serum of rainbow trout*. Microb. Pathog. 3(3) 167-177.
6. Genco CA, Odusanya B M, Potempa J, Mikolajczyk-Pawlinska J, Travis J (1998) *A peptide domain on Gingipain R which confers immunity against Porphyromonas gingivalis infection in mice*. Infect. Immun. 66(9): 4108-4114.
7. Hazra B, Hazra J (1998) *Epidemiology of peptic ulcer in north Bengal, Indian*. Indian J. Public Health. 42(4): 100-102.
8. Kharazmi A (1991) *Mechanisms involved in the evasion of the host defence by Pseudomonas aeruginosa*. Immunol. Lett. 30(2):201-205
9. Kilian M, Reinholdt J, Lomholt H, Poulsen K, Frandsen EV (1996) *Biological significance of IgA1 proteases in bacterial colonization and pathogenesis: critical evaluation of experimental evidence*. APMIS. 104: 321-338.
10. Kuramitsu H, Tokuda M, Yoneda M, Duncan M, Cho MI (1997) *Multiple colonization defects in a cysteine protease mutant of Porphyromonas gingivalis*. J. Periodontal. Res. 32(1 pt 2): 140-142
11. Lehker M W, Sweeney D (1999) *Trichomonad invasion of the mucus layer requires adhesins, mucinases, and motility*. Sex. Transm. Inf. 75: 231-238.
12. Piotrowski J, Slomiany A, Slomiany BL (1997) *Suppression of Helicobacter pylori protease activity towards growth factors by sulglycotide*. J. Physiol. Pharmacol. 48(3):345-351.
13. Quintanar J L, Salinas E (2001) *Neurofilament expression in cultured rat adenohipophysial cells*. Cell Physiol Biochem. 11: 27-32.
14. Rodríguez Hernández H, Loera Ontiveros E, Almaraz Larreta C, Jiménez Ramírez N, Solano Ramírez A, Jacobo Karam JS (1999) *Peptic ulcer with hemorrhage. An analysis of hospital discharges*. Rev. Gastroenterol. Mex. 64(1): 6-11.
15. Thankavel K, Madison B, Ikeda t, Malaviya R, Shah AH, Arumugam PM, Abraham SN (1997) *Localization of a domain in the Fim H adhesin of Escherichia coli type I fimbriae capable of receptor recognition and use of a domain-specific antibody to confer protection against experimental urinary tract infection*. J. Clin. Invest. 100(5): 1123-1136.
16. Veenendaal RA, Schroijen JM, Gotz JM, Peña AS, Roosendaal R, Vaselic M, Lamers CBHW (1994) *Salivary, systemic, gastric juice and gastric mucosal IgA and IgG helicobacter pylori antibodies in patients with active chronic associated antral and pangastritis*. Dissertation. Laiden, University of Leiden, p 61-77.
17. Windle HJ, Kelleher D (1997) *Identification and characterization of a metalloprotease activity from Helicobacter pylori*. Infect. Immun. 65(8): 3132-3137