

Relación entre la enfermedad arterial periférica oclusiva y la infección por *Chlamydomphila pneumoniae*



José Gutiérrez^a, José Linares^{b,c}, Fernando Fernández^a, Eduardo Ros^{b,c}, Juan de Dios Luna^d, Joaquín Mendoza^e, María José Soto^a, Cristina López^f y Carmen Maroto^{a,c}

^aDepartamento de Microbiología. Universidad de Granada.

^bDepartamento de Cirugía. Universidad de Granada.

^cHospital Universitario San Cecilio.

^dDepartamento de Estadística. Universidad de Granada.

^eLaboratorio Vircell.

^fHospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada. España.

FUNDAMENTO Y OBJETIVO: Estudiar la relación entre la enfermedad arterial periférica oclusiva y la infección por *Chlamydomphila pneumoniae* a través del estudio de muestras clínicas de 95 enfermos (casos) y 100 controles.

PACIENTES Y MÉTODO: Se investigaron mediante enzoinmunoanálisis las inmunoglobulinas (Ig G y A frente al lipopolisacárido (LPS) y antígenos específicos de *C. pneumoniae* presentes en cuerpos elementales (CE) purificados; mediante microinmunofluorescencia la IgG anti-CE; mediante reacción en cadena de la polimerasa semianidada, el ADN de *C. pneumoniae* en biopsias arteriales y leucocitos de sangre periférica; mediante enzoinmunoanálisis el LPS, y la recuperación de la bacteria en células Hep-2 desde biopsias arteriales.

RESULTADOS: Los valores obtenidos para la IgG anti-LPS en los grupos de casos y controles fueron del 21 y el 14%, respectivamente, sin diferencias significativas; tampoco la hubo para la IgA (el 22 y el 21%, respectivamente). Sí se encontraron diferencias para la IgG anti-CE entre los casos (el 74 y el 72%, para el enzoinmunoanálisis y la microinmunofluorescencia, respectivamente) y los controles (el 31 y el 34%). No hubo diferencias para la IgA anti-CE. El ADN de la bacteria se detectó en el 67% de las placas de ateroma (casos) y en el 12% de las arterias pudendas (controles) ($p = 0,0001$). No se detectaron ADN y LPS de *C. pneumoniae* en los leucocitos de biopsias arteriales, respectivamente. No se pudo recuperar la bacteria mediante cultivo en el grupo de casos.

CONCLUSIONES: Nuestros resultados asocian de manera significativa la enfermedad arterial periférica oclusiva con la infección por *C. pneumoniae* a través de la presencia de la IgG anti-CE en suero y el ADN de la bacteria en biopsia arterial.

Palabras clave: Enfermedad arterial periférica oclusiva. Arteriosclerosis. *Chlamydomphila pneumoniae*.

Relationship between the peripheral arterial occlusive disease and the infection by *Chlamydomphila pneumoniae*

BACKGROUND AND OBJECTIVE: The relationship between peripheral arterial occlusive disease (PAOD) and *Chlamydomphila pneumoniae* infection was studied by analyzing clinical samples from 95 patients with PAOD (cases) and 100 controls.

PATIENTS AND METHOD: The following investigations were conducted: IgG and IgA against lipopolysaccharide (LPS) and against purified *C. pneumoniae*-specific antigens from elementary bodies (EB) with ELISA; anti-EB IgG, with MIF; *C. pneumoniae* DNA in arterial biopsy and peripheral blood leukocyte cells (PBLCs) with heminested PCR; LPS with ELISA; and bacteria culture in Hep-2 cells from arterial biopsy.

RESULTS: The percentage of positive results in cases and controls groups for anti-LPS IgG was: 21% and 14%, respectively, with no differences; nor were there any differences with IgA (22 and 21%, respectively). However, differences were seen in the anti-EB IgG between cases (74% and 72%, for ELISA and MIF, respectively) and controls (31% and 34%). There were no differences in anti-EB IgA. Bacterial DNA was detected in 67% of atheromatous plaques (cases) vs. 12% of pudendal arteries (controls) ($p = 0.0001$). No *C. pneumoniae* DNA and LPS was detected in PBLCs and biopsy samples, respectively; and no *C. pneumoniae* strain could be recovered by cell culture from cases.

CONCLUSIONS: On the basis of our results, PAOD is significantly associated with *C. pneumoniae* infection through the detection of anti-EB IgG from serum and bacterial DNA from arterial biopsy.

Key words: Peripheral arterial occlusive disease. Atherosclerosis. *Chlamydomphila pneumoniae*.

Este estudio ha estado financiado en parte por las ayudas procedentes de la Consejería de Educación y Ciencia de la Junta de Andalucía (grupo de investigación CTS 521 para el «Estudio de los agentes infecciosos relacionados con procesos clínicos de causa desconocida»), la Universidad de Granada (proyecto «Detección de *Chlamydomphila pneumoniae* en la arteriopatía periférica. El papel del leucocito») y los laboratorios Vitro S.A. (protocolo de evaluación del reactivo *Chlamydia* IgA, IgG e IgM. Medac, Alemania) y Abbot-Pensa (proyecto «La arteriosclerosis como enfermedad infecciosa crónica. Detección de *Chlamydia pneumoniae* como patógeno responsable y respuesta al tratamiento con claritromicina»).

Correspondencia: Prof. J. Gutiérrez.
Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad de Granada.
Avda. de Madrid, 11. 18012 Granada. España.
Correo electrónico: josegf@ugr.es

Recibido el 21-1-2004; aceptado para su publicación el 20-4-2004.

Los factores de riesgo clásicos para la arteriosclerosis sólo explican el 60% de los casos. Agentes tales como *Chlamydomphila pneumoniae* se han asociado recientemente con la enfermedad¹. Éste es un patógeno respiratorio² que se puede diseminar a lo largo del organismo desde esta localización mediante los monocitos³. La relación entre la infección por *C. pneumoniae* y la arteriosclerosis se ha analizado mediante estudios observacionales y experimentales. Desde 1988, más de 70 estudios prospectivos y de cohortes que han utilizado muestras de suero han relacionado los anticuerpos anti-*Chlamydia pneumoniae* con la arteriosclerosis. Estos trabajos demuestran títulos elevados de anticuerpos y complejos inmunitarios con lipopolisacárido (LPS)^{4,5} en pacientes con arteriosclerosis sintomática, con o sin tratamiento quirúrgico previo⁶. También se han publicado estudios que muestran resultados contrarios⁷⁻⁹. Más de 50 estudios han detectado la presencia de la bacteria en tejido arteriosclerótico, aunque los intervalos de positividad han sido muy diferentes¹. Por el contrario, algunos autores no han detectado ADN de la bacteria o no la han recuperado mediante cultivo celular^{9,12}. Asimismo, se ha encontrado el ADN en leucocitos de sangre periférica, lo que puede explicar su diseminación desde los pulmones al tejido vascular^{3,13}. Los estudios en animales han confirmado esto último y pueden explicar la participación de la bacteria en el inicio o en el desarrollo de la arteriosclerosis^{14,15}. Se han puesto en marcha varios ensayos clínicos (ACADEMIC, WIZARD y ACES, entre otros) para conocer el valor del uso de los antibióticos en la prevención de las complicaciones secundarias de la placa de ateroma asociada con esta infección¹⁶⁻¹⁸. No obstante, a pesar de todo lo investigado, la mayor parte de los trabajos anteriores estudian la asociación entre la infección por *C. pneumoniae* y la arteriosclerosis de las arterias coronarias usando parámetros aislados que no permiten la obtención de conclusiones definitivas que puedan aplicarse en el caso de la enfermedad arterial periférica oclusiva (EAPO). Por estas razones,

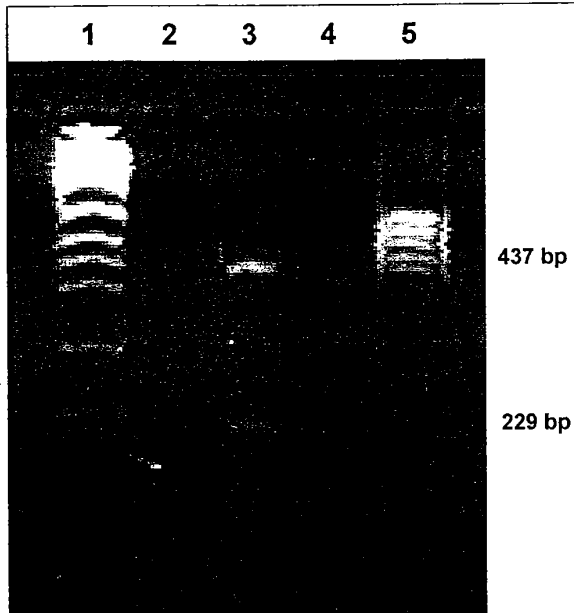


Fig. 1. Visualización en gel de agarosa de la amplificación del ADN de *C. pneumoniae*.
Columna 1: Pm 154-2.176 pb, columna 2: control negativo; columna 3: control positivo; columna 4: muestra negativa; columna 5: Pm 8-578 pb.

hemos estudiado estos parámetros simultáneos para conocer la posible relación que existe entre este proceso clínico y la infección por esta bacteria, a través del estudio de los anticuerpos específicos, antígenos y ADN, y su cultivo en líneas celulares. El estudio de todos estos parámetros permitirá conocer mejor la participación de la infección en la génesis de la placa de ateroma de la EAPO.

Pacientes y método

Se utilizó un diseño de casos y controles, siendo considerados los primeros (pacientes con EAPO) potencialmente susceptibles de estar infectados por la bacteria. Todos los sujetos carecían de procesos clínicos autoinmunitarios, pulmonares, genitales o infecciosos e inflamatorios en el momento de ser estudiados en el Hospital Universitario San Cecilio de Granada. El grupo de casos estaba constituido por 95 pacientes consecutivos (70 varones y 25 mujeres), con una media (desviación estándar) de edad de 66 (8) años (tabla 1), con EAPO (diagnosticada por electrocardiograma basal, eco-Doppler y manifestaciones clínicas compatibles con criterios de claudicación intermitente en estadio III de Fontaine)¹⁹, que precisaron cirugía revascularizadora. Este grupo incluyó a 41 sujetos con estenosis grave de carótida, a 18 con enfermedad oclusiva de aorta abdominal infrarrenal o ilíaca, a

20 con enfermedad oclusiva femoropoplítea y a 16 con aneurisma de aorta abdominal infrarrenal de más de 5 cm de diámetro. A partir de ellos se obtuvieron muestras de suero y tejido vascular arteriosclerótico y en 15 pacientes, además, los leucocitos de sangre periférica. Las muestras clínicas se recogieron entre enero y junio de 2002. Solamente 4 pacientes se negaron a participar en este estudio. El grupo de controles estaba constituido por 100 pacientes (80 varones y 20 mujeres), con una edad media (DE) de 60 (3) años (tabla 1) reclutados entre los que se sometían a cirugía por insuficiencia venosa crónica de grados C2 o C3 de la clasificación CEAP, consistente en safenectomía bajo anestesia regional o general. Previamente se sometió a todos ellos a estudio general en el Departamento de Anestesia mediante electrocardiograma, radiografía de tórax y análisis hematológico y bioquímico. Todos los controles tenían un riesgo anestésico ASA I o II y se excluyó a aquellos con enfermedad coronaria o renal. Simultáneamente se sometió a estos sujetos a exploración circulatoria para confirmar la presencia de pulsos distales, pedio o tibial posterior. Mediante eco-Doppler carotídeo la estenosis fue inferior al 20%. Este grupo fue seleccionado después de conocer en los casos la edad, el sexo, el consumo de tabaco y el número de sujetos por encima de los 60 años. En 50 de los controles, en el curso de la cirugía de varices se obtuvo 1 cm de la arteria pudenda externa y de la vena safena varicosa. Finalmente, se obtuvo una muestra de suero de todos los sujetos. Las muestras clínicas se recogieron entre septiembre de 2002 y enero de 2003. En este grupo, 15 pacientes se negaron a participar.

TABLA 1

Características clínicas de los 95 sujetos con enfermedad arterial periférica oclusiva (casos) y los 100 sujetos controles

	Casos (n = 95)	Controles (n = 100)	p
Edad media (DE), años	66 (8)	60 (3)	< 0,0001 ^a
Mayores de 59 años (primer cuartil)	84,4%	76%	0,261 ^b
Varones	73,7%	80%	0,967 ^b
Fumadores (antes o actualmente)	71,9%	60%	0,182 ^b
Diabetes mellitus	31,3%	4%	< 0,0001 ^c
Hipertensión	53,1%	8%	< 0,0001 ^b
Hipercolesterolemia	29,7%	4%	< 0,0001 ^c
Hipertrigliceridemia	28,1%	8%	0,007 ^b
Obesidad	26,6%	28,2%	0,864 ^b

DE: desviación estándar. ^aPrueba de la t de Student; ^bprueba de la χ^2 ; ^ctest de Fisher.

Hubo un total cegamiento en el procesado y análisis retrospectivo de todas las muestras estudiadas. En todos los sujetos se determinó la inmunoglobulina (Ig) G anticuerpo elemental (CE) mediante microinmunofluorescencia (MIF), además de la IgG e IgA anti-CE y anti-LPS mediante enzimoimmunoanálisis. La investigación del ADN de *C. pneumoniae* se realizó en 180 biopsias vasculares (80 casos y 50 controles), así como en los leucocitos de sangre periférica de 15 casos. El LPS de *Chlamydiaceae* y la recuperación de la bacteria en células Hep-2 se investigó en las biopsias de los 80 casos anteriores.

Las biopsias se lavaron con suero fisiológico para eliminar los restos de sangre y se colocaron en medio SPG-2. Se mantuvieron a 4 °C hasta su recogida (un máximo de 4 h) o se congelaron inmediatamente a -20 °C durante 12 a 16 h y luego a -80 °C hasta su posterior procesamiento. Los leucocitos se conservaron de igual forma después de su separación de los otros componentes de la sangre. Las muestras de suero se congelaron a -20 °C hasta su posterior análisis.

El Comité Ético del hospital aprobó el estudio y todos los sujetos firmaron su consentimiento informado.

Se consideraron en el estudio los siguientes datos analíticos y clínicos: sexo, exposición al tabaco, obesidad (superior al 30% del peso teórico), presión arterial sistólica, hipertensión, concentración plasmática de colesterol, hipercolesterolemia, concentración plasmática de triglicéridos e hipertrigliceridemia. Los fumadores actuales y los ex fumadores que habían fumado más de 10 años se consideraron expuestos al tabaco.

Se determinaron los valores de fibrinógeno (P-T Fibrinogen HS, Italia) antes de la cirugía, así como el título de IgG anti-CE mediante MIF (*C. pneumoniae*, MRL Diagnostics, EE.UU.)²⁰. Se consideraron positivos títulos de la muestra iguales o superiores a 1/32. Las muestras se estudiaron por duplicado para confirmar la validez de los resultados. La lectura (microscopio de fluorescencia Olympus BX40F4, Japón, a x400) e interpretación de los resultados de los portales las realizó un solo investigador con experiencia.

Para la determinación de IgG e IgA anti-CE se usó un enzimoimmunoanálisis comercial que emplea un complejo de membrana externa de *Chlamydia* (*C. pneumoniae* IgG, Vircell, España)²¹. Para ello, la cepa de *C. pneumoniae* 2023 (ATCC 1356 VR) creció en células Hep2 con 1 µg/ml de cicloheximida. El antígeno se obtuvo a partir de CE purificados por tratamiento con 10 mmol de fosfato sódico con sarcosil al 2%, 1,5 mmol de ácido etilendiaminotetraacético y 0,14 mmol de NaCl. Placas de 96 pocillos (Nunc Maxisorb, Dinamarca) se recubrieron con el antígeno anterior (0,2 µg/pocillo) en 8,5 mmol de PBS. Se dispensaron en cada pocillo 100 µl del suero diluido a 1/20 y se incubó a 37 °C durante 45 min. En el caso de la IgA la muestra se diluyó con anti-IgG (Dade-Behring Diagnostics Inc., Alemania). En un segundo paso, se añadieron 100 µl de una anti-IgG o anti-IgA humana conjugada con peroxidasa y se incubó a 37 °C durante 30 min. Como sustrato se usaron 100 µl de tetrametilbencidina y la reacción se detuvo tras 20 min con 50 µl de ácido sulfúrico (0,5 mol). Las absorbancias se midieron a 450/620 nm.

La determinación de IgG e IgA anti-LPS se realizó también mediante enzimoimmunoanálisis (Chlamydien-ELISA, Medac, Alemania). Como antígeno se empleó un fragmento específico del LPS de clamidias, químicamente definido, fijado a pocillos de una placa de microtitulación (Nunc Maxisorb). Los sueros se diluyeron a 1/100 y se añadieron 50 µl por pocillo (por duplicado). Tras 60 min de incubación a 37 °C, se añadieron 50 µl de IgG de cabra, anti-IgG o anti-IgA humana según fuera el análisis, conjugada con peroxidasa, y se incubó durante 60 min. A continuación, se añadieron a cada pocillo 50 µl de ABTS/H₂O₂ y se dejó incubar 30 min. Finalmente, se detuvo la reacción con 0,5 mol de H₂SO₄ y se leyó mediante espectrofotómetro a una longitud de onda de 450/620 nm. Todos los ensayos incluyeron controles positivos, positivos límite (por duplicado) y negativos. Los resultados de las 4 pruebas anteriores se expresaron como índices, dividiendo la absorbancia de la muestra por la del positivo límite. Los índices inferiores a 0,9 se consideraron negativos; de 0,9 a 1,1, dudosos, y mayores de 1,1, positivos. Las muestras con un resultado dudoso se repitieron y el nuevo valor se consideró definitivo en caso de ser positivo o negativo. Si se obtenía de nuevo dudoso, entonces se excluyó. Para

mayor precisión de los resultados obtenidos, se automatizó el proceso con la ayuda de un diluidor de muestras de suero (Tecan Megaflex, Austria) y un procesador de placas de enzimoimmunoanálisis (DadeBehring, BEP III, Alemania). Antes de la evaluación de los resultados el 10% de las muestras se analizó de nuevo y se obtuvo el mismo resultado.

Para la detección del ADN de *C. pneumoniae* en biopsias vasculares se siguió una técnica que es una modificación de nuestro grupo de trabajo²² de la inicialmente descrita por Campbell et al.²³. Las muestras se homogeneizaron con tampón de lisis celular y de ellas se extrajo el ADN por digestión enzimática con proteinasa K. La cantidad de ADN se homogeneizó entre 50 y 100 ng/ml. La primera reacción en cadena de la polimerasa se realizó con los cebadores HL1: GTTGT-CATGA-AGGCCTACT, y HR1: TGCATAACCTACGGTGTGTT (TIB MolBiol, Alemania), usando un termociclador Eppendorf Mastercycler, que produjo un fragmento de 437 pares de bases. Sobre este producto se realizó una segunda reacción en cadena de la polimerasa, utilizando de nuevo el cebador HR1 y el HM1: GTGCATTGCGC-CAAGGTAA (TIB MolBiol). El resultado de esta segunda amplificación produjo un fragmento de 229 pares de bases. La lectura se hizo mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio. Como control interno de amplificación y de extracción del ADN se utilizaron cebadores para el gen de la betaactina (fig. 1). En el procedimiento se siguieron medidas estrictas para evitar la contaminación²⁴.

Para la detección del ADN de *C. pneumoniae* en leucocitos de sangre periférica, éstos fueron previamente separados²⁵ y para la detección del ADN se utilizó el mismo método que en las biopsias, salvo que no se empleó el tampón de lisis para la extracción del ADN. La investigación del LPS de *Chlamydiaceae* en placas de ateroma se realizó mediante una prueba de enzimoimmunoanálisis (MicroTrack II, DadeBehring Diagnostics Inc.) previamente descrita²⁶. En ella las muestras y los controles se trataron inicialmente con tampón de extracción a temperatura ambiente durante 2 h para facilitar la liberación del LPS. No se aportan los resultados de la validación de esta prueba en muestras de biopsia arterial.

Para el cultivo celular de *C. pneumoniae* en placas de ateroma se utilizó el método de centrifugación y cultivo propuesto por Maass y Harig²⁷, con algunas modificaciones. Para ello se cultivaron 3 muestras de cada sujeto de maneras diferentes: una se incubó durante 96 h a 37 °C; otra se centrifugó 3 veces a días alternos (durante 45 min a 800 g), cambiando el medio de cultivo tras cada centrifugación, y la tercera se subcultivó 11 veces. Las monocapas de células inoculadas se observaron mediante MIF directa con anticuerpos monoclonales de ratón anti-LPS (IMAGEN Chlamydia, DAKO, Alemania).

Análisis estadístico

La hipótesis nula de este estudio estuvo representada por la demostración de que la infección por *C. pneumoniae* no se relaciona con la presencia de la EAPO. El tratamiento estadístico se llevó a cabo mediante el programa SPSS versión 11.5.1 (SPSS Inc., 1989-2002). El análisis de regresión logística exacta, para conocer la participación de la bacteria en la presencia de la placa de ateroma, se realizó mediante el programa LogXact (Civile Software Corporation, version 2.1, 1996). La prueba de Hosmer-Lemeshow se usó para ajustar el modelo. El grado de correlación entre variables se analizó mediante la *r* de Pearson. La comparación de las variables continuas entre enfermos y controles se realizó mediante la prueba de la *t* de Student. Las variables discretas se analizaron mediante la prueba de Fischer bilateral exacta y de la χ^2 . La capacidad de los anticuerpos anti-*C. pneumoniae* para predecir la infección de la placa de ateroma se determinó mediante el cálculo de los valores predictivos sobre el número de biopsias analizadas de casos y controles.

Resultados

Se obtuvieron muestras adecuadas para el análisis a partir de 195 sujetos que participaron en el estudio, sin pérdida accidental o destrucción.

TABLA 2

Regresión logística

Variables	Significación	OR	IC del 95% para OR	
Casos/controles	0,000	18,055	4,260	76,527
Varón	0,410	1,844	0,430	7,901
> 62 años	0,462	0,654	0,212	2,025
Fumador	0,944	1,044	0,315	3,464
Hipercolesterolemia	0,417	1,675	0,482	5,828
Hipertrigliceridemia	0,586	0,698	0,191	2,549
Hipertensión	0,233	0,483	0,146	1,596
Diabetes mellitus	0,942	0,954	0,264	3,441
Obesidad	0,758	1,185	0,401	3,500

IC: intervalo de confianza; OR: odds ratio.

TABLA 3

Muestras con resultados positivos en las pruebas para detección de anticuerpos en los diferentes grupos estudiados

	Grupos (muestras)	
	N.º de muestras positivas (%) en los casos (n = 95)	N.º de muestras positivas (%) en controles (n = 100)
IgG anti-CE (microimmunofluorescencia)	68 (71,6)	34 (34)
IgG anti-CE (enzimoimmunoanálisis)	70 (73,7)	31 (31)
IgA anti-CE (enzimoimmunoanálisis)	11 (11,6)	11 (11)
IgG anti-LPS (enzimoimmunoanálisis)	10 (21,1)	14 (14)
IgA anti-LPS (enzimoimmunoanálisis)	21 (22,1)	21 (21)

Ig: inmunoglobulina; casos: enfermedad arterial periférica oclusiva; CE: cuerpo elemental de *C. pneumoniae*; LPS: lipopolisacárido.

TABLA 4

Distribución de los resultados con las diferentes pruebas para detectar los anticuerpos según los subgrupos de sujetos con enfermedad arterial periférica oclusiva

		Aneurisma (%)	Aórtica (%)	Femoral (%)	Carótida (%)	p (χ^2)
Microimmunofluorescencia	IgG anti-CE	62,5	77,8	90	69,2	0,240
Enzimoimmunoanálisis	IgG anti-CE	62,5	61,1	85	76,9	0,227
Enzimoimmunoanálisis	IgA anti-CE	6,7	11,1	0	15,0	0,142
Enzimoimmunoanálisis	IgG anti-LPS	25	22,2	25	7,7	0,369
Enzimoimmunoanálisis	IgA anti-LPS	18,8	22,2	30	19,2	0,817
ADN	Positivo	56,3	66,7	65	69,2	0,954

Ig: inmunoglobulina; CE: cuerpo elemental de *C. pneumoniae*; LPS: lipopolisacárido.

Las características clínicas de los sujetos se reflejan en la tabla 1. No hubo diferencias significativas en la distribución de edad por encima del percentil 25, sexo y exposición al tabaco entre los 2 grupos. La edad media de los casos fue 6 años mayor que la de los controles. Hubo diferencias entre grupos en las covariables estudiadas. La diabetes mellitus, hipertensión, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia fueron más frecuentes en los casos que en los controles. No hubo diferencias significativas para la obesidad. Para realizar un estudio multivariante que analice el valor de la presencia de *C. pneumoniae* como factor de riesgo de arteriosclerosis, que en este estudio es similar a pertenecer al grupo de casos o de controles, y teniendo en cuenta el tamaño de la muestra, se aplicó la prueba de regresión logística exacta (tabla 2). El único factor identificado clara y fuertemente como significativo fue el hecho de pertenecer al grupo de casos o controles (*odds ratio* [OR] = 18,055; intervalo de confianza [IC] del 95%, 4,260-76,527).

El alto valor de la OR estimada en este caso puede explicarse por una sobrestimación debida al tamaño pequeño de la muestra e intensa relación entre los factores de riesgo. La bondad del modelo se ajustó usando la prueba de Hosmer-Lemeshow, que no fue significativa ($\chi^2 = 12,742$; *p* = 0,121; 8 grados de libertad). Además, cuando se analizaron los valores extremos y de peso, no se detectó su presencia.

Los valores de fibrinógeno fueron de 367,69 (96,81) mg/dl en los casos frente a 355 (79,11) mg/dl en los controles, sin diferencias significativas (*p* = 0,454; *t*). El valor del tercer cuartil fue de 422,25 mg/dl; el 26,6% de los casos mostró valores por encima de este valor, frente al 22% de los controles, sin diferencias significativas (*p* = 0,574; χ^2). La OR para el fibrinógeno por encima del percentil 75 fue de 1,282 (IC del 95%, 0,538-3,058).

En la tabla 3 se muestra la proporción de muestras en las que se detectaron los anticuerpos en los diferentes grupos de estudio. En los casos se encontró un ma-

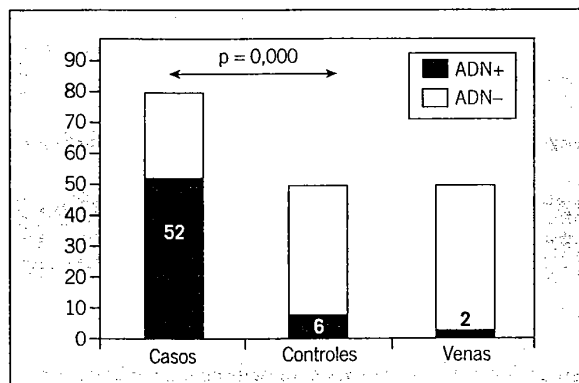


Fig. 2. Detección de ADN de *C. pneumoniae* en diferentes muestras de tejido vascular.

TABLA 6

Grado de correlación entre la presencia de anticuerpos y el ADN de la bacteria en la placa de ateroma

Muestras con anticuerpos	N.º de sujetos con ADN	Correlación		OR (IC del 95%)
		r (Pearson)	p	
IgG anti-CE (microinmunofluorescencia)	37	0,368	0,0001	4,93 (2,17-11,21)
IgG anti-CE (enzimoinmunoanálisis)	36	0,423	0,0001	6,23 (2,73-14,21)
IgA anti-CE (enzimoinmunoanálisis)	3	-0,144	0,112	0,36 (0,09-1,38)

Ig: inmunoglobulina; CE: cuerpo elemental; OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza.

TABLA 5

Valores predictivos de las pruebas que detectan los anticuerpos anti-*C. pneumoniae* para predecir la infección de la placa de ateroma

	VPP	VPN
IgG anti-CE (microinmunofluorescencia)	0,724	0,417
IgG anti-CE (enzimoinmunoanálisis)	0,724	0,333
IgA anti-CE (enzimoinmunoanálisis)	0,052	0,153
IgG anti-LPS (enzimoinmunoanálisis)	0,172	0,236
IgA anti-LPS (enzimoinmunoanálisis)	0,259	0,306

VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; CE: cuerpo elemental; LPS: lipopolisacárido.

yor número de muestras con IgG anti-CE (mediante MIF y enzimoinmunoanálisis) ($p < 0,001$; χ^2), con una OR de 11,31 (IC del 95%, 4,696-27,236) para la MIF y de 15,75 (IC del 95%, 6,126-40,495) para el enzimoinmunoanálisis. En la tabla 4 se exponen los resultados referidos a los subgrupos clínicos de los casos, que muestran una distribución uniforme.

No se detectó ADN de *C. pneumoniae* en los leucocitos. En las biopsias se detectó mayor cantidad de ADN en los casos (52 de las 80 muestras; 65%) que en los controles (6 de las 50 muestras; 12%), de forma estadísticamente significativa ($p < 0,0001$; χ^2) (fig. 2). La presencia fue uniforme en todos los subgrupos de estudio (tabla 4). En la comparación estadística, no se consideró la detección de ADN de *C. pneumoniae* en la vena safena. Éste estuvo presente en 2 muestras (4%), co-

existiendo con ADN de la bacteria en la arteria pudenda externa correspondiente. La comparación entre los resultados de las pruebas para detectar la IgG anti-CE, mediante MIF y enzimoinmunoanálisis, puso de manifiesto una buena correlación (r de Pearson = 0,582, $p = 0,001$). En la tabla 5 se reflejan los valores predictivos de los anticuerpos anti-*C. pneumoniae* cuando detectan la infección de la biopsia vascular a través de la presencia del ADN de la bacteria. La IgG anti-CE presentó los mayores valores predictivos positivos. Ninguna de las pruebas presentó un valor predictivo negativo alto. En la tabla 6 se refleja la relación entre la presencia de anticuerpos frente a CE y el ADN de la bacteria. Entre la IgG y el ADN de la bacteria el grado de correlación fue bajo y estadísticamente significativo. La IgA no se correlacionó con la IgG o la detección genética.

La bacteria no se pudo recuperar mediante cultivo celular en ninguna de las muestras. Sólo una muestra de los casos mostró un resultado positivo en la detección del LPS (1,25%) que correspondió a un sujeto sin anticuerpos anti-*C. pneumoniae* ni ADN de *C. pneumoniae*.

Discusión

Este trabajo se diseñó como un estudio de la infección crónica por *C. pneumoniae* en la EAPO. Nuestros hallazgos apoyan su existencia, ya que se encontró, entre otros, una tasa de anticuerpos en los enfermos significativamente superior a la de la población control.

En primer lugar queremos destacar la novedad que representa el diseño del estudio, por lo ajustado de los casos y controles, así como por la utilización de sujetos con procesos no coronarios en los que se aplican pruebas nuevas de inmunodiagnóstico y genéticas. No obstante, es necesario proceder a evaluar varios parámetros antes de extraer conclusiones definitivas. La selección de la población objeto del estudio fue compleja, sobre todo la del grupo control, con sujetos mayores de 65 años, en los que se obtuvo una biopsia de arteria. Éstos se seleccionaron después de la obtención de los casos para localizar a los sujetos con 2 factores de riesgo importantes, la edad y el sexo. Aunque la edad del grupo de casos fue 6 años mayor que la de controles, el modelo de estudio fue comparable. Los controles también se emparejaron en relación con el hábito tabáquico, evitando los posibles errores referidos en la bibliografía²⁸. En relación con la prueba de MIF, la dilución inicial de las muestras coincide con la usada en la mayor parte de los estudios²⁰ para conseguir una sensibilidad y especificidad adecuadas.

Aunque son menos frecuentes los estudios basados en la utilización de la microscopía electrónica²⁹, si son más numerosos los que utilizando la investigación de los anticuerpos han relacionado de manera positiva³⁰⁻³² o negativa^{8,33} la EAPO con la infección por *C. pneumoniae*. Nosotros encontramos una relación entre la presencia de IgG anti-CE y la EAPO, pero no con la IgA anti-CE y anti-LPS y la IgG anti-LPS. De igual forma que se ha descrito para *Chlamydia trachomatis*³⁴, si existe una infección de la placa de ateroma por *C. pneumoniae*, ésta debe de ser crónica. En ella la bacteria se replicaría en menor intensidad que en los procesos agudos y expresaría poco LPS, con presencia de anticuerpos persistentes. Por otro lado, se ha demostrado una vida media más corta para los anti-LPS en comparación con los anti-CE, lo que dificultaría la detección de los primeros, especialmente en las infecciones crónicas como la EAPO^{6,34}. Nuestros resultados para la IgA anti-CE son comparables con los estudios recientes que refieren una escasa presencia en estos enfermos^{33,36,37}. Pensamos que el sistema inmunológico puede reconocer el CE antes de su llegada al endotelio vascular. Esto puede ocurrir, entre otros, durante el transporte por los leucocitos de sangre periférica y la salida de los CE durante la replicación. El importante componente proteico del CE hace que sean suficientes los escasos estímulos antigénicos derivados del mismo. Los valores de OR obtenidos son superiores a otras aportaciones previas; sólo pocos estudios han mostrado OR en el rango elevado, aun considerando la amplia variabilidad de

éstos en los diversos estudios. No hay referencias en la bibliografía de OR por encima de 10, aunque el uso de esta técnica está poco extendida³⁷⁻⁴⁰. No obstante, la presencia significativa de la IgG anti-CE se puede deber a otras causas que pueden enmascarar los resultados: a) la colonización de las vías respiratorias altas puede incrementar la IgG e IgA⁶, aunque se excluyó la presencia de enfermedad respiratoria en todos los sujetos; b) se ha descrito la infección por esta bacteria sin seroconversión⁴¹, y c) el resultado obtenido en el laboratorio se puede deber a una respuesta inmunológica heterotípica ocasionada por similitud antigénica con otras especies de *Chlamydiaceae*, bacilos gramnegativos o proteínas de shock térmico humanas. Todo esto se debería al uso de epítomos de la bacteria pobremente caracterizados en los equipos de diagnóstico utilizados. Además, si hay restos del LPS en los CE empleados, se pueden producir resultados erróneos de los anticuerpos anti-CE detectados⁴². Finalmente, es preciso señalar que los valores de fibrinógeno detectados fueron ligeramente superiores en los enfermos con EAPO, aunque sin diferencias significativas. En este sentido, los diferentes autores no han obtenido datos concluyentes^{43,44}.

Una de las novedades de este estudio fue la extracción de un trozo de arteria pudenda externa en la cirugía de varices convencional. Esto supuso una actuación mínima, ya que esta arteria se puede ligar con facilidad si se requiere y no hubo ninguna complicación clínica. Aunque la histología de esta arteria es diferente de la carótida o femoral y raramente sufre arteriosclerosis, pensamos que representa un mejor grupo control, al ser una arteria de un sujeto vivo, que las muestras obtenidas de cadáveres⁴⁵⁻⁴⁷. Además, se aproxima más a un estudio real de casos y controles empleando sujetos comparables. Nosotros aplicamos una prueba de reacción en cadena de la polimerasa semianidada para intentar mejorar la sensibilidad y especificidad de los resultados previamente obtenidos por Campbell et al²³. Con ella obtenemos un porcentaje elevado (65%) de resultados positivos en pacientes con estenosis de la arteria carótida, aorta infrarrenal o femoropoplítea. Los valores obtenidos fueron similares a los de Dobrilovic et al⁴⁸ en estenosis de arteria ilíaca y aneurisma aórtico abdominal. En los estudios en los que se emplean como controles las arterias aparentemente sanas de los sujetos, el ADN de la bacteria se detectó entre el 15 y el 61% de los casos y el 0 y el 5% de los controles^{45,49}. Nosotros encontramos ADN en el 65% de los casos y en el 12% de los controles. No podemos justificar la presencia de ADN en las arterias control, en las que en 4 de las 6 el sujeto tenía unos

títulos de IgG inferiores a 1/32, aunque esta situación ya se ha descrito^{47,49,50}. Tampoco somos capaces de explicar la presencia de ADN en 2 de la 50 venas estudiadas. Las venas varicosas tienen cierto grado de inflamación⁵¹ y el ADN puede proceder de las células de la pared. Hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio con un grupo control vivo, emparejado a los casos, para poder comparar nuestros datos.

No encontramos una gran relación entre la presencia de ADN y anticuerpos, y sólo para la IgG anti-CE. De forma similar, muy pocos estudios han encontrado una relación entre el ADN y la presencia de anticuerpos, y siempre con un tamaño de muestra superior al nuestro^{37,40}.

Finalmente, no detectamos ADN en los leucocitos de sangre. Este resultado coincide sólo con el de Ong et al¹² y difiere del obtenido por otros autores, que detectaron la presencia del ADN en hasta el 60% de los casos³⁶. Esta diferencia se podría deber a los diferentes métodos usados en la separación de las células y en el tamaño de la población. Además, los problemas en la conservación de las muestras y una escasa cantidad de ADN pueden ocasionar resultados falsamente negativos^{52,53}.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la detección del LPS y los anticuerpos anti-LPS, el resultado positivo obtenido para el LPS pudo corresponder a un falso positivo. Basándonos en la hipótesis anteriormente señalada sobre la escasa síntesis de LPS y anticuerpos anti-LPS, la reducida presencia de aquél es comprensible, aunque puede estar presente en los inmunocomplejos circulantes, lo que dificulta su detección. Además, la extracción del LPS es un procedimiento difícil, especialmente en los tejidos calcificados. Ésta es la primera aportación de la aplicación de este equipo sobre muestras de biopsia arterial, por lo que no es posible la comparación con otros estudios.

Varios autores han aislado la bacteria desde la pared arterial, pero no utilizan grupos control en sus estudios⁵⁴, por lo que no se puede establecer una relación definitiva. No obstante, el escaso aislamiento de la bacteria demuestra la complejidad de esta prueba y su escasa viabilidad^{54,55}.

Para saber si la infección es un factor de riesgo independiente de factores como la hiperlipemia, el uso del tabaco, la hipertensión, la diabetes o la historia familiar de la enfermedad, se necesita conocer el mecanismo de acción por el que *C. pneumoniae* produce arteriosclerosis, y si la bacteria causa el daño inicial o acelera y agrava una lesión aterosclerótica previa. La contribución más importante de este estudio deriva del análisis simultáneo de diferentes pruebas que buscan la relación entre la infección por *C. pneumoniae* y EAPO.

Los resultados obtenidos por nosotros derivan de su reconocimiento por el sistema inmunológico, durante su supuesto transporte por los leucocitos, y la detección de la bacteria a través de su ADN. Basándose en esto se podría concluir que, de manera significativa, la infección por *C. pneumoniae* está relacionada con la EAPO, como lo demuestra una mayor presencia de IgG anti-CE y de ADN de la bacteria.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Campbell LA, Kuo CC. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis. *Semin Respir Infect* 2003; 18:48-54.
- Monno R, De Vito D, Losito G, Sibilio G, Costi A, Fumarola L, et al. Chlamydia pneumoniae in community-acquired pneumonia: seven years of experience. *J Infect* 2002;45:135-8.
- Moazed TC, Kuo CC, Grayston JT, Campbell LA. Evidence for systemic dissemination of Chlamydia pneumoniae via macrophages in the mouse. *J Infect Dis* 1998;177:1322-5.
- Linnanmaki E, Leinonen M, Mattila K, Nieminen MS, Valtonen V, Saikku P. Chlamydia pneumoniae-specific circulating immune complexes in patients with chronic coronary heart disease. *Circulation* 1993;87:1130-4.
- Saikku P, Leinonen M, Mattila K, Ekman MR, Nieminen MS, Makela PH, et al. Serological evidence of an association of a novel chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet* 1988;2:983-6.
- Tiran A, Tio RA, Ossewaarde JM, Tiran B, Den Heijer P, The TH, et al. Coronary angioplasty induces rise in Chlamydia pneumoniae-specific antibodies. *J Clin Microbiol* 1999;37:1013-7.
- Anderson JL, Carlquist JF, Muhlestein JB, Horne BD, Elmer SP. Evaluation of C-reactive protein, an inflammatory marker, and infectious serology as risk factors for coronary artery disease and myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32:35-41.
- Gerdes VE, Verkooyen RP, Kwa VI, De Groot E, Van Gorp EC, Ten Cate H, et al. Chlamydial LPS antibodies, intima-media thickness and ischemic events in patients with established atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003;167:65-71.
- Weiss SM, Roblin PM, Gaydos CA, Cummings P, Patton DL, Schulhoff N, et al. Failure to detect Chlamydia pneumoniae in coronary atheromas of patients undergoing atherectomy. *J Infect Dis* 1996;173:957-62.
- Bishara J, Pittlik S, Kazakov A, Sahar G, Haddad M, Vojdani A, et al. Failure to detect Chlamydia pneumoniae by cell culture and polymerase chain reaction in major arteries of 93 patients with atherosclerosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22:300-2.
- Bishara J, Pittlik S, Kazakov A, Sahar G, Haddad M, Vojdani A, et al. Failure to demonstrate Chlamydia pneumoniae in symptomatic abdominal aortic aneurysms by a nested polymerase chain reaction (PCR). *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1998; 15:161-4.
- Ong GM, Coyle PV, Barros D'Sa AA, McCluggage WG, Duprex WP, O'Neill HJ, et al. 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* 2001;1:12.
- Blasi F, Boman J, Esposito G, Melissano G, Chiesa R, Cosentini R, et al. Chlamydia pneumoniae DNA detection in peripheral blood mononuclear cells is predictive of vascular infection. *J Infect Dis* 1999;180:2074-6.
- Gutiérrez J, Linares JP, Rodríguez M, Maroto MC. Chlamydia pneumoniae y su relación con la arteriosclerosis humana. *Rev Invest Clin* 2000;52: 482-6.

15. Muhlestein JB, Anderson JL, Hammond EH, Zhao L, Trehan S, Schwobe EP, et al. Infection with *Chlamydia pneumoniae* accelerates the development of atherosclerosis and treatment with azithromycin prevents it in a rabbit model. *Circulation* 1998;97:633-66.
16. Dunne M. WIZARD and the design of trials for secondary prevention of atherosclerosis with antibiotics. *Am Heart J* 1999;138:542-4.
17. Jackson LA. Description and status of the azithromycin and coronary events study (ACES). *J Infect Dis* 2000;181:579-81.
18. Muhlestein JB, Anderson JL, Carlquist JF, Salunkhe K, Horne BD, Pearson RR, et al. Randomized secondary prevention trial of azithromycin in patients with coronary artery disease: primary clinical results of the ACADEMIC study. *Circulation* 2000;102:1755-60.
19. Labs KH, Dormandy JA, Jaeger KA, Stuerzebecher CS, Hiatt WR. Transatlantic conference on clinical trial guidelines in peripheral arterial disease. *Circulation* 1999;100:75-81.
20. Bennedsen M, Berthelsen L, Lind I. Performance of three microimmunofluorescence assays for detection of *Chlamydia pneumoniae* immunoglobulin M, G, and A antibodies. Infection, atherosclerosis and macrolide antibiotics group. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:833-9.
21. Gutiérrez J, Mendoza J, Fernández F, Linares-Palomino J, Soto MJ, Maroto MC. ELISA test to detect *Chlamydia pneumoniae* IgG. *J Basic Microbiol* 2002;42:13-8.
22. Gutiérrez J, Linares J, López C, Rodríguez M, Ros E, Piédrola G, et al. *Chlamydia pneumoniae* DNA in the arterial wall of patients with peripheral vascular diseases (PAOD). *Infection* 2001;29:196-200.
23. Campbell LA, Pérez Melgosa M, Hamilton DJ, Kuo CC, Grayston JT. Detection of *C. pneumoniae* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:434-9.
24. Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989;339:237-8.
25. Gutiérrez J, Maroto MC, Piédrola G. Granulocyte abnormalities in parenteral drug addicts. The influence of HIV infection. *Allergol Immunopathol* 1989;17:251-5.
26. Dean D, Ferrero D, Mc Carthy M. Comparison of performance and cost-effectiveness of direct fluorescent-antibody, ligase chain reaction, and PCR assays for verification of chlamydial enzyme immunoassay result for populations with a low moderate prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection. *J Clin Microbiol* 1998;36:94-9.
27. Maass M, Harig U. Evaluation of culture conditions used for isolation of *Chlamydia pneumoniae*. *Am J Clin Pathol* 1995;103:141-8.
28. Hahn DL, Golubjatnikov R. Smoking is a potential confounder of the *C. pneumoniae* coronary artery disease association. *Arterioscl Thromb* 1992;12:945-7.
29. Ramos PM, Ortega F, Samaniego J, Díaz R. Microscopía electrónica, *Chlamydia pneumoniae* y arteriosclerosis. *Med Clin (Barc)* 1999;27:277-8.
30. Blanchard JF, Armenian HK, Peeling R, Friesen PP, Shen C, Brunham RC. The relation between *Chlamydia pneumoniae* infection and abdominal aortic aneurysm: case-control study. *Clin Infect Dis* 2000;30:946-7.
31. Melnick SL, Shahar E, Folsom AR, Grayston JT, Sorlie PD, Wang SP, et al. Past infection by *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR and asymptomatic carotid atherosclerosis. Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. *Am J Med* 1993;95:499-504.
32. Elkind MS, Lin IF, Grayston JT, Sacco RL. *Chlamydia pneumoniae* and the risk of first ischemic stroke: The Northern Manhattan Stroke Study. *Stroke* 2000;31:1521-5.
33. Porqueddu M, Spirito R, Parolari A, Zanobini M, Pompilio G, Polvani G, et al. Lack of association between serum immunoreactivity and *Chlamydia pneumoniae* detection in the human aortic wall. *Circulation* 2002;106:2647-8.
34. Geisler WM, Suchland RJ, Rockey DD, Stamm WE. Epidemiology and clinical manifestations of unique *Chlamydia trachomatis* isolates that occupy nonfusogenic inclusions. *J Infect Dis* 2001;184:879-84.
35. Veerkoyen RP. *Chlamydia pneumoniae* - studies on an emerging pathogen (thesis doctoral). Rotterdam: University of Rotterdam, 1997.
36. Smieja M, Mahony J, Petrich A, Boman J, Chernesky M. Association of circulating *Chlamydia pneumoniae* DNA with cardiovascular disease: a systematic review. *BMC Infect Dis* 2002;2:21.
37. Sessa R, Di Pietro M, Schiavoni G, Santino I, Cipriani P, Romano S, et al. Prevalence of *Chlamydia pneumoniae* in peripheral blood mononuclear cells in Italian patients with acute ischaemic heart disease. *Atherosclerosis* 2001;159:521-5.
38. Mendall MA, Carrington D, Strachan D, Patel P, Molineaux N, Levi J, et al. *C. pneumoniae*: risk factors for seropositivity and association with coronary heart disease. *J Infect* 1995;30:121-8.
39. Karunakaran K, Blanchard J, Raudonikiene A, Shen C, Murdin AD, Brunham RC. Molecular detection and seroepidemiology of the *Chlamydia pneumoniae* bacteriophage (PhiCpn1). *J Clin Microbiol* 2002;40:4010-4.
40. Mazzoli S, Tofani N, Fantini A, Semplici F, Bandini F, Salvi A, et al. *Chlamydia pneumoniae* antibody response in patients with acute myocardial infarction and their follow-up. *Am Heart J* 1998;135:15-20.
41. Emre U, Roblin PM, Gelling M, Dumornay W, Rao M, Hammerschlag MR, et al. The association of *Chlamydia pneumoniae* and reactive airway disease in children. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1994;148:727-32.
42. Maurin M, Eb F, Etienne J, Raoult D. Serological cross-reaction between Bartonella and *Chlamydia* species implications for diagnosis. *J Clin Microbiol* 1997;35:2283-7.
43. Markus HS, Sitzer M, Carrington D, Mendall MA, Steinmetz H. *Chlamydia pneumoniae* infection and early asymptomatic carotid atherosclerosis. *Circulation* 1999;100:832-7.
44. Toss H, Gnarppe J, Gnarppe H, Siegbahn A, Lindahl B, Wallentin L. Increased fibrinogen levels are associated with persistent *Chlamydia pneumoniae* infection in unstable coronary artery disease. *Eur Heart J* 1998;19:570-7.
45. Petersen E, Boman J, Persson K, Arnerlov C, Wadell G, Juto P, et al. *Chlamydia pneumoniae* in human abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1998;15:138-42.
46. Maass M, Krause E, Engel PM, Kruger S. Endovascular presence of *Chlamydia pneumoniae* in patients with hemodynamically effective carotid artery stenosis. *Angiology* 1997;48:699-706.
47. Karlsson L, Gnarppe J, Naas J, Olsson G, Lindholm J, Steen B, et al. Detection of viable *Chlamydia pneumoniae* in abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000;19:630-5.
48. Dobrilovic N, Vadrilamani L, Meyer M, Wright CB. *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic carotid artery plaques: high prevalence among heavy smokers. *Am Surg* 2001;67:589-93.
49. Ong G, Thomas BJ, Mansfield AO, Davidson BR, Taylor-Robinson D. Detection and widespread distribution of *Chlamydia pneumoniae* in the vascular system and its possible implications. *J Clin Pathol* 1996;49:102-6.
50. Nieto FJ, Folsom AR, Sorlie PD, Grayston JT, Wang SP, Chambless LE. *Chlamydia pneumoniae* infection and incident coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am J Epidemiol* 1999;150:149-56.
51. Ciuffetti G, Mannarino E, Paltriccina R, Malagigi V, Sergi F, Paulisch P. Leukocyte activity in chronic venous insufficiency. *Int Angiol* 1994;13:312-6.
52. Boman J, Gaydos CA. Polymerase chain reaction detection of *Chlamydia pneumoniae* in circulating white blood cells. *J Infect Dis* 2000;181:452-4.
53. Smieja M, Mahony JB, Goldsmith CH, Chong S, Petrich A, Chernesky M. Replicate PCR testing and probit analysis for detection and quantitation of *Chlamydia pneumoniae* in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2001;39:1796-801.
54. Apfalter P, Loidl M, Nadrichal R, Makristathis A, Rotter M, Bergmann M, et al. Isolation and continuous growth of *C. pneumoniae* from arterectomy specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:305-8.
55. Jackson LA, Campbell LA, Kuo CC, Rodríguez DJ, Lee A, Grayston JT. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from a carotid endarterectomy specimen. *J Infect Dis* 1997;176:292-5.