

Chlamydia pneumoniae infection in patients with carotid artery disease

Zakażenie *Chlamydia pneumoniae* u chorych z miażdżycowym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej

Elżbieta Mazur, Justyna Niedźwiadek, Andrzej Wolski, Janusz Ślepko, Jerzy Ligęza, Maria Koziół-Montewka, Jerzy Michalak

Medical Microbiology Department, Vascular Surgery Department, University School of Medicine in Lublin, Poland (Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Akademii Medycznej w Lublinie)

Abstract

Background. Infection with *Chlamydia pneumoniae*, a common human respiratory tract pathogen, has been recently associated with cardiovascular syndromes, such as atherosclerosis, myocardial infarction and stroke. According to the literature data significantly high percentage of CAD patients exhibited serological markers of chronic *Chlamydia pneumoniae* infection. *Chlamydia pneumoniae* DNA and antigens were also detected (using variety of methods) in carotid arteries atherosclerotic plaques.

The aim of the study was to evaluate the frequency of *Chlamydia pneumoniae* infection in CAD patients by measuring specific serum IgG, IgM and IgA levels and by detection of *Chlamydia pneumoniae* DNA in carotid atherosclerotic plaques.

Material and methods. 28 patients operated for CAD (8 female, 20 male; mean age 64.5 years) and 20 control subjects matched for age and sex (4 female, 16 male) without clinical signs and symptoms of cardiovascular and pulmonary disease were enrolled in the study. Microimmunofluorescence method was applied to evaluate the level of anti-*Chlamydia pneumoniae* IgG, IgA and IgM. *Chlamydia pneumoniae* micro-IF test (Labsystem) was used. Nested PCR was used for *Chlamydia pneumoniae* DNA detection in atherosclerotic plaques, obtained during carotid endarterectomy. The results were evaluated by means of STATISTICA software programme and considered statistically significant when was less than 0.05 ($p < 0.05$).

Results. Serologic markers of chronic *Chlamydia pneumoniae* infection were detected in 22 of 28 (78.6%) patients and in 6 of 20 (30%) healthy controls. In 36.4% (8/22) of patients with serologic markers of chronic *Chlamydia pneumoniae* infection we observed high titers of specific IgG and IgA, which can indicate reinfection or exacerbation of chronic infection. Interestingly, all patients in this group presented to have TIA symptoms. *Chlamydia pneumoniae* DNA was present in carotid atherosclerotic plaques obtained from 17 (60.7%) patients.

Conclusions. Serological signs of chronic *Chlamydia pneumoniae* infection occur statistically more frequent in CAD patients compared to healthy controls. Active *Chlamydia pneumoniae* infection is associated with TIA symptoms. There is an urgent need of standardization of PCR methods detecting DNA *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic plaques.

Key words: *Chlamydia pneumoniae*, carotid artery 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 miażdżycy, zawał serca i udar mózgu. Według danych

Address for correspondence (Adres do korespondencji):

Dr n. med. Elżbieta Mazur, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Akademii Medycznej, ul. Chodźki 1, 20–093 Lublin, Poland
tel. +48 (0 81) 740 58 37, fax: +48 (0 81) 740 58 33

z piśmiennictwa u znacznego odsetka chorych z miażdżycowym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej wykryto serologiczne wskaźniki przewlekłego zakażenia *Chlamydia pneumoniae*. Korzystając z różnych metod, wykryto również DNA i antygeny *Chlamydia pneumoniae* w blaszkach miażdżycowych zlokalizowanych w obrębie tętnic szyjnych wewnętrznych.

Celem pracy była ocena częstości występowania zakażenia *Chlamydia pneumoniae* u chorych z miażdżycowym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej poprzez oznaczenie miana swoistych przeciwciał klasy IgG, IgM i IgA oraz poprzez detekcję DNA *Chlamydia pneumoniae* w blaszkach miażdżycowych, usuniętych podczas zabiegu udrożnienia tętnic szyjnych wewnętrznych.

Material i metody. Badaniem objęto 28 chorych z miażdżycowym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej (8 kobiet, 20 mężczyzn), średni wiek chorych wynosił 64,5 roku. Grupa kontrolna składała się z 20 osób, zbliżonych pod względem wieku i płci do grupy badanej, bez objawów chorób układu sercowo-naczyniowego i oddechowego. Ocenę miana swoistych przeciwciał anty-*Chlamydia pneumoniae* klasy IgG, IgA i IgM przeprowadzono, stosując metodę mikroimmunofluorescencji, za pomocą testu *Chlamydia pneumoniae* Micro-IF firmy Labsystems (Finlandia). Do wykrywania DNA *Chlamydia pneumoniae* w blaszkach miażdżycowych użyto metody nested PCR. W analizie statystycznej wykorzystano program Statistica. Za istotne statystycznie przyjęto $p < 0,05$.

Wyniki. Serologiczne wskaźniki przewlekłego zakażenia *Chlamydia pneumoniae* stwierdzono u 22 spośród 28 chorych (78,6%) oraz u 6 spośród 20 osób z grupy kontrolnej (30%). U 36,4% pacjentów (8/22), u których rozpoznano serologicznie przewlekłe zakażenie *Chlamydia pneumoniae*, zaobserwowano wysokie miana swoistych przeciwciał klasy IgG i IgA, wskazujące na reinfekcję lub zaostrzenie przewlekłego zakażenia. U wszystkich chorych w tej grupie odnotowano objawy przemijającego niedokrwienia mózgu. DNA *Chlamydia pneumoniae* stwierdzono u 17 (60,7%) chorych z miażdżycowym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej.

Wnioski: Serologiczne wskaźniki przewlekłego zakażenia *Chlamydia pneumoniae* występują statystycznie częściej u chorych z miażdżycowym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej niż w grupie kontrolnej. Aktywne zakażenie *Chlamydia pneumoniae* wiąże się z występowaniem objawów przemijającego niedokrwienia mózgu. Istnieje pilna potrzeba standaryzacji metod PCR wykrywających DNA *Chlamydia pneumoniae* w blaszkach miażdżycowych.

Słowa kluczowe: *Chlamydia pneumoniae*, zwężenie tętnic szyjnych wewnętrznych

Introduction

Nearly three-quarters of all adult deaths in developed countries are due to cardiovascular diseases. Stroke is the third most common cause of death, behind heart disease and cancer. Atherosclerosis is the most common form of occlusive disease and, therefore, the most common cause of stroke originating from disease in the cervical carotid artery.

Atherosclerosis is a multifactorial disease with several well-described risk factors, including smoking, hypertension and dyslipidemia. The differences in the prevalence of these conventional risk factors do not fully account for temporal and geographic variations in the prevalence and severity of the disease. About one third of the individuals with atherosclerosis are estimated not to have any of these major risk factors [1]. Consequently, there is intense research interest focused on seeking other atherogenic risk factors, such as coagulation factors, inflammatory factors, and infectious agents.

Current data support the hypothesis that atherosclerosis is an inflammatory disease. According to the

Wstęp

Choroby serca i naczyń krwionośnych powodują około 75% zgonów ludzi dorosłych w krajach rozwiniętych. Udar mózgu jest trzecią (po chorobach serca i chorobach nowotworowych) co do częstości przyczyną zgonów. Miażdżycy, będąc najczęstszą chorobą powodującą zwężenie, a nawet całkowite zamknięcie światła naczyń, jest tym samym najczęstszą przyczyną udaru, rozwijającego się na podłożu chorób tętnic szyjnych. Miażdżycy jest chorobą o złożonej etiologii. Charakteryzuje się wieloma dobrze poznanymi czynnikami ryzyka, do których należą m.in. palenie tytoniu, nadciśnienie tętnicze i dyslipidemia. Różnice w występowaniu u chorych konwencjonalnych czynników ryzyka nie wyjaśniają jednak całkowicie czasowego i geograficznego zróżnicowania w pojawianiu się i ciężkości tej choroby — u około 1/3 chorych z objawami miażdżycy nie występują żadne z najważniejszych czynników ryzyka [1]. Dlatego też poszukuje się innych czynników ryzyka, np. związanych z procesami krzepnięcia, z reakcjami zapalnymi lub czynnikami zakaźnymi.

up-to-date theory of atherogenesis, this process begins with an "initial injury" that triggers an inflammatory response involving lymphocytes, macrophages, smooth muscle cells, and endothelial cells [2].

Some of the triggers proposed for the "initial injury" in atherosclerosis include carbon monoxide of cigarettes, hemodynamic "friction" upon the endothelium, hypercholesterolemia, oxidized low density lipoprotein (LDL), and more recently, infectious agents such as herpesvirus (HSV), cytomegalovirus, *Helicobacter pylori*, and *Chlamydia pneumoniae* [1, 3].

Chlamydia pneumoniae is an obligate intracellular bacterial pathogen causing respiratory tract infections, such as pneumonia, bronchitis, sinusitis, and pharyngitis in both adults and children [4]. However, many chlamydial infections are primarily asymptomatic but show a tendency to persist. The duration of immune protection after infection with *Chlamydia pneumoniae* is limited, 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 [5]. Chronic or recurrent *Chlamydia pneumoniae* infections have been associated with adult-onset asthma, atherosclerosis, coronary heart disease and increased risk of stroke and transient ischemic events [6, 7].

The association of *Chlamydia pneumoniae* and coronary, carotid, and peripheral arterial disease has been described in several countries in seroepidemiologic, anatomopathological and experimental studies. Saikku et al. first reported an association of antibody against *Chlamydia pneumoniae* and coronary heart disease in 1988. The same group reported the detection of immune complexes containing chlamydial lipopolysaccharide in more than 60% of patients with acute myocardial infarction [8]. An association of *Chlamydia pneumoniae* antibody and carotid artery thickening has also been reported [4]. Alan Shor found structures on electron microscopy that resembled the unique pear shape of *Chlamydia pneumoniae*. Kuo et al. [4] showed by immunocytochemistry with *Chlamydia pneumoniae* specific monoclonal antibody, and Lee Ann Campbell by the polymerase chain reaction (PCR), that Shor's structures were *Chlamydia pneumoniae* [9]. Reports on cultivation of *Chlamydia pneumoniae* in fragments of arteries exist, showing the viability of the bacterium and its multiplication capacity in that type of environment [1, 10].

A variety of experiments offer possible pathogenic mechanisms for *Chlamydia pneumoniae* to cause atherosclerosis. *In vitro*, *Chlamydia pneumoniae* has been shown to multiply in macrophages, endothelial, and smooth muscle cells. *Chlamydia pneumoniae* is a gram-negative intracellular bacterium possessing lipopolysaccharide and its

Według aktualnej wiedzy miażdżycę uznaje się za chorobę zapalną. Proces aterosklerozy rozpoczyna się od niewielkiego „początkowego uszkodzenia”, uruchamiającego odpowiedź odpornościową, w której biorą udział limfocyty, makrofagi, komórki mięśni gładkich i komórki śródbłonna [2]. Do czynników odpowiedzialnych za „początkowe uszkodzenie” zalicza się m.in. tlenek węgla, obecny w dymie tytoniowym, hemodynamiczny nacisk („tarcie”) na komórki śródbłonna, podwyższone wartości stężenia cholesterolu, obecność utlenionego cholesterolu frakcji LDL. Ostatnio do czynników tych zalicza się również czynniki zakaźne, takie jak wirus opryszczki, wirus cytomegalii, *Helicobacter pylori* i *Chlamydia pneumoniae* [1, 3].

Chlamydia pneumoniae jest bezwzględny pasożytem wewnątrzkomórkowym, wywołującym zarówno u dorosłych, jak i u dzieci zakażenia dróg oddechowych, np. zapalenie płuc, oskrzeli, zatok i gardła [4]. Wiele zakażeń chlamydowych to zakażenia bezobjawowe lub skąpoobjawowe, z tendencją do przewlekłości. Ochronne działanie przeciwciał po przebyciu zakażenia *Chlamydia pneumoniae* trwa przez czas ograniczony; przewlekłe zakażenie może wystąpić jeśli organizm chorego nie jest w stanie wyeliminować patogenu. Zarówno przewlekłe, jak i nawracające zakażenia wywołują nasiloną reakcję zapalną [5].

Wykazano związek między przewlekłym lub nawracającym zakażeniem *Chlamydia pneumoniae* a astmą oskrzelową, miażdżycą, chorobą wieńcową i podwyższonym ryzykiem udaru mózgu lub jego przemijającego niedokrwienia [6, 7].

Na podstawie badań seroepidemiologicznych, anatomopatologicznych i prac doświadczalnych przeprowadzonych w wielu krajach opisano związek *Chlamydia pneumoniae* z chorobami naczyń wieńcowych, tętnic szyjnych i obwodowych. Zespół prof. P. Saikku w 1988 roku jako pierwszy opisał związek między obecnością swoistych przeciwciał anti-*Chlamydia pneumoniae* a chorobą wieńcową. Ten sam zespół wykrył obecność kompleksów immunologicznych zawierających lipopolisacharyd *Chlamydia pneumoniae* u ponad 60% chorych z ostrym zawałem serca [8]. Opisano również związek między obecnością przeciwciał (skierowanych przeciwko *Chlamydia pneumoniae*) a miażdżycą tętnic szyjnych [4]. Alan Shor za pomocą mikroskopu elektronowego wykrył w blaszce miażdżycowej obecność struktur przypominających gruszkowatym kształtem *Chlamydia pneumoniae*. Kuo i wsp. [4] metodą immunohistochemiczną z użyciem przeciwciał monoklonalnych oraz Campbell metodą PCR potwierdzili, że struktury obserwowane przez Shora to istotnie *Chlamydia pneumoniae* [9]. Udało się również wyhodować ten drobnoustrój ze skrawków

multiplication was associated with cytokine production and induction of adhesins. *Chlamydia pneumoniae* infection of human endothelial cells stimulated transendothelial migration of neutrophils and monocytes. Experiments with human macrophages *in vitro* showed that with added low density lipoprotein (LDL) in the media the macrophages ingested some of the lipid. However, if the cells were infected with *Chlamydia pneumoniae* much greater amounts of cholesterol esters could be measured and many of the infected cells took on the characteristic appearance of foam cells found in atheroma. It has been shown that *Chlamydia* heat shock protein 60 localizes in human atheroma and may regulate macrophage tumor necrosis factor- α and matrix metalloproteinase expression, functions considered relevant to atherosclerosis and its complications [3, 9, 11].

Chlamydia pneumoniae could play a causative role in one or more of the many different stages in the development of atherosclerosis which is a nearly life long process. It could be in initiation of the disease or in the development or acceleration of the process. The early animal model studies most strongly support *Chlamydia pneumoniae* involvement along with lipids in the development and acceleration of the disease, but do not rule out a role in initiation of the disease. The organism could also play a role in the final stages of the disease when complications of atherosclerosis lead to events such as myocardial infarction or ischemic stroke [9].

The aim of our study was to evaluate the frequency of *Chlamydia pneumoniae* infection in CAD patients by measuring *Chlamydia pneumoniae*-specific serum IgG, IgM and IgA levels and by detecting *Chlamydia pneumoniae* DNA in atherosclerotic plaques obtained during carotid endarterectomy using nested PCR method.

Material and methods

Twenty-eight CAD patients (8 female, 20 male), mean age 64.5 years, have participated in the research. All patients previously were treated with 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 and sera were frozen in -20°C before carrying out MIF test. Atherosclerotic plaques obtained during endarterectomy were frozen in -70°C until performing PCR procedure. The specimens were collected from July 2001 through January 2002 (Tab. I).

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

Serological studies

To evaluate the level of specific IgA, IgM and IgG in patients' sera microimmunofluorescence method (MIF)

tętnic — wykazano w ten sposób, że *Chlamydia pneumoniae* żyje i może namnażać się w tkance naczyń [1, 10].

W wielu pracach doświadczalnych opisano możliwe mechanizmy udziału *Chlamydia pneumoniae* w patogenezie miażdżycy. W badaniach *in vitro* wykazano, że drobnoustrój ten namnaża się w makrofagach, komórkach śródbłonna i komórkach mięśni gładkich. *Chlamydia pneumoniae* jest gram-ujemną bakterią, posiadającą LPS, a jej wewnątrzkomórkowe namnażanie wiąże się z wytwarzaniem cytokin i indukcją cząstek adhezyjnych. Zakażenie komórek śródbłonna *Chlamydia pneumoniae* wywołuje migrację neutrofilii i monocytów. W badaniach *in vitro* prowadzonych na ludzkich makrofagach udowodniono, że po dodaniu do podłoża cholesterolu LDL, makrofagi fagocytują go. Jeśli jednak makrofagi zakażono *Chlamydia pneumoniae*, fagocytują one znacznie większe ilości LDL, a wiele z nich przekształca się w komórki piankowate, charakterystyczne dla blaszek miażdżycowych. Wykazano, że chlamydiowe białka szoku termicznego (hsp-60) występują w blaszce miażdżycowej i mogą wpływać regulująco na ekspresję TNF- α i metaloprotein macierzy, uczestnicząc w ten sposób w najistotniejszych mechanizmach rozwoju miażdżycy i jej następstw [3, 9, 11].

Chlamydia pneumoniae może odgrywać rolę przyczynową w wielu stadiach miażdżycy — choroby rozwijającej się przez niemal całe życie. Może brać udział w zapoczątkowaniu choroby, w różnych etapach jej rozwoju, a także rozwój ten przyspieszać. Wczesne badania przeprowadzone na modelach zwierzęcych potwierdzają udział *Chlamydia pneumoniae*, działającej synergistycznie z lipidami, w rozwoju i przyspieszaniu progresji choroby, nie wykluczają jednak udziału tego patogenu w jej zapoczątkowaniu. *Chlamydia pneumoniae* może również uczestniczyć w końcowych etapach choroby, kiedy powikłania miażdżycy doprowadzają do zawału serca lub udaru mózgu [9].

Celem niniejszej pracy była ocena częstości występowania zakażeń *Chlamydia pneumoniae* u chorych ze zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej poprzez oznaczenie miana swoistych przeciwciał w klasie IgG, IgM i IgA oraz wykrywanie DNA *Chlamydia pneumoniae* metodą PCR w blaszkach miażdżycowych, usuniętych podczas zabiegu udrożnienia.

Materiał i metody

Badaniem objęto 28 chorych ze zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej (8 kobiet, 20 mężczyzn), średni wiek chorych wynosił 64,5 roku. Wskazaniem do operacji było zwężenie tętnicy szyjnej wewnętrznej powyżej 70%, zarówno u chorych z objawami, jak i u pacjentów, u których objawy nie występowały. Krew do ba-

Table 1. Clinical characteristics of patients**Tabela 1.** Charakterystyka grupy badanej

Characteristic Wyszczególnienie	Number of patients/percentage of patients Liczba chorych/odsetek chorych
Male Mężczyźni	20 (71%)
Female Kobiety	8 (29%)
Tobacco smoker Palący tytoń	22 (79%)
Past smoking Osoby palące w przeszłości	6 (22%)
Current smoking Osoby obecnie palące	16 (57%)
Never smoking Osoby nigdy niepalące	6 (21%)
Arterial hypertension Nadciśnienie tętnicze	22 (79%)
Coronary artery disease Choroba wieńcowa	10 (36%)
Peripheral arterial occlusive disease Miażdżyca tętnic kończyn dolnych	10 (36%)
TIA Objawy przemijającego niedokrwienia mózgu	18 (64%)
Total Cholesterol > 200 mg/dl Cholesterol całkowity > 200 mg/dl	22 (79%)
Triglycerides > 200 mg/dl Trójglicerydy > 200 mg/dl	15 (54%)
Cholesterol HDL < 35 mg/dl Cholesterol frakcji HDL	10 (36%)

was applied. *Chlamydia pneumoniae* Micro-IF test (Lab-systems, Finland) was used according to manufacturer's instructions. Sera analyzed for *Chlamydia 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 [12, 13]:

- chronic (persistent) infection: IgG \geq 1:128, IgA \geq 1:32, IgM = 0;
- exacerbation of chronic infection: IgG \geq 1:512, IgA \geq 1:64, IgM = 0;
- primary acute infection: IgG \geq 1:512, IgM \geq 1:8, IgA = 0;
- contact with the pathogen in the past: IgG < 1:128, IgA \leq 1:8, IgM = 0.

PCR method

DNA was extracted from frozen atherosclerotic plaques using a Qiagen DNA mini-kit according to the manufacturer's instructions. DNA was eluted in a final volume of 100 μ l, aliquoted, and stored at -20°C . For the PCR using CP1-CP2 with nested primer pair CPC-CPD, the conditions were as follows: the first round of ampli-

dań pobierano w dniu poprzedzającym zabieg operacyjny; surowicę przechowywano w temperaturze -20°C do czasu wykonywania odczynu mikroimmunofluorescencji. Białki miażdżycowe, pobrane podczas udrożnienia, przechowywano w temperaturze -70°C do czasu wykonywania badań metodą PCR.

Materiał do badań zbierano od lipca 2001 r. do końca stycznia 2002 roku (tab. 1).

Grupę kontrolną stanowiło 20 osób, zbliżonych pod względem wieku i płci do grupy badanej. U osób z grupy kontrolnej nie stwierdzono objawów chorób układu sercowo-naczyniowego i oddechowego.

Badania serologiczne

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, Lab-systems, Finlandia).

fication employed 1,5 mM MgCl₂, 0,4 μM primers, and 0,625 U of Taq polymerase, 50 Mm KCl, 200 μM dNTP, 10 mM Tris HCl (pH = 8.3) and 2.5 μl sample DNA and involved 20 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 65°C minus 0,5°C per cycle, and 1 min at 72°C plus an additional 20 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 55°C, and 1 min at 72°C. The PCR products amplified by the outer primers (CPI-CP2) were diluted 1:10, and a volume of 2.5 μl was added to a new 25 μl PCR mixture for a second amplification with nested primer pair CPC-CPD. The second round of amplification employed 3 mM MgCl₂, 1 μM primers, and 0.625 U of Taq polymerase, 50 Mm KCl, 200 μM dNTP, 10 mM Tris HCl (pH = 8.3) and involved 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 50°C, and 1 min at 72°C [14]. All amplification products (333 bp and 207 bp) were analyzed by agarose gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining. DNA isolated from the reference strain *Chlamydia pneumoniae* ATCC 1310-VR was used as a positive control.

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using STATISTICA software. Authors started with Shapiro-Wilk's test to evaluate the distribution of variable and t-test was used. A p value < 0.05 was considered as a statistical significance.

Results

Serological markers of persistent *Chlamydia pneumoniae* infection were detected in 22/28 (78.6%) patients and in 6/20 (30%) healthy controls p < 0.05 (Fig 1).

In 8/22 (36.4%) patients high titers of specific antibodies (IgG over 1:512 and IgA over 1:64) indicated reinfection or exacerbation of chronic infection.

6/28 (21.4%) patients had a contact with the pathogen in the past.

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

Chlamydia pneumoniae DNA was present in atherosclerotic plaques in 17 (60.7%) patients. According to serological criteria 2 patients had a contact with the pathogen in the past, 10 had chronic infection, and 5 had an exacerbation of chronic infection (Fig 2).

Discussion

Recognition of atherosclerosis as an inflammatory disease has renewed interest in the role of infectious agents in lesion initiation and progression, that was firstly suggested by Osler early in 20th century [15]. There is an increase in amount of evidence to support an association between *Chlamydia pneumoniae* infection and atherosclerosis.

Zgodnie z danymi z piśmiennictwa zastosowano następujące kryteria serologiczne [12, 13]:

- przewlekłe (przetrwale) zakażenie: IgG ≥ 1:128, IgA ≥ 1:32, IgM = 0;
- zaostrzenie przewlekłego zakażenia: IgG ≥ 1:512, IgA ≥ 1:64, IgM = 0;
- ostre pierwotne zakażenie: IgG ≥ 1:512, IgM ≥ 1:8, IgA = 0;
- kontakt z patogenem: IgG < 1:128, IgA ≤ 1:8, IgM = 0.

Metoda PCR

DNA izolowano z blaszek miażdżycowych, mrożonych dotemperatury -70°C, korzystając z zestawu Qia-gen DNA mini-kit, zgodnie z zaleceniami producenta. DNA eluowano w końcowej objętości 100 μl i przechowywano w temperaturze -20°C. Przeprowadzono nested PCR, używając dwóch par primerów CPI-CP2 i CPC-CPD. Pierwszy cykl amplifikacji przeprowadzono, stosując mieszaninę o objętości 25 μl zawierającą 1,5 mM MgCl₂, 0,4 μM primerów (CPI-CP2), 0,625 U Taq polimerazy, 50 Mm KCl, 200 μM dNTP, 10 mM Tris HCl (pH = 8,3) i 2,5 μl próbki DNA. Próbkę poddano amplifikacji: 20 cykli, stosując profil termiczny 1 min/94°C, 1 min/65°C minus 0,5°C w każdym następnym cyklu i 1 min/72°C oraz kolejne 20 cykli z profilem 1 min/94°C, 1 min/55°C i 1 min/72°C. Produkt zewnętrznych primerów CPI-CP2 rozcieńczano 1:10 i 2,5 μl dodawano do nowej mieszaniny reakcyjnej zawierającej 3 mM MgCl₂, 1 μM primerów (CPC-CPD), 0,625 U Taq polimerazy, 50 Mm KCl, 200 μM dNTP, 10 mM Tris HCl (pH = 8,3) o końcowej objętości 25 μl. Profil termiczny drugiego cyklu amplifikacji był następujący: 30 cykli 1 min/94°C, 1 min/50°C i 1 min/72°C [14]. Wszystkie produkty amplifikacji (333 bp i 207 bp) poddano analizie, stosując elektroforezę w 2-procentowym żelu agarozowym barwionym bromkiem etydy. DNA izolowany ze szczepu wzorcowego *Chlamydia pneumoniae* ATCC 1310-VR stanowił kontrolę dodatnią.

Analiza statystyczna

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

Wyniki

Serologiczne wskaźniki przewlekłego zakażenia *Chlamydia pneumoniae* stwierdzono u 22/28 (78,6%) chorych i u 6/20 (30%) osób z grupy kontrolnej (p < 0,05) (ryc. 1).

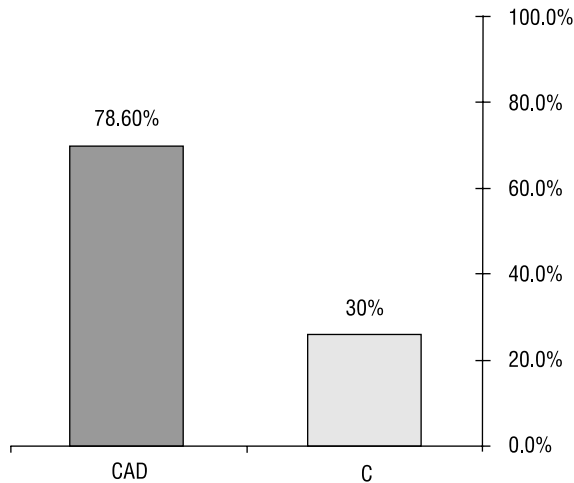


Figure 1. Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection in CAD patients (CAD) and healthy controls (C)

Rycina 1. Przewlekłe zakażenie *Chlamydia pneumoniae* u chorych z miażdżycowym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej (CAD) i u osób z grupy kontrolnej (C)

Seroepidemiological studies of patients with coronary heart disease have shown an association between antibodies to *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. Furthermore, numerous studies involving different detection methods such as PCR, immunohistochemistry, electron microscopy, or in situ hybridization have identified the organism in atherosclerotic lesions of different arterial sites. In addition, recovery of viable *Chlamydia pneumoniae* from atheromata of coronary or carotid arteries has been reported recently [1, 10].

Conflicting studies, however, exist [1, 16–20]. The association of *Chlamydia pneumoniae* with atherosclerosis is controversial. In fact, in the international medical literature the rate of *Chlamydia pneumoniae* detection in arteries (using different methods) varies from 0 to 100% [1].

In our study MIF test and nested PCR method were used to evaluate the frequency of *Chlamydia pneumoniae* infection in CAD patients.

The MIF test is species-specific and allows to detect various immunoglobulin types against *Chlamydia pneumoniae*. A primary *Chlamydia pneumoniae* infection induces IgM and IgG production, whereas in secondary infection IgG and IgA titers 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 *Chlamydia pneumoniae* and the presence of circulating chlamydia-specific immune complexes have been associated with several chronic

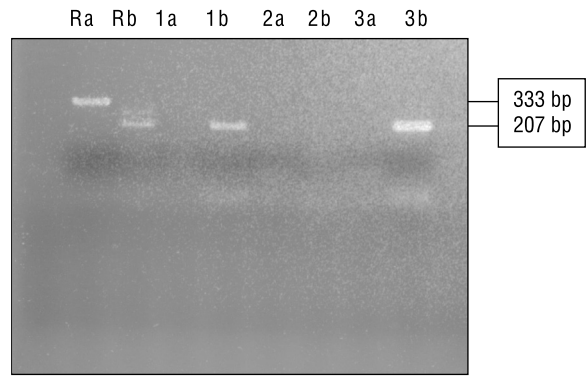


Figure 2. Agarose gel electrophoresis analysis of PCR products; R — reference strain ATCC 1310-VR, a — amplicon size 333 bp (first round of amplification), b — amplicon size 207 bp (second round of amplification), 1–3 — patients' samples

Rycina 2. Analiza produktów amplifikacji w żelu agarozowym, barwionym bromkiem etydyny; R — szczep wzorcowy *Chlamydia pneumoniae* ATCC 1310-VR, a — produkt amplifikacji o wielkości 333 bp (pierwszy cykl amplifikacji), b — produkt amplifikacji o wielkości 207 bp (drugi cykl amplifikacji), 1–3 — próbki badane

U 8 (36,4%) spośród 22 chorych stwierdzono wysokie miana swoistych przeciwciał w klasie IgG (powyżej 1:512) i IgA (powyżej 1:64), wskazujące na reinfekcję lub zaostrzenie przewlekłego zakażenia.

U 6 (21,4%) z 28 chorych stwierdzono serologiczne wskaźniki wskazujące na kontakt z patogenem w przeszłości.

Nie zanotowano obecności ostrego pierwotnego zakażenia u żadnego z badanych (brak swoistych IgM).

DNA *Chlamydia pneumoniae* stwierdzono u 17 (60,7%) chorych. Według kryteriów serologicznych 2 pacjentów miało kontakt z patogenem w przeszłości, u 10 występowało przewlekłe zakażenie, a u 5 — zaostrzenie przewlekłego zakażenia (ryc. 2).

Dyskusja

Uznanie miażdżycy za chorobę zapalną spowodowało wzrost zainteresowania czynnikami zakaźnymi i ich potencjalnym wpływem (sugerowanym przez Oslera na początku XX wieku) na inicjowanie i progresję tej choroby [15].

Wzrastająca liczba danych potwierdza związek zakażenia *Chlamydia pneumoniae* z miażdżycą. W badaniach seroepidemiologicznych przeprowadzonych u osób z chorobą wieńcową wykazano związek między obecnością przeciwciał (skierowanych przeciwko temu drobnoustrojowi) a miażdżycą. W wielu pracach za pomocą różnych metod (PCR, metody immunohistochemiczne, mikroskopia elektronowa, hybrydyzacja *in situ*) wykryto obecność *Chlamydia pneumoniae* w blaszkach miażdżycowych, pobranych z różnych tętnic. Wreszcie

Chlamydia pneumoniae manifestations such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD), sarcoidosis, adult-onset asthma, and coronary heart disease [21].

MIF test has become the serological "golden standard" for diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* infections, being highly specific and sensitive when compared with culture. The MIF test is therefore the technique most widely used, although the results are subject to a wide variety of interpretations because different research groups apply different serological criteria for acute and chronic infection [22]. The criteria according to D. Hahn and L. von Hertzen used in our work were restricted [12, 13]. IgG and IgA titers applied by us for MIF results interpretation were the highest in comparison with the ones used by other authors [22].

In our study 78.6% patients proved to have serological signs of chronic *Chlamydia pneumoniae* infection and 21.4% had a contact with the pathogen in the past. We did not detect specific IgM, present in primary acute infection, in any of our patients.

In the group of patients with chronic infection there were 36.4% who had high titers of specific IgG and IgA, which can indicate recurrent infection or exacerbation of chronic infection. Interestingly, all patients in this group proved to have symptomatic disease and all risk factors of atherosclerosis included in the Table I. Reinfection with *Chlamydia pneumoniae* has been postulated to exacerbate inflammation in atheromatous lesions. The phenomenon of more severe and longer-lasting pathology after repeated infections has also been well established in *Chlamydia trachomatis* animal infection models [23].

In the recent study on the presence of *Chlamydia 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 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 [24].

Katsenis et al. [25] demonstrated recently that patients with advanced atherosclerotic carotid disease had an increased incidence of *Chlamydia 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.

Johnston et al. [26] proved that viable *Chlamydia pneumoniae* are present in a substantial portion of carotid artery atherosclerotic plaques and are associated with increased serum C-reactive protein levels.

All these observations, including ours, confirm the hypothesis that active *Chlamydia pneumoniae* infection

niedawno stwierdzono obecność żywych, namnażających się *Chlamydia pneumoniae* w blaszkach miażdżycowych, pobranych z tętnic wieńcowych i tętnic szyjnych wewnątrznych [1, 10].

Jednak związek między zakażeniem *Chlamydia pneumoniae* a miażdżycą wciąż wzbudza kontrowersje — opublikowano wiele prac, w których nie wykazano takiego związku [1, 16–20]. W międzynarodowym piśmiennictwie poświęconym metodom wykrywania *Chlamydia pneumoniae* w materiale pobranym z naczyń krwionośnych, współczynnik detekcji tego drobnoustroju za pomocą różnych metod wynosi 0–100% [1].

W niniejszej pracy zastosowano odczyn mikroimmunofluorescencji oraz nested PCR do oceny częstości zakażenia *Chlamydia pneumoniae* u chorych z miażdżycowym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej.

Test mikroimmunofluorescencji jest gatunkowo swoisty; pozwala ocenić swoiste przeciwciała w poszczególnych klasach. Pierwotne zakażenie *Chlamydia pneumoniae* wywołuje produkcję przeciwciał w klasie IgM i IgG, natomiast powtórne zakażenie powoduje 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 okresu 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 *Chlamydia pneumoniae* a wieloma przewlekłymi chorobami, takimi jak przewlekła obturacyjna choroba płuc (POChP), sarkoidoza, astma oskrzelowa oraz choroba wieńcowa [21].

Ze względu na wysoką czułość i swoistość w porównaniu z metodami hodowlanymi test mikroimmunofluorescencji uważa się za metodę referencyjną w diagnostyce zakażeń *Chlamydia pneumoniae*. Test ten stosuje się, chociaż jego wyniki interpretuje się w bardzo różny powszechnie sposób, gdyż różne zespoły badawcze przyjmują różne kryteria serologiczne dla ostrego i przewlekłego zakażenia [22]. W niniejszej pracy przyjęto surowe kryteria według D. Hahna i L. von Hertzena [12, 13]. Miana swoistych IgG i IgA, stosowane do interpretacji niniejszych wyników były najwyższe w porównaniu z mianami przyjmowanymi przez innych autorów [22].

W niniejszych badaniach u 78,6% chorych występowały serologiczne wskaźniki wskazujące na przewlekłe zakażenie *Chlamydia pneumoniae*, a 21,4% osób miało kontakt z patogenem w przeszłości. U żadnego z chorych nie wykryto swoistych przeciwciał klasy IgM, charakterystycznych dla ostrego, pierwotnego zakażenia. W grupie cho-

may exacerbate inflammation in atherosclerotic plaques.

PCR seems to be a first-choice method for *Chlamydia pneumoniae* detection in clinical specimens, particularly in chronic infection in which culture lacks necessary sensitivity [27]. However, in the recent multicenter comparison trial on DNA extraction methods and PCR assays for detection of *Chlamydia pneumoniae* in endarterectomy specimens the rate of detection varied from 0 to 100% [28].

We have demonstrated the presence of *Chlamydia pneumoniae* DNA in atherosclerotic plaques taken from carotid arteries from 17 (60.7%) patients using highly sensitive nested PCR. The nested PCR turned out to be more sensitive than the single-step PCR for the detection of *Chlamydia pneumoniae* in atheromatous plaques [10]. While increased sensitivity is an advantage of nested PCR, carryover contamination is a major disadvantage of this method.

Low *Chlamydia pneumoniae* detection rates in PCR methods in some works and the discordance in results obtained by different authors may be due to:

- heterogeneity in the distribution of the organism within plaque specimens [29];
- the presence of PCR inhibitors in the specimens [5];
- methodological problems (lack of standardization of the methods used for detection of *Chlamydia pneumoniae* in vascular tissue) [10, 30];
- geographical differences in the prevalence of infection by *Chlamydia pneumoniae* [1];
- publication bias [1].

Studies using both direct DNA detection in atherosclerotic plaques and indirect serological detection have reported poor concordance between the two methods [5, 16, 24, 30]. There is a suggestion that PCR and serum MIF should not be compared because they probably detect an infection at different stages; PCR may detect cases at an acute stage whereas in chronic cases DNA detection by PCR is probably unsuccessful [31]. According to other studies direct detection of *Chlamydia pneumoniae* antigens and DNA in lesions seems to be more frequent in people with low rather than with high titres of anti-chlamydial antibodies [5]. In our study DNA *Chlamydia pneumoniae* was detected in 2 patients with serological signs of the contact with the pathogen in the past, in 10 — with chronic infection, and in 5 — with exacerbation of chronic infection.

Serologically diagnosed chronic *Chlamydia pneumoniae* infection occurs significantly more frequent in patients with CAD than in healthy controls. Active infection seems to be associated with symptomatic disease. The frequent finding of the organism in atheroma and

rych z przewlekłym zakażeniem 36,4% pacjentów charakteryzowało się wysokimi mianami swoistych IgG i IgA, które mogą wskazywać na reinfekcję lub zaostrzenie przewlekłego zakażenia. U wszystkich chorych w tej grupie występowały objawy przemijającego niedokrwienia mózgu oraz obecne były wszystkie analizowane przez autorów niniejszej pracy czynniki ryzyka miażdżycy (tab. I).

Uważa się, że reinfekcja wywołana przez *Chlamydia pneumoniae*, zaostrza stan zapalny w zmianach miażdżycowych. Na modelach zwierzęcych zakażenia *Chlamydia trachomatis* wykazano, że nawracające zakażenia wywołują bardziej nasilone i długotrwałe zmiany zapalne [23].

LaBiche i wsp. [24] w niedawno prowadzonych badaniach nad obecnością *Chlamydia pneumoniae* w blaszkach miażdżycowych u chorych ze zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej stwierdzili związek wysokich mian swoistych IgA z występowaniem objawów przejściowego niedokrwienia mózgu. Autorzy tej pracy sugerują, że zakażenie *Chlamydia pneumoniae* może odgrywać rolę w destabilizacji blaszki miażdżycowej. Sądzą również, że oznaczanie miana swoistych IgA może być użyteczne w identyfikowaniu chorych z wysokim ryzykiem wystąpienia udaru mózgu w przyszłych badaniach prewencyjnych [24].

Katsenis i wsp. [25] na podstawie badań serologicznych i PCR wykazali większą częstość występowania zakażenia *Chlamydia pneumoniae* u chorych z zaawansowanym miażdżycowym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej. Zespół ten sugeruje również, że aktywne zakażenie może być odpowiedzialne za niestabilność blaszki miażdżycowej, a tym samym za wystąpienie objawów przemijającego niedokrwienia mózgu.

Johnston i wsp. [26] wykazali, że żywe *Chlamydia pneumoniae* występują w znaczącej liczbie blaszek miażdżycowych, zlokalizowanych w obrębie tętnic szyjnych wewnętrznych oraz że ich obecność wiąże się z podwyższonym stężeniem białka C-reaktywnego w surowicy chorych.

Wszystkie cytowane prace, łącznie z niniejszym artykułem, potwierdzają tezę, że aktywne zakażenie *Chlamydia pneumoniae* może nasilać stan zapalny w blaszce miażdżycowej.

Metodę PCR uważano początkowo za idealny sposób wykrywania *Chlamydia pneumoniae* w materiale klinicznym, szczególnie w przypadkach przewlekłych zakażeń, w których metody hodowlane nie są wystarczająco czułe [27]. Jednak w niedawno przeprowadzonych wielośrodkowych badaniach porównawczych, dotyczących metod izolacji DNA i procedur PCR używanych do wykrywania *Chlamydia pneumoniae* w materiale pochodzącym z endarterektomii, odsetek detekcji *Chlamydia pneumoniae* wynosił 0–100% [28].

not in normal artery tissue by several methods and many investigators suggests that *Chlamydia pneumoniae* may play a role in atherogenesis. However, an association does not mean causality. The causal relation between *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis is yet to be demonstrated. The importance of defining the role of *Chlamydia 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 *Chlamydia pneumoniae* infection occur statistically more frequent in CAD patients in comparison with healthy controls ($p < 0.05$).
2. Active *Chlamydia pneumoniae* infection is associated with symptoms of transient ischemic attacks (TIA).
3. There is an urgent need of standardization of PCR methods detecting DNA *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic plaques.

References

1. 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: 124–128.
2. Ross R (1999) Atherosclerosis. An inflammatory disease. *New Engl J Med*, 340: 115–126.
3. Mayr M, Kiechl S, Willeit J et al. (2000) Infections, immunity, and atherosclerosis. Associations of antibodies to *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, and cytomegalovirus with immune reactions to heat-shock protein 60 and carotid or femoral atherosclerosis. *Circulation* 102: 833–839.
4. Grayston JT, Kuo CC, Coulson AS et al. (1995) *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) in atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation* 92: 3397–3400.
5. 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: 634–639.
6. 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: 9–15.
7. Wimmer MLJ, Sandmann-Strupp R, Saikku P et al. (1996) Association of chlamydial infection with cerebrovascular disease. *Stroke*, 27: 2207–2210.
8. Miyashita N, Toyota E, Sawayama T et al. (1998) Association of chronic infection of *Chlamydia pneumoniae* and coronary heart disease in the Japanese. *Inter Med*, 37: 913–916.
9. Grayston JT (2000) *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) and coronary heart disease: from hypothesis to treatment. In: Saikku P. ed. *Proceedings Fourth Meeting of the European Society for Chlamydia Research*, August 20–23, Helsinki, Finland, 380–383.
10. Jantos ChA, Nessler A, Waas W et al. (1999) Low prevalence of *Chlamydia pneumoniae* in atherectomy specimens from patients with coronary heart disease. *CID*, 28: 988–992.

Autorzy niniejszej pracy stwierdzili obecność DNA *Chlamydia pneumoniae* w blaszkach miażdżycowych pobranych z tętnic szyjnych wewnętrznych od 17 (60,7%) chorych, korzystając z bardzo czułej metody nested PCR. Technika ta okazała się znacznie bardziej czuła niż klasyczne, jednoetapowe PCR do wykrywania *Chlamydia pneumoniae* w zmianach miażdżycowych [10]. O ile jednak wyższa czułość jest zaletą nested PCR, możliwość przeniesienia zanieczyszczenia materiału do kolejnych etapów badania jest istotną wadą tej metody.

Opisany w niektórych pracach niski współczynnik detekcji *Chlamydia pneumoniae* metodami PCR oraz rozbieżność wyników otrzymanych przez różnych autorów mogą być spowodowane:

- nierównomiernym rozmieszczeniem patogenu w obrębie blaszki miażdżycowej [29];
- obecnością inhibitorów PCR w materiale pobranym do badania [5];
- różnicami metodologicznymi (brak standaryzacji metod używanych do wykrywania *Chlamydia pneumoniae* w tkance naczyń) [10, 30];
- zróżnicowaniem geograficznym w występowaniu zakażeń *Chlamydia pneumoniae* [1];
- tendencyjnością niektórych publikacji [1].

W pracach, w których stosowano zarówno bezpośrednią detekcję patogenu w blaszkach miażdżycowych techniką PCR, jak i pośrednią metodę mikroimmunofluorescencji zaobserwowano niewielką zgodność obu metod [5, 16, 24, 30].

Autorzy niektórych prac uważają, że nie powinno się porównywać PCR i mikroimmunofluorescencji, ponieważ prawdopodobnie wykrywają one zakażenie w różnych stadiach — PCR pozwala wykryć ostre zakażenie, podczas gdy w przypadku przewlekłego zakażenia metoda ta jest nieskuteczna [31]. Natomiast autorzy innych prac twierdzą, że antygen i DNA *Chlamydia pneumoniae* w zmianach miażdżycowych częściej wykrywa się u osób z niskimi niż z wysokimi mianami swoistych przeciwciał [5]. W badaniach przeprowadzonych przez autorów niniejszej pracy DNA *Chlamydia pneumoniae* wykryto u 2 chorych z serologicznymi markerami kontaktu z patogenem w przeszłości, u 10 z przewlekłym zakażeniem i u 5 osób z zaostrzeniem przewlekłego zakażenia.

Przewlekłe zakażenie *Chlamydia pneumoniae*, stwierdzone na podstawie badań serologicznych, występuje statystycznie częściej u pacjentów z miażdżycowym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej niż w grupie kontrolnej. Aktywne zakażenie wiąże się z występowaniem objawów przemijającego niedokrwienia mózgu. W wielu badaniach wykryto *Chlamydia pneumoniae* w blaszce miażdżycowej, nie stwierdzono natomiast obecności tego drobnoustroju w otaczającej

11. Byrne GI (2000) *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis: pathogenic mechanisms. In: Saikku P. ed. Proceedings Fourth Meeting of the European Society for Chlamydia Research, August 20–23, Helsinki, Finland, 376–379.
12. Hahn DL, Bukstein D, Luskin A et al. (1998) Evidence for *Chlamydia pneumoniae* infection in steroid-dependent asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 80: 45–49.
13. 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: 227–234.
14. Mahony JB, Chong S, Coombes BK et al. (2000) Analytical sensitivity, reproducibility of results, and clinical performance of five PCR assays for detecting *Chlamydia pneumoniae* DNA in peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Microbiol*, 38: 2622–2627.
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): 319–327.
16. Ong GM, Coyle PV, Barros D'Sa AA et al. (2001) Non-detection of *Chlamydia* species in carotid atheroma using generic primers by nested PCR in a population with a high prevalence of *Chlamydia pneumoniae* antibody. *BMC Infect Dis*, 1 (1): 12.
17. Coles KA, Plant AJ, Riley TV et al. (1999) Lack of association between seropositivity to *Chlamydia pneumoniae* and carotid atherosclerosis. *Am J Cardiol*, 84 (7): 825–828.
18. Medrano V, Castano MD, Andreu M et al. (2000) The relation between carotid ultrasound changes and seropositivity to *Chlamydia pneumoniae* in patients with acute stroke. *Rev Neurol*, 31 (10): 932–936.
19. Valassina M, Migliorini L, Sansoni A et al. (2001) Search for *Chlamydia pneumoniae* genes and their expression in atherosclerotic plaques of carotid arteries. *J Med Microbiol*, 50 (3): 228–232.
20. Meijer A, Roholl PJ, Gielis-Proper SK et al. (2000) *Chlamydia pneumoniae* antigens, rather than viable bacteria, persist in atherosclerotic lesions. *J Clin Pathol*, 53 (12): 911–916.
21. 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): 2196–2199.
22. Orfila JJ, (1998) Seroepidemiological evidence for an association between *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 140, Suppl. 1: S11–S15.
23. Penttilä JM, Anttila M, Puolakkainen M et al. (1998) Local immune responses to *Chlamydia pneumoniae* in the lungs of BALB/c mice during primary infection and reinfection. *Infect Immun*, 66 (11): 5113–5118.
24. LaBiche R, Koziol D, Quinn TC et al. (2001) Presence of *Chlamydia pneumoniae* in human symptomatic and asymptomatic carotid atherosclerotic plaque. *Stroke*, 32 (4): 855–860.

zmianę miażdżycową zdrowej tkance, co sugeruje, że *Chlamydia pneumoniae* może uczestniczyć w aterogenezie. Jednak sama obecność drobnoustroju w zmienionej tkance nie oznacza jego roli przyczynowej. Jak dotąd nie dowiedziono przyczynowo-skutkowego związku między *Chlamydia pneumoniae* a miażdżycą. Zdefiniowanie roli *Chlamydia pneumoniae* w aterogenezie ma ogromne znaczenie, ponieważ może zasadniczo zmienić rozumienie miażdżycy oraz jej leczenie.

Wnioski

1. Serologiczne wskaźniki przewlekłego zakażenia *Chlamydia pneumoniae* występują statystycznie częściej u chorych z miażdżycowym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej niż u osób z grupy kontrolnej.
 2. Aktywne zakażenie *Chlamydia pneumoniae* wiąże się z występowaniem objawów przemijającego niedokrwienia mózgu.
 3. Konieczna jest standaryzacja metod PCR służących do wykrywania DNA *Chlamydia pneumoniae* w blaszkach miażdżycowych.
-
25. Katsenis C, Kouskouni E, Kolokotronis L et al. (2001) The significance of *Chlamydia pneumoniae* in symptomatic carotid stenosis. *Angiology*, 52 (9): 615–619.
 26. Johnston SC, Messina LM, Browner WS et al. (2001) C-reactive protein levels and viable *Chlamydia pneumoniae* in carotid artery atherosclerosis. *Stroke*, 32 (12): 2748–2752.
 27. Blasi F, Denti F, Erba M et al. (1996) Detection of *Chlamydia pneumoniae* but not *Helicobacter pylori* in atherosclerotic plaques of aortic aneurysms. *J Clin Microbiol*, 34 (11): 2766–2769.
 28. Apfalter P, Blasi F, Boman J et al. (2001) Multicenter comparison trial of DNA extraction methods and PCR assays for detection of *Chlamydia pneumoniae* in endarterectomy specimens. *J Clin Microbiol*, 39 (2): 519–524.
 29. Jackson LA, Campbell LA, Kuo CC et al. (1997) Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from a carotid endarterectomy specimen. *JID*, 176: 292–295.
 30. Maass M, Jahn J, Gieffers J et al. (2000) Detection of *Chlamydia pneumoniae* within peripheral blood monocytes of patients with unstable angina or myocardial infarction. *JID*, 181, Suppl. 3: S449–S451.
 31. Herten von L, Alakärppä H, Koskinen R et al. (1997) *Chlamydia pneumoniae* infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Epidemiol Infect*, 118: 155–164.