

Serological markers of *Chlamydia pneumoniae* infection in patients with cardiovascular disease

Serologiczne wskaźniki zakażenia *Chlamydia pneumoniae* w chorobach układu sercowo-naczyniowego

Justyna Niedźwiadek¹, Elżbieta Mazur¹, Andrzej Wolski², Andrzej Witkowski³,
Maria Kozioł-Montewka¹, Jerzy Michalak²

¹Medical Microbiology Department, ²Vascular Surgery Department, University School of Medicine, Lublin, Poland,
³Cardiology Department, Cardinal Wyszyński Hospital, Lublin, Poland (¹Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej,
²Klinika Chirurgii Naczyń, AM w Lublinie, ³Oddział Kardiologii Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego
im. Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Lublinie)

Abstract

Background. Infection with *Chlamydia pneumoniae*, a common human respiratory pathogen, has recently been associated with cardiovascular syndromes, such as AAA, myocardial infarction and stroke. According to the literature data, a significantly high percentage of patients with cardiovascular diseases exhibited serological markers of chronic *C. pneumoniae* infection.

Aim of the study. The aim of our study was to evaluate the frequency of *C. pneumoniae* infection in CHD, CAD and AAA patients by measuring specific serum IgG, IgM and IgA levels.

Material and methods. 47 patients (8 F, 39 M), mean age 64.4 years, with acute myocardial infarction (AMI) or unstable angina (UA); 17 patients (3 F, 14 M), mean age 66.5 years operated for CAD and 28 patients (5 F, 23 M), mean age 68.5 years operated for AAA participated in the research. 20 control subjects matched for age and sex (4 F, 16 M) without clinical signs and symptoms of cardiovascular and pulmonary disease, took part in our study. Microimmunofluorescence method was applied to evaluate the level of anti-*C. pneumoniae* IgG, IgA and IgM. *Chlamydia pneumoniae* micro-IF test (Labsystem) was used. The results were evaluated by means of STATISTICA program and considered statistically significant when $p < 0.05$.

Results. Serological markers of chronic *C. pneumoniae* infection were detected in 37/47 (80.9%) CHD patients, in 12/17 (70.6%) CAD patients, in 25/28 (89.3%) AAA patients and in 6/20 (30%) healthy controls. 21/37 (56.8%) CHD, 5/12 (41.7%) CAD and 10/25 (40.0%) AAA patients with serological signs of chronic infection had high titres of specific IgG and IgA, indicating active infection. All CAD and AAA patients with active infection were symptomatic.

Conclusions. Serological signs of chronic *C. pneumoniae* infection occur statistically more frequently in CHD, CAD and AAA patients in comparison with healthy controls. Active *C. pneumoniae* infection is associated with symptomatic CAD and AAA.

Key words: *Chlamydia pneumoniae*, cardiovascular disease

Streszczenie

Wstęp. Wzrastająca liczba danych seroepidemiologicznych i doświadczalnych wskazuje na możliwy udział *Chlamydia pneumoniae*, niedawno odkrytego ludzkiego patogenu wewnątrzkomórkowego, w patogeniezie chorób układu sercowo-naczyniowego, takich jak tętniak aorty brzusznej (AAA), zawał serca i udar mózgu. Według danych z piśmiennictwa, u znacznej liczby osób ze schorzeniami układu krążenia wykryto serologiczne wskaźniki przewlekłego zakażenia *C. pneumoniae*.

Address for correspondence (Adres do korespondencji):

Dr med. Justyna Niedźwiadek, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej AM, ul. Lubartowska 85, 20–123 Lublin, Poland
tel./faks: +48 (0 81) 740 58 33, e-mail: justynanie@yaho.com

Cel pracy. Celem pracy była ocena częstości występowania zakażenia *Chlamydia pneumoniae* u osób z chorobą wieńcową serca, miażdżycowym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej i AAA, poprzez oznaczenie miana swoistych przeciwciał klasy IgG, IgM i IgA w surowicy.

Materiał i metody. W badaniach uczestniczyło 47 chorych (8 K, 39 M, średni wiek chorych 64,4 r.) z ostrym zawałem serca lub niestabilną chorobą wieńcową, 17 chorych (3 K, 14 M, średni wiek chorych 66,5 r.) operowanych z powodu miażdżycowego zwężenia tętnicy szyjnej wewnętrznej oraz 28 chorych (5 K, 23 M, średni wiek chorych 68,5 r.) operowanych z powodu AAA. Grupa kontrolna składała się z 20 osób, zbliżonych pod względem wieku i płci do osób z grupy badanej, bez objawów chorób układu sercowo-naczyniowego i oddechowego. Ocenę miana swoistych przeciwciał anty-*C. pneumoniae* klasy IgG, IgA i IgM przeprowadzono z zastosowaniem metody mikroimmunofluorescencji za pomocą testu *Chlamydia pneumoniae* Micro-IF firmy Labsystems (Finlandia). Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem programu Statistica. Za istotne statystycznie przyjęto $p < 0,05$.

Wyniki. Serologiczne wskaźniki przewlekłego zakażenia *Chlamydia pneumoniae* stwierdzono u 37/47 (80,9%) osób z chorobą wieńcową, u 12/17 (70,6%) chorych z miażdżycowym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej, u 22/28 (78,6%) chorych z AAA oraz u 6/20 (30,0%) osób z grupy kontrolnej. U 21/37 (56,8%) osób z chorobą wieńcową, u 5/12 (41,7%) chorych z miażdżycowym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej i u 10/25 (40,0%) chorych z AAA z serologicznymi wskaźnikami przewlekłego zakażenia *C. pneumoniae* odnotowano wysokie miana swoistych przeciwciał klasy IgG i IgA, wskazujące na aktywne zakażenie. Wszyscy chorzy z miażdżycowym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej i AAA, u których zaobserwowano serologiczne wskaźniki aktywnego zakażenia, byli chorymi z objawami.

Wnioski. Serologiczne wskaźniki przewlekłego zakażenia *C. pneumoniae* występują statystycznie częściej u osób z chorobą wieńcową, miażdżycowym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej oraz AAA w porównaniu z grupą kontrolną. Aktywne zakażenie *C. pneumoniae* wiąże się z objawami AAA oraz występowaniem objawów przemijającego niedokrwienia mózgu.

Słowa kluczowe: *Chlamydia pneumoniae*, choroby układu krążenia

Introduction

Atherosclerosis is a multifactorial disease with several well-described risk factors, including smoking, hypertension and dyslipidemia. The clinical manifestations of atherosclerosis include coronary artery disease, stroke and abdominal aortic aneurysm. The recognition of atherosclerosis as an inflammatory disease in its genesis, progression and ultimate clinical manifestations has created an interesting area of vascular research [1]. Apart from those well-known traditional risk factors, novel ones such as infections have emerged. Collaborative efforts from many disciplines have resulted in the accumulation of evidence from seroepidemiological, pathological, animal model, immunological and antibiotic intervention studies, linking *Chlamydia pneumoniae* with atherosclerosis [2–6].

Chlamydia pneumoniae is an obligate intracellular bacterial pathogen causing respiratory tract infections, such as pneumonia, bronchitis, sinusitis, and pharyngitis in both adults and children [7]. However, many chlamydial infections are primarily asymptomatic but show a tendency to persist. The duration of immune protection after infection with *C. pneumoniae* is limit-

Wstęp

Miażdżycy jest chorobą o złożonej etiologii, cechującą się wieloma dobrze poznanymi czynnikami ryzyka, do których należą m.in. palenie tytoniu, nadciśnienie i dyslipidemia. Choroba wieńcowa serca, udar mózgu i tętniak aorty brzusznej (AAA, *abdominal aortic aneurysm*) to choroby rozwijające się na podłożu miażdżycy. Przyjęcie hipotezy o zapalnym charakterze wszystkich stadiów rozwoju miażdżycy stworzyło nowe możliwości badań w angiologii [1]. Oprócz tradycyjnych czynników ryzyka miażdżycy pojawiły się nowe — należą do nich również czynniki zakaźne. Badania interdyscyplinarne, w tym seroepidemiologiczne, anatomopatologiczne, immunologiczne, badania na modelach zwierzęcych oraz próby kliniczne polegające na podawaniu antybiotyków potwierdziły związek *Chlamydia pneumoniae* z miażdżycą [2–6].

Chlamydia pneumoniae jest bezwzględny pasożytem wewnątrzkomórkowym, wywołującym zakażenia dróg oddechowych, takie jak zapalenie płuc, oskrzeli, zatok i gardła, zarówno u dorosłych, jak i u dzieci [7]. Wiele zakażeń chlamydowych to zakażenia bezobjawowe lub skąpoobjawowe, z tendencją do przewlekłości. Ochronne działanie przeciwciał po przebyciu zakażenia

ed, and persistent infection may occur since the host may be incapable of eradicating the organism. Both persistent and repeated infections may cause intense inflammatory reactions [4]. Chronic or recurrent *C. pneumoniae* infections have been associated with adult-onset asthma, atherosclerosis, coronary heart disease, AAA and increased risk of stroke and transient ischemic events [8, 9].

A primary *C. pneumoniae* infection induces IgM and IgG production, whereas in secondary infection IgG and IgA titres increase rapidly without an IgM response. The role of antibodies in protection against reinfection is not known. Elevated IgG and IgA levels occasionally persist for a long time after infection and then are considered an indication of chronic infection. Elevated levels of IgG and IgA antibody to *C. pneumoniae* and the presence of circulating chlamydia-specific immune complexes have been associated with several chronic *C. pneumoniae* manifestations such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD), sarcoidosis, adult-onset asthma, and coronary heart disease [10].

The microimmunofluorescence (MIF) test is specific for the species and allows the detection of various immunoglobulin types against *C. pneumoniae*. Microimmunofluorescence test has become the serological “gold standard” for diagnosis of *C. pneumoniae* infections, being highly specific and sensitive when compared with culture. The MIF test is therefore the most widely used technique, although the results are subject to a wide variety of interpretations because different research groups apply different serological criteria for acute and chronic infection [6].

Aim of the study

The aim of our study was to evaluate the frequency of *Chlamydia pneumoniae* infection in patients with coronary heart disease (CHD), carotid artery disease (CAD), and abdominal aortic aneurysm (AAA) by measuring *C. pneumoniae*-specific serum IgG, IgM and IgA levels.

Material

CHD patients

47 patients (8 F, 39 M), mean age 64.4 years, with acute myocardial infarction (AMI) or unstable angina (UA) participated in the research. All of them were hospitalised in the Department of Cardiology, Cardinal Wyszyński Hospital in Lublin. Blood samples were taken from patients on the day of arriving at the hospital and sera were frozen in -20°C before carrying out MIF test.

C. pneumoniae jest ograniczone; przewlekłe zakażenie może wystąpić, gdy chory nie jest w stanie wyeliminować patogenu. Zarówno przewlekłe, jak i nawracające zakażenia wywołują nasiloną reakcję zapalną [4]. Wykazano związek między przewlekłym lub nawracającym zakażeniem *C. pneumoniae* a astmą oskrzelową, miażdżycą, chorobą wieńcową serca, tętniakiem aorty brzusznej i podwyższonym ryzykiem udaru mózgu lub jego przemijającego niedokrwienia [8, 9].

Pierwotne zakażenie *C. pneumoniae* wywołuje produkcję przeciwciał w klasie IgM i IgG, natomiast powtórne zakażenie — szybki wzrost miana przeciwciał klasy IgG i IgA, bez odpowiedzi w klasie IgM. Rola przeciwciał w ochronie przed powtórny zakażeniem jest nieznaną. U niektórych osób podwyższone miana IgG i IgA utrzymują się przez długi czas po zakończeniu ostrego zakażenia — uważa się, że świadczą one o przejściu zakażenia w formę przewlekłą. Wykazano związek między podwyższonymi mianami swoistych przeciwciał w klasie IgG i IgA oraz obecnością krążących kompleksów immunologicznych zawierających antygen *C. pneumoniae* a wieloma przewlekłymi chorobami, takimi jak przewlekła obturacyjna choroba płuc (COPD, *chronic obstructive pulmonary disease*), sarkoidoza, astma oskrzelowa oraz choroba wieńcowa serca [10].

Test mikroimmunofluorescencji (MIF) jest gatunkowo swoisty; pozwala on na ocenę swoistych przeciwciał w poszczególnych klasach. Uważa się go za badanie wzorcowe w diagnostyce zakażeń *C. pneumoniae*, ze względu na jego wysoką czułość i swoistość w porównaniu z metodami hodowlanymi. Test ten stosuje się powszechnie, chociaż jego wyniki są interpretowane w bardzo różny sposób, gdyż zespoły badawcze przyjmują różne kryteria serologiczne dla ostrego i przewlekłego zakażenia [6].

Cel pracy

Celem pracy była ocena częstości zakażeń *Chlamydia pneumoniae* u osób z chorobą wieńcową serca, ze zwiększeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej i z tętniakiem aorty brzusznej (AAA) poprzez oznaczenie miana swoistych przeciwciał w klasie IgG, IgM i IgA w surowicy.

Material

Pacjenci z chorobą wieńcową serca

W badaniach uczestniczyło 47 chorych (8 kobiet, 39 mężczyzn), hospitalizowanych z powodu ostrego zawału serca lub niestabilnej choroby wieńcowej w Oddziale Kardiologii Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego im. Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Lublinie. Krew do badań pobierano w dniu przyjęcia chorych do szpitala. Surowicę przechowywano w temperaturze -20°C do czasu wykonywania odczynu mikroimmunofluorescencji.

CAD patients

17 CAD patients (3 F, 14 M), mean age 66.5 years, participated in the research. All of them underwent carotid endarterectomy. Carotid stenosis over 70% in symptomatic and asymptomatic patients was the indication for surgery. Blood samples were obtained from patients the day before operation.

AAA patients

28 AAA patients (5 F, 23 M), mean age 68.5 years, participated in the research. All patients were operated for AAA. The indications for surgery were: aneurysm size larger than 4.5 cm (4.5–8.0 cm), or the presence of clinical symptoms. All procedures were elective. Blood samples were obtained from patients one day before operation (Tables I–III).

Controls

20 control subjects, matched for age and sex (4 F, 16 M), without clinical signs and symptoms of cardiovascular and pulmonary disease, took part in our study.

Table I. Clinical characteristics of CHD patients

Tabela I. Charakterystyka kliniczna osób z chorobą wieńcową serca

Characteristic Wyszczególnienie	Number of patients (percentage of patients) Liczba chorych (odsetek chorych)
Male Mężczyźni	39 (83%)
Female Kobiety	8 (17%)
Smoking Palenie tytoniu	
Past smoking Osoby palące w przeszłości	11 (23.4%)
Current smoking Osoby obecnie palące	26 (55.3%)
Never smoking Osoby nigdy niepalące	10 (21.3%)
Hypertension Nadciśnienie tętnicze	29 (61.7%)
AMI	29 (61.7%)
Unstable angina Niestabilna choroba wieńcowa	18 (38.3%)
Myocardial infarction in the past Przebyty zawał serca	3 (6.4%)
Total Cholesterol > 200 mg/dl Stężenie cholesterolu całkowitego	35 (74.5%)
Triglycerides > 200 mg/dl Triglicerydy	33 (70.2%)

AMI — acute myocardial infarction/zawał serca

Chorzy ze zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej

W badaniach uczestniczyło 17 chorych ze zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej (3 kobiety, 14 mężczyzn). Średni wiek chorych wynosił 64,5 roku. Wskazaniem do operacji było zwężenie tętnicy szyjnej wewnętrznej > 70%, zarówno u chorych z objawami, jak i osób bez objawów. Krew do badań pobierano w dniu poprzedzającym zabieg operacyjny.

Chorzy z tętniakiem aorty brzusznej

W badaniach uczestniczyło 28 chorych z AAA (5 kobiet, 23 mężczyzn). Średni wiek chorych wynosił 68,5 roku. Wszystkich chorych operowano z powodu AAA. Wskazaniami do operacji były: średnica tętniaka > 4,5 cm (4,5–8 cm) lub objawy kliniczne. Wszystkie zabiegi wykonywano planowo. Krew do badań pobierano w dniu poprzedzającym operację (tab. I–III).

Grupa kontrolna

Grupa kontrolna składała się z 20 osób (4 kobiety, 16 mężczyzn), zbliżonych pod względem wieku i płci

Table II. Clinical characteristics of CAD patients

Tabela II. Charakterystyka kliniczna chorych z miażdżycowym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej

Characteristic Wyszczególnienie	Number of patients (percentage of patients) Liczba chorych (odsetek chorych)
Male Mężczyźni	14 (82.4%)
Female Kobiety	3 (17.6%)
Smoking Palenie tytoniu	
Past smoking Osoby palące w przeszłości	2 (11.8%)
Current smoking Osoby obecnie palące	10 (58.8%)
Never smoking Osoby nigdy niepalące	5 (29.4%)
Hypertension Nadciśnienie tętnicze	13 (76.5%)
CAD	7 (41.2%)
PAOD	7 (41.2%)
TIA	11 (64.7%)
Total Cholesterol > 200 mg/dl Stężenie cholesterolu całkowitego	13 (76.5%)
Triglycerides > 200 mg/dl Triglicerydy	7 (41.2%)
Cholesterol HDL < 35 mg/dl Stężenie cholesterolu frakcji HDL	6 (35.3%)

CAD — coronary artery disease/choroba wieńcowa; PAOD — peripheral arterial occlusive disease/miażdżycy tętnic kończyn dolnych; TIA — transient ischaemic attack/objawy przemijającego niedokrwienia mózgu

Table III. Clinical characteristics of AAA patients**Tabela III.** Charakterystyka kliniczna chorych z tętniakiem aorty brzusznej

Characteristic Wyszczególnienie	Number of patients (percentage of patients) Liczba chorych (odsetek chorych)
Male Mężczyźni	23 (82.2%)
Female Kobiety	5 (17.8%)
Smoking Palenie tytoniu	
Past smoking Osoby palące w przeszłości	11 (39.3%)
Current smoking Osoby obecnie palące	13 (46.4%)
Never smoking Osoby nigdy niepalące	4 (14.3%)
Hypertension Nadciśnienie tętnicze	21 (75%)
CAD and/or PAOD	19 (67.9%)
Symptomatic AAA Objawy tętniaka	16 (57.1%)
Total Cholesterol > 200 mg/dl Stężenie cholesterolu całkowitego	14 (50%)
Triglycerides > 200 mg/dl Triglicerydy	5 (17.9%)

PAOD — peripheral arterial occlusive disease/miażdżycza tętnic kończyn dolnych; CAD — coronary artery disease/choroba wieńcowa; AAA — abdominal aortic aneurysm/tętniak aorty brzusznej

Methods

To evaluate the level of specific IgA, IgM and IgG in patients' sera microimmunofluorescence method was applied. *Chlamydia pneumoniae* Micro-IF test (Labsystems, Finland) was used according to manufacturer's instructions. Sera analysed for *C. pneumoniae* IgM and IgA were diluted in IgG blocker (Labsystems, Finland) to remove possible interference with IgG.

According to the reference data, the following criteria have been adopted [11, 12]:

1. Chronic (persistent) infection: IgG \geq 1:128, IgA \geq 1:32, IgM = 0.
2. Exacerbation of chronic infection: IgG \geq 1:512, IgA \geq 1:64, IgM = 0.
3. Primary acute infection: IgG \geq 1:512, IgM \geq 1:8.
4. Contact with the pathogen in the past: IgG < 1:128, IgA \leq 1:8, IgM = 0.

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using STATISTICA program. We started with Shapiro-Wilk's test to evaluate data distribution, as it appeared normal, t-Student test was used. A p-value < 0.05 was taken as indicative of statistical significance.

do grupy badanej, bez objawów chorób układu sercowo-naczyniowego i oddechowego.

Metody

Do oznaczenia miana swoistych przeciwciał w klasie IgG, IgA i IgM w surowicy chorych zastosowano metodę mikroimmunofluorescencji. Oznaczenie wykonano za pomocą testu *Chlamydia pneumoniae* Micro-IF firmy Labsystems (Finlandia), zgodnie z zaleceniami producenta. Próbkę surowicy, w których oznaczano miana swoistych przeciwciał klas IgM i IgA, wstępnie inkubowano z odczynnikiem blokującym IgG (IgG blocker, Labsystems, Finlandia).

Zgodnie z danymi z piśmiennictwa zastosowano następujące kryteria serologiczne [11, 12]:

1. Przewlekłe (przetrwale) zakażenie: IgG \geq 1:128, IgA \geq 1:32, IgM = 0.
2. Zaostrzenie przewlekłego zakażenia: IgG \geq 1:512, IgA \geq 1:64, IgM = 0.
3. Ostre pierwotne zakażenie: IgG \geq 1:512, IgM \geq 1:8.
4. Kontakt z patogenem: IgG < 1:128, IgA \leq 1:8, IgM = 0.

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą programu Statistica, wykorzystując test Shapiro-Wilka do oceny rozkładu, a następnie test t-Studenta. Za poziom kryterialny istotności obliczanych statystyk przyjęto p = 0,05. Wartości p równe lub wyższe od przyjętego kryterium oznaczano jako nieistotne.

Wyniki

Serologiczne wskaźniki przewlekłego zakażenia *C. pneumoniae* stwierdzono u 37/47 (80,9%) chorych z chorobą wieńcową, u 12/17 (70,6%) chorych z miażdżycowym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej, u 25/28 (89,3%) chorych z AAA oraz u 6/20 (30,0%) osób z grupy kontrolnej (ryc. 1).

Nie stwierdzono serologicznych wskaźników ostrego pierwotnego zakażenia *C. pneumoniae* u żadnego z chorych (brak swoistych przeciwciał klasy IgM).

I. Osoby z chorobą wieńcową

Wśród pacjentów na chorobę wieńcową u 25 osób stwierdzono ostry zawał serca, a u 18 — objawy niestabilnej choroby wieńcowej. Liczba chorych z przewlekłym zakażeniem *C. pneumoniae* wśród chorych z zawałem i niestabilną chorobą wieńcową była zbliżona (79,3% vs. 77,8%).

U 21/37 (56,8%) osób z chorobą wieńcową z serologicznymi wskaźnikami przewlekłego zakażenia *C. pneumoniae* odnotowano wysokie miana swoistych przeci-

Results

Serological markers of chronic *C. pneumoniae* infection were detected in 37/47 (80.9%) CHD patients, in 12/17 (70.6%) CAD patients, in 25/28 (89.3%) AAA patients and in 6/20 (30%) healthy controls (Fig. 1).

We did not detect serological markers of primary acute *C. pneumoniae* infection in any of our patients (lack of specific IgM).

1. CHD patients

Among CHD patients 29 persons had AMI and 18 had UA. The percentages of patients with chronic *C. pneumoniae* infection in the group of AMI and UA were comparable (79.3% vs. 77.8%).

21/37 (56.8%) CHD patients with serological signs of chronic *C. pneumoniae* infection had high titres of specific IgG and IgA, indicating exacerbation of chronic infection (active infection). The percentages of patients with serological signs of active infection were 52.2% and 64.3% for AMI and UA, respectively.

Three patients with UA had a history of AMI in the past. Two of them had serological signs of exacerbation and one of chronic *C. pneumoniae* infection.

2. CAD patients

5/12 (41.7%) CAD patients with serological signs of chronic infection had high titres of specific IgG and IgA, indicating active infection. All of them had symptoms of TIA.

3. AAA patients

10/25 (40.0%) AAA patients with serological signs of chronic infection had high titres of specific IgG and IgA, indicating active infection. All of them was diagnosed as having symptomatic disease (Fig. 2).

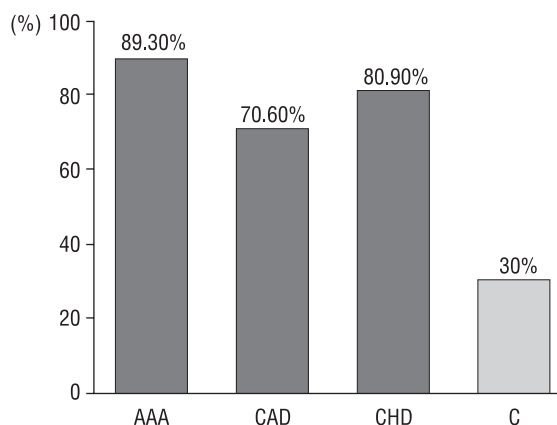


Figure 1. Chronic *C. pneumoniae* infection in coronary heart disease (CHD), carotid artery disease (CAD), abdominal aortic aneurysm patients (AAA) and healthy controls (C)

Rycina 1. Przewlekłe zakażenie *C. pneumoniae* u osób z chorobą wieńcową (CHD), miażdżycowym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej (CAD), tętniakiem aorty brzusznej (AAA) oraz w grupie kontrolnej (C)

ciał klasy IgG i IgA, wskazujące na zaostrzenie przewlekłego zakażenia (aktywne zakażenie). Odsetki chorych z aktywnym zakażeniem wynosiły: 52,2% w grupie chorych z zawałem i 64,3% w grupie chorych z niestabilną chorobą wieńcową.

U 3 pacjentów z niestabilną chorobą wieńcową stwierdzono w wywiadzie przebyty zawał. U 2 z nich występowały serologiczne wskaźniki zaostrzenia, a u 1 — przewlekłego zakażenia *C. pneumoniae*.

2. Chorzy z miażdżycowym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej

U 5/12 (41,7%) chorych z serologicznymi wskaźnikami przewlekłego zakażenia *C. pneumoniae* odnotowa-

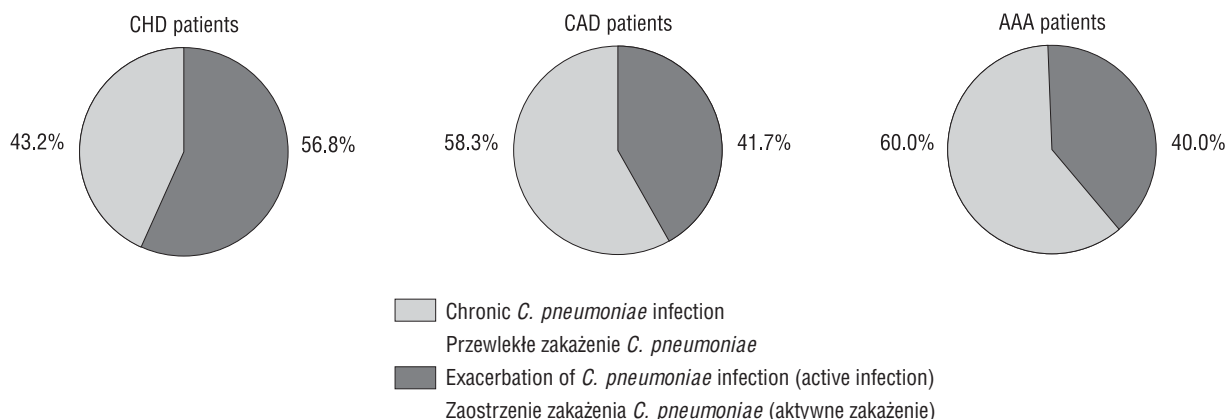


Figure 2. Chronic *C. pneumoniae* infection and its exacerbation (active infection) in patients with CHD, CAD and AAA

Rycina 2. Przewlekłe zakażenie *C. pneumoniae* i jego zaostrzenie (aktywne zakażenie) u osób z chorobą wieńcową (CHD, coronary heart disease), miażdżycowym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej (CAD, carotid artery disease) i tętniakiem aorty brzusznej (AAA, abdominal aortic aneurysm)

Discussion

Known risk factors for atherosclerosis account for only 50–70% of the incidence of cardiovascular diseases [6]. The search for additional risk factors has led to the re-evaluation of the role of infection in the development of atherosclerosis. Since P. Saikku et al. first reported that chronic *C. pneumoniae* infection could be a risk factor of coronary artery disease, a number of studies, including the direct demonstration of the organism in atherosclerotic plaques, have shown a positive relationship between *C. pneumoniae* infection and atherosclerosis [13–15]. Serology constitutes an important diagnostic tool in this research, and the MIF test in particular, which combines specificity with sensitivity, has become the “gold standard” test for *C. pneumoniae* infection [6]. Serology by the MIF test, when properly performed, is considered to be the most sensitive diagnostic method for *C. pneumoniae* infection to date, it still remains “the method of choice” [16–18]. The only problem is that different research groups apply different serological criteria for acute and chronic infection. These differences in interpretation make it difficult to compare the results obtained by different laboratories [6]. The criteria according to Hahn and von Hertzen used in our work were restricted [11, 12]. IgG and IgA titres applied by us for MIF results interpretation were the highest in comparison with the ones used by other authors [6].

The persistence of elevated antibody titres is generally considered to be a sign of chronic infection [19, 20]. There are no means to distinguish reliably between chronic and recurrent infections, although the constant presence of IgA antibodies has been proposed as an indication of chronic infection. IgA is a short-lived immunoglobulin (half-life 5,8 day), hence its presence implies that the antigen is still present. A high IgA titre is considered to be a marker for various chronic bacterial infections, including *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Circulating specific IgA is undoubtedly a marker of the presence of *C. pneumoniae* and it may indicate that the infection is chronic and still active [21]. Constantly elevated levels of more long-lived IgG antibodies may reflect recurrent infections in the past. IgM antibodies are considered to indicate primary acute infection [22].

In our study we observed a statistically important higher frequency of chronic *C. pneumoniae* infection in all three examined groups of patients, in comparison with healthy controls. Our results are in accordance with the results obtained by other investigators [3, 14, 23, 24].

Several recent reports have suggested that IgG antibodies to *C. pneumoniae* are not associated with the risk

no wysokie miana swoistych przeciwciał klasy IgG i IgA, wskazujące na aktywne zakażenie. U wszystkich pacjentów stwierdzono objawy przemijającego niedokrwienia mózgu.

3. Chorzy z AAA

U 10/25 (40,0%) chorych z AAA z serologicznymi wskaźnikami przewlekłego zakażenia *C. pneumoniae* zaobserwowano wysokie miana swoistych IgG i IgA, wskazujących na aktywne zakażenie. U wszystkich wystąpiły objawy AAA (ryc. 2).

Dyskusja

Klasyczne czynniki ryzyka miażdżycy występują jedynie u 50–70% osób z chorobami układu krążenia [6]. Poszukiwanie dodatkowych czynników ryzyka spowodowało powrót do teorii dotyczącej udziału czynników zakaźnych w rozwoju miażdżycy. Od czasu, kiedy zespół Saikku stwierdził, że przewlekłe zakażenie *C. pneumoniae* może być czynnikiem ryzyka choroby wieńcowej, powstało wiele prac (w tym również prace, w których bezpośrednio wykryto obecność tego drobnoustroju w blaszkach miażdżycowych), które wykazały związek między zakażeniem *C. pneumoniae* a miażdżycą [13–15]. Testy serologiczne są ważnym narzędziem diagnostycznym w badaniach nad zakażeniem *C. pneumoniae*. Test mikroimmunofluorescencji (MIF), charakteryzujący się wysoką swoistością i czułością, uznano za wzorcowy w tych badaniach [6]. Prawidłowo wykonany test MIF uważa się wciąż za najczulszą metodę diagnostyczną wykrywania zakażenia *C. pneumoniae* — pozostaje on więc „metodą z wyboru” [16–18]. Jedyną wadą tej metody polega na tym, że badacze stosują różne kryteria serologiczne w celu rozpoznawania ostrego i przewlekłego zakażenia, co utrudnia porównywanie uzyskanych wyników [6]. Kryteria zastosowane w niniejszej pracy, według Hahna i von Hertzen, były surowe [11, 12]. Zastosowane miana IgG i IgA do interpretacji testu MIF, były najwyższe w porównaniu z mianami, stosowanymi przez innych autorów [6].

Długotrwanie utrzymujące się podwyższone miana swoistych przeciwciał powszechnie uważa się za wykładnik przewlekłego zakażenia [19, 20]. Nie istnieją dokładne kryteria serologiczne pozwalające odróżnić zakażenia przewlekłe od nawracających, uważa się jednak, że stała obecność przeciwciał klasy IgA wskazuje raczej na przewlekłe zakażenie. Przeciwciała klasy IgA należą do immunoglobulin krótkożyjących (czas połowicznego rozpadu wynosi 5,8 dnia), tym samym ich wystąpienie świadczy o stałej obecności antygeny. Wysokie miana IgA uważa się za wskaźnik wielu przewlekłych zakażeń bakteryjnych, w tym również zakażenia

of CHD and a high level of IgA is a better marker for chronic *C. pneumoniae* infection in connection with this disease [3, 25, 26]. However, the presence of *C. pneumoniae* IgA antibodies alone is not a serious risk factor, but the risk increases when other risk factors such as smoking, male sex, atherogenic lipid profile and hypertension are present simultaneously [3, 26]. All patients diagnosed by us as chronically infected with *C. pneumoniae* had IgA titres 1:32 and higher (which are considered high by most investigators), most of them had also other CHD risk factors.

56.8%, 41.7% and 40.0% of CHD, CAD and AAA patients, respectively, had serological markers of active infection. In the groups of CAD and AAA patients, all persons who had active infection were symptomatic.

In the recent work of J. S. Lindholt and al. the progression of AAA in men was positively correlated with the presence of indicators of *C. pneumoniae* infection. A significant positive correlation between both IgA and IgG titres and mean annual expansion of AAA was observed. An IgG titre of 1:128 or higher was present significantly more often in cases with an expansion greater than 1 cm annually [27]. Mosorin et al. in a randomised, double-blind, placebo-controlled pilot study observed that doxycycline (150 mg/d. for 3-month period) decreased the growth rate of small AAA during the 18-month follow-up [28].

The first preliminary intervention trials with antibiotics in CHD patients gave positive results: azithromycin decreased cardiac events in patients with raised *C. pneumoniae* antibodies, and roxithromycin did so in patients with unstable angina [29, 30].

In the recent study on the presence of *C. pneumoniae* in human symptomatic and asymptomatic carotid atherosclerotic plaque, high serum specific IgA levels were associated with the occurrence of symptomatic disease. According to the authors, such an association suggests that chlamydial infection could play a role in atherosclerotic plaque activation and be used as a marker to target populations in future stroke prevention trials [31].

C. Katsenis et al. demonstrated recently that patients with advanced atherosclerotic carotid disease had an increased incidence of *C. pneumoniae* infection, detected serologically and by PCR. The authors suggest that active infection could be responsible for instability of the carotid plaque, causing cerebral ischemic episodes [32].

Serologically diagnosed chronic *C. pneumoniae* infection occurs significantly more frequently in patients with CHD, CAD, and AAA than in healthy controls. Active infection seems to be associated with symptomatic disease in CAD and AAA patients. Several intervention

Pseudomonas aeruginosa u chorych na mukowiscydozę. Krążące swoiste przeciwciała klasy IgA są niewątpliwym wskaźnikiem obecności *C. pneumoniae* i mogą wskazywać, że zakażenie jest przewlekłe i wciąż aktywne [21]. Długotrwałe utrzymujące się podwyższone miana przeciwciał klasy IgG mogą wskazywać na nawracające zakażenia, przebyte w przeszłości. Obecność przeciwciał klasy IgM wskazuje na ostre, pierwotne zakażenie [22].

W badaniach przeprowadzonych przez autorów niniejszego artykułu stwierdzono statystycznie istotną wyższą częstość przewlekłego zakażenia *C. pneumoniae* we wszystkich trzech grupach chorych w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki te są zgodne z wynikami otrzymanymi przez innych autorów [3, 14, 23, 24].

Ostatnio opublikowane prace sugerowały, że przeciwciała klasy IgG anty-*C. pneumoniae* nie wiążą się z ryzykiem wystąpienia choroby wieńcowej. Według autorów tych prac wysokie miana przeciwciał klasy IgA są lepszym wskaźnikiem obecności przewlekłego zakażenia *C. pneumoniae* w tej chorobie [3, 25, 26]. Jednak obecność przeciwciał klasy IgA anty-*C. pneumoniae* jako jedyne go czynnika ryzyka nie stanowi poważnego zagrożenia — ryzyko wzrasta przy równoczesnej obecności innych czynników, takich jak palenie tytoniu, płeć męska, profil lipidów charakterystyczny dla miażdżycy oraz nadciśnienie [3, 26]. U wszystkich chorych zakwalifikowanych jako grupa z przewlekłym zakażeniem *C. pneumoniae* odnotowano miana swoistych przeciwciał klasy IgA \geq 1:32 (miana takie większość autorów uważa za wysokie), u większości z nich występowały również inne czynniki ryzyka choroby wieńcowej.

U 56,8% osób z chorobą wieńcową, u 41,7% chorych z miażdżycowym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej oraz u 40,0% chorych z AAA zaobserwowano serologiczne wskaźniki aktywnego zakażenia. W grupie chorych z miażdżycowym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej i AAA u wszystkich osób z aktywnym zakażeniem odnotowano objawy.

W niedawno opublikowanej pracy Lindholt i wsp. wykazali dodatnią korelację między progresją AAA u mężczyzn a obecnością wskaźników zakażenia *C. pneumoniae*. Stwierdzono znaczącą dodatnią korelację między wysokością mian swoistych IgA i IgG a średnią roczną progresją AAA. Wysokość miana IgG \geq 1:128 występowała statystycznie częściej u chorych z roczną progresją $>$ 1 cm [27]. Mosorin i wsp. stwierdzili w pilotażowej, randomizowanej, podwójnie ślepej próbie z użyciem placebo, że doksycyklina podawana w dawce 150 mg/d. przez 3 miesiące spowodowała zmniejszenie współczynnika wzrostu małych tętniaków (chorych kontrolowano przez 18 miesięcy po zakończeniu antybiotykoterapii) [28].

trials with antibiotics are underway and will hopefully shed new light on the role of infection in atherosclerosis. However, the causal relation between *C. pneumoniae* and atherosclerosis is yet to be demonstrated. The importance of defining the role of *C. pneumoniae* in atherogenesis is fundamental, because it may drastically change the paradigm of the disease and its therapeutic approach as well.

Conclusions

1. Serological signs of chronic *C. pneumoniae* infection occur statistically more frequently in CHD, CAD and AAA patients in comparison with healthy controls ($p < 0.05$).
2. Active *C. pneumoniae* infection is associated with symptoms of AAA and transient ischemic attacks (TIA).

References

1. Ross R (1999) Atherosclerosis. An inflammatory disease. *New Engl J Med*, 340: 115.
2. Ngeh J, Anand V, Gupta S (2002) *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis — what we know and what we don't. *Clin Microbiol Infect*, 8 (1): 2.
3. Leinonen M, Saikku P (2002) Evidence for infectious agents in cardiovascular disease and atherosclerosis. *Lancet Infectious Diseases*, 2: 11.
4. Lindholt JS, Juul S, Vammen S et al. (1999) Immunoglobulin A antibodies against *Chlamydia pneumoniae* are associated with expansion of abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg*, 86: 634.
5. Sessa R, Di Pietro M, Santino I et al. (1999) *Chlamydia pneumoniae* infection and atherosclerotic coronary disease. *Am Heart J*, 137: 1116.
6. Orfila JJ (1998) Seroepidemiological evidence for an association between *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 140 (Suppl. 1): S11.
7. Grayston JT, Kuo C-C, Coulson AS et al. (1995) *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) in atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation*, 92: 3397.
8. Rodel J, Assefa S, Prochnau D et al. (2000) Interferon-beta induction by *Chlamydia pneumoniae* in human smooth muscle cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 32: 9.
9. Wimmer MLJ, Sandmann-Strupp R, Saikku P et al. (1996) Association of chlamydial infection with cerebrovascular disease. *Stroke*, 27: 2207.
10. Surcel HM, Syrjala H, Leinonen M et al. (1993) Cell-mediated immunity to *Chlamydia pneumoniae* measured as lymphocyte blast transformation in vitro. *Infect Immun*, 61 (5): 2196.
11. Hahn DL, Bukstein D, Luskin A et al. (1998) Evidence for *Chlamydia pneumoniae* infection in steroid-dependent asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 80: 45.
12. Herten von L, Kaprio J, Koskanvuo M et al. (1998) Humoral immune response to *Chlamydia pneumoniae* in twins discordant for smoking. *J Intern Med*, 244: 227.

Pierwsze wstępne próby podawania antybiotyków osobom z chorobą wieńcową z podwyższonymi mianami przeciwciał anty-*C. pneumoniae* dały pozytywne wyniki: podawanie azitromycyny spowodowało zmniejszenie częstości zawałów serca u chorych po przebytych zawałach, natomiast podawanie roxitromycyny zmniejszyło częstość zawałów u osób z niestabilną chorobą wieńcową [29, 30].

W niedawno przeprowadzonych badaniach nad obecnością *C. pneumoniae* w blaszkach miażdżycowych u chorych ze zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej stwierdzono związek wysokich mian swoistych IgA z występowaniem objawów przejściowego niedokrwienia mózgu. Autorzy tej pracy sugerują, że zakażenie *C. pneumoniae* może odgrywać rolę w destabilizacji blaszki miażdżycowej, a także, że oznaczanie miana swoistych IgA może być użyteczne w identyfikacji chorych z wysokim ryzykiem wystąpienia udaru mózgu w przyszłych badaniach prewencyjnych [31].

Katsenis i wsp. stwierdzili niedawno na podstawie badań serologicznych i polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR, *polymerase chain reaction*) wyższą częstość zakażenia *C. pneumoniae* u chorych z zaawansowanym miażdżycowym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej. Autorzy również sugerują, że aktywne zakażenie może odpowiadać za niestabilność blaszki miażdżycowej, a tym samym za wystąpienie objawów przemijającego niedokrwienia mózgu [32].

Serologiczne wskaźniki przewlekłego zakażenia *C. pneumoniae* występują statystycznie częściej u osób z chorobą wieńcową, miażdżycowym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej i AAA w porównaniu z grupą kontrolną. Aktywne zakażenie wiąże się z objawami AAA i przemijającym niedokrwieniem mózgu. Próby podawania antybiotyków osobom z chorobami układu krążenia trwają — jest nadzieja, że ich wyniki wpłyną to na wyjaśnienie roli zakażenia w miażdżycy. Jednak przyczynowo-skutkowy związek między zakażeniem *C. pneumoniae* a miażdżycą wciąż pozostaje niewyjaśniony. Zdefiniowanie roli *C. pneumoniae* w aterogenezie ma ogromne znaczenie, ponieważ może gruntownie zmienić rozumienie miażdżycy oraz jej leczenie.

Wnioski

1. Serologiczne wskaźniki przewlekłego zakażenia *C. pneumoniae* występują statystycznie częściej u osób z chorobą wieńcową, miażdżycowym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej i AAA w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,05$).
2. Aktywne zakażenie *C. pneumoniae* wiąże się z objawami AAA i przemijającego niedokrwienia mózgu.

13. Saikku P, Leinonen M, Mattila K et al. (1988) Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet*, 2: 983.
14. Soares de Azeredo Coutinho MS, Nakamae FJD, Menezes ME (2000) *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. Identification of bacterial DNA in the arterial wall. *Arq Bras Cardiol*, 74: 124.
15. Song YG, Kwon HM, Kim JM et al. (2000) Serologic and histopathologic study of *Chlamydia pneumoniae* infection in atherosclerosis: a possible pathogenic mechanism of atherosclerosis induced by *Chlamydia pneumoniae*. *Yonsei Med J*, 41 (3): 319.
16. Herten von L, Alakärppä H, Koskinen R et al. (1997) *Chlamydia pneumoniae* infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Epidemiol Infect*, 118: 155.
17. Peeling RW, Wang SP, Grayston JT et al. (2000) Inter-laboratory comparison of micro-immunofluorescence results. In: *Proceedings Fourth Meeting of the European Society for Chlamydia Research*, (ed.) Saikku P Helsinki, Finland August 20–23, 130.
18. Saikku P Diagnosis of acute and chronic *Chlamydia pneumoniae* infection. In: *Chlamydial Infections. Proceedings of the VIII International Symposium on Human Chlamydial Infections*. Chateau de Montvillargenne, France, 19–24.06.1994, Orfila J, Byrne GI, Chernesky MA et al. (1994) eds. Bologna: Societa Editrice Esculapio, 163.
19. Saikku P (1991) Problems in diagnosis of chronic *Chlamydia pneumoniae* infections. In: *Rapid methods and automation in microbiology and immunology*. Vaheri A, Tilton RC, Balows A (ed.) Springer Verlag, 309.
20. Laurila A, von Hertzen L, Saikku P et al. (1997) *Chlamydia pneumoniae* and chronic lung diseases. *Scand J Infect Dis*, 104 (Suppl.): 34.
21. Kato A, Odamaki M, Takita T et al. (2002) Association between interleukin-6 and carotid atherosclerosis in hemodialysis patients. *Kidney International*, 61: 1143.
22. Herten von L, Töyrylä M, Gimishanov A et al. (1999) Asthma, atopy and *Chlamydia pneumoniae* antibodies in adults. *Clin Exp Allergy*, 29: 522.
23. Mazzoli S, Tofani N, Fantini A et al. (1998) *Chlamydia pneumoniae* antibody response in patients with acute myocardial infarction and their follow-up. *Am Heart J*, 135: 15.
24. Halvorsen DS, Borvik T, Njolstad I et al. (2002) *Chlamydia pneumoniae* IgA- and IgG antibodies in young survivors of myocardial infarction. A comparison of antibody detection by a microimmunofluorescence test and enzyme immunoassay. *J Intern Med*, 251 (2): 142.
25. Danesh J, Whincup P, Walker M et al. (2000) *Chlamydia pneumoniae* IgG titres and coronary heart disease: prospective study and meta-analysis. *BMJ* 321: 208.
26. Huittinen T, Leinonen M, Tenkanen L et al. (2002) Autoimmunity to human heat shock protein 60, *Chlamydia pneumoniae* infection, and inflammation in predicting coronary risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22: 431.
27. Lindholt JS, Ashton HA, Scott RA (2001) Indicators of infection with *Chlamydia pneumoniae* are associated with expansion of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*, 34 (2): 212.
28. Mosorin M, Juvonen J, Biancari F et al. (2001) Use of doxycycline to decrease the growth rate of abdominal aortic aneurysms: A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *J Vasc Surg*, 34 (4): 606.
29. Gupta S, Leatham EW, Carrington D et al. (1997) Elevated *Chlamydia pneumoniae* antibodies, cardiovascular events, and azithromycin in male survivors of myocardial infarction. *Circulation*, 96: 404.
30. Gurfinkel E, Bozovich G, Daroca A et al. (1997) Randomized trial of roxithromycin in non-Q-wave coronary syndromes: ROXIS pilot study. *Lancet*, 350: 404.
31. LaBiche R, Koziol D, Quinn TC et al. (2001) Presence of *Chlamydia pneumoniae* in human symptomatic and asymptomatic carotid atherosclerotic plaque. *Stroke*, 32 (4): 855.
32. Katsenis C, Kouskouni E, Kolokotronis L et al. (2001) The significance of *Chlamydia pneumoniae* in symptomatic carotid stenosis. *Angiology*, 52 (9): 615.