

# *Chlamydia pneumoniae* en la aterosclerosis coronaria. Evaluación serológica (Estudio CLATER)

GUILLERMO MON\*, JOSE LEGUIZAMON\*, RICARDO FOYE\*, ALBERTO BALLESTER\*, TOMAS REY SILVA\*, JORGE BERNABO, RICARDO BORRELLI, GUSTAVO VIEYRA, SILVIA URIARTE, NORMA PLANES, ALICIA FARINATI

## RESUMEN

Estudios experimentales y epidemiológicos demuestran una asociación positiva entre *Chlamydia pneumoniae* (Cp) y enfermedad coronaria aterosclerótica. El papel que desempeña la Cp en la etiopatogenia de la aterosclerosis no está definido ni si los resultados extrajeros son reproducibles en nuestro medio.

### Objetivo

Analizar los niveles serológicos de anticuerpos IgG e IgA anti-Cp en pacientes coronarios *versus* controles. Se incluyeron pacientes con infarto de miocardio o cinecoronariografía con lesiones ateroscleróticas y controles con cinecoronariografía normal. Se excluyeron los pacientes con sospecha de infección respiratoria por Cp o tratamiento con quinolonas, macrólidos o tetraciclinas en los dos últimos años.

### Métodos

Se determinaron los niveles de anticuerpos (Ac) contra Cp, inmunoglobulinas A (IgA) y G (IgG) con el método de microinmunofluorescencia. Se evaluaron 87 pacientes y 28 controles. Además, con el propósito de establecer si los títulos elevados de IgG anti-Cp podrían representar una reacción cruzada a *Chlamydia trachomatis* (Ct), se midieron Ac IgG anti-Ct en 24 pacientes seleccionados.

### Resultados

Los títulos de IgG se dividieron en 3 categorías: bajos (TB) < 128: 27 pacientes (31%), controles 23 (82%); medios (TM) 128-256: 44 pacientes (51%), controles 5 (18%) y altos (TA) > 256: 16 pacientes (18%), controles 0 (0%) ( $p < 0,001$ ). La prevalencia de Ac IgA fue de (TB) < 40: 18 pacientes (37%), controles 28 (100%) y (TA) > 40: 30 pacientes (62%), controles 0 ( $p < 0,001$ ).

### Conclusión

En el grupo control, el 82% tuvo TB para IgG y el 100% TB para IgA, el 69% de los pacientes tenían TM y TA de IgG y el 32% de ellos TA de IgA. No hubo relación significativa entre Cp *versus* Ct. Estos resultados sugieren una fuerte asociación entre enfermedad coronaria aterosclerótica y Cp. Es posible que algunos pacientes con aterosclerosis coronaria puedan tener una infección crónica por Cp como lo indican los niveles elevados de IgG e IgA hallados en este estudio, pero estos datos son insuficientes para atribuirle a la Cp un papel causal en aterogénesis. Este es el primer trabajo en la Argentina que estudió la prevalencia de títulos anti-Cp en la enfermedad coronaria. La coincidencia con datos epidemiológicos de otros países agrega universalidad a los resultados. REV ARGENT CARDIOL 1999; 67: 299-303.

*Palabras clave* *Chlamydia pneumoniae* - Aterosclerosis coronaria

---

Organizado por el Distrito Conurbano Norte de la SAC

\* Miembro Titular SAC

Trabajo recibido para su publicación: 6/98 Aceptado: 10/98

Dirección para separatas: Guillermo A. Mon - Av. Maipú 1575 - PB "D" - (1638) Vicente López - Provincia de Buenos Aires - Argentina - Tel.: 4797-8130

## INTRODUCCION

Desde hace varios años *Chlamydia pneumoniae* (Cp), cepa TWAR, se vincula a la aterosclerosis.

En animales existe un modelo experimental en ratas (1) y otro en conejos. (2) En este último se pudo recobrar la bacteria de lesiones símil ateroscleróticas en el arco aórtico.

Se logró demostrar *in vitro* que los macrófagos, las células musculares lisas y las células endoteliales humanas pueden ser infectadas por Cp y son capaces de mantener viva una cepa de la bacteria. (3)

Por otra parte, la evidencia en seres humanos incluye una incidencia mayor de títulos de anticuerpos elevados entre los pacientes con lesiones ateroscleróticas de aorta, (4, 5) carótidas (6-8) y de arterias coronarias. (9, 10) Se describió también una asociación entre títulos altos anti-Cp (> 256) y un nivel elevado de lipoproteína (a) (Lp[a]) > 120 mg/L. (11)

Se localizó además material antigénico perteneciente a Cp por técnicas de inmunohistoquímica o PCR (*polimerase chain reaction* o reacción en cadena de la polimerasa) en el material de aterectomía del 73% de 90 pacientes (12) y en material de autopsias de adultos jóvenes, donde se demostró que la Cp se encuentra en las lesiones coronarias ateroscleróticas de adultos jóvenes pero no en las coronarias aparentemente normales con evidencia de aterosclerosis o sin ella en otros territorios. (13)

Existen trabajos en los que se comunicó el hallazgo del germen mediante PCR en el 44% de las biopsias de aneurismas abdominales sometidos a cirugía. (14, 15)

Recientemente, J. A. Ramírez logró cultivar Cp a partir de las arterias coronarias de uno de diez corazones explantados por aterosclerosis coronaria terminal. En ese mismo paciente se obtuvo evidencia de la presencia de Cp por PCR, inmunocitoquímica, microscopía electrónica e hibridación *in situ*. En forma adicional, al menos uno de estos métodos fue positivo en 6 de los 9 especímenes restantes. (16)

En varios trabajos se publicó que la prevalencia de títulos elevados anti-Cp se encuentra entre el 45% y el 70% en las poblaciones de enfermos ateroscleróticos, mientras que el rango entre los correspondientes controles oscila del 10% al 60%. (6, 7, 9, 10, 17)

Desconocemos si la prevalencia de seropositividad en nuestro país es equivalente a la que se describe. Por tal razón, se planificó la determinación de los títulos anti-Cp en una población de enfermos coronarios que se compararon con controles sin enfermedad aterosclerótica. Considerando que éste es el primer trabajo que explora esta relación en nuestro medio, se puso especial énfasis en:

a) Contar con una población de enfermos coronarios comprobados.

b) Incluir una población control con coronarias angiográficamente normales.

c) La determinación de títulos contra *Chlamydia pneumoniae* tanto de IgG (indicadores de infección crónica o pasada) como de IgA (indicadores de infección persistente).

d) La determinación de títulos contra *Chlamydia trachomatis* (Ct) para descartar una reacción cruzada con este germen del mismo género que constituye una infección común y de alta prevalencia en nuestro medio.

## MATERIAL Y METODOS

El estudio CLATER es un estudio prospectivo y multidisciplinario, simple ciego, con grupo control, organizado por el Distrito Conurbano Norte de la Sociedad Argentina de Cardiología. Entre el mes de marzo de 1996 y el mes de noviembre de 1997 se incluyeron 87 pacientes de 30 a 70 años con evidencia de enfermedad coronaria aterosclerótica manifiesta por infarto de miocardio previo (de más de tres meses de antigüedad) o cinecoronariografía con lesiones indicativas de aterosclerosis coronaria. Como controles se incluyeron 28 pacientes con cinecoronariografía normal en el último año y ausencia de signos clínicos de enfermedad vascular aterosclerótica en otros territorios.

Se excluyeron todos los pacientes con antecedentes de enfermedad respiratoria con una duración mayor de tres días en los dos últimos años o que hubieran recibido tratamiento previo con quinolonas, macrólidos o tetraciclinas en los dos últimos años o por su negativa a participar en el estudio.

El laboratorio procesó los sueros sin conocer a qué grupos pertenecían los pacientes.

### Análisis inmunológico

Para determinar el título de inmunoglobulinas G (IgG) para C, se utilizaron diluciones que se comenzaron con 1:8. La IgG se midió con la prueba de microinmunofluorescencia. Las diluciones siguientes fueron 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 y 1/1.024.

Se usaron el sustrato de antígeno de Cp (Bion), el antisuero conjugado con fluoresceína (F [ab]) y el fragmento antisuero caprino a la IgG (Kalestad) en dilución 1:150 con azul de Evans como contrateñido.

Para el dosaje de IgA, el suero fue absorbido usando un reactivo de pretratamiento caprino anti-IgG (BIO-WHITTAKER). (18) Se utilizó el conjugado anti-IgA humana con fluoresceína isotriocianato (OTKA, West Germany) en dilución 1:150 con el azul de Evans como contrateñido.

Todas las diluciones, tanto de IgG como de IgA, fueron leídas con el empleo de un microscopio Nikon. El título de IgG contra Ct también se deter-

minó para un subgrupo de pacientes con enfermedad coronaria aterosclerótica usando el mismo método que se describió para Cp.

### Análisis estadístico

Los datos demográficos de los pacientes y los controles se compararon con estadísticas descriptivas con el objeto de establecer la similitud de las poblaciones. Se utilizó la prueba de chi cuadrado para la comparación de los resultados en ambos grupos de pacientes. Se determinaron la diferencia de las proporciones, el error estándar y el intervalo de confianza para los pacientes con títulos bajos y altos.

### RESULTADOS

**Población.** Se estudiaron 87 pacientes con enfermedad coronaria y 28 pacientes con coronarias angiográficamente normales. La edad promedio fue de 61,3 y 60,1 años, respectivamente, el 84% masculino en los coronarios y el 78,6% en los normales. La incidencia de fumadores fue similar, 38% y 40%. No hubo diferencias significativas entre los datos demográficos de la población en estudio.

**Anticuerpos anti-IgG.** Los títulos obtenidos en el grupo de 87 pacientes con enfermedad coronaria comprobada (EC) y las 28 personas con coronarias normales confirmadas angiográficamente se muestran en la Tabla 1.

Puede observarse que el 69% de los pacientes con enfermedad coronaria presentan títulos medianos o altos ( $> 1/128$ ), mientras que sólo el 18% de los pacientes con coronarias normales tienen títulos en ese nivel.

Cuando se separó el nivel de títulos en tres grupos —bajos (títulos menores de  $1/128$ ), medianos (entre  $1/128$  a  $< 1/256$ ) y altos ( $> 1/256$ )—, se observó que los pacientes en el grupo control presentaron en su totalidad títulos de anticuerpos bajos o medianos. El 100% de los pacientes con coronarias normales se encontraron en el rango de  $1/128$  o menos. El grupo de pacientes coronarios, por su parte, presentó una distribución inversa: sólo el 31% presentó títulos bajos y el 69% restante, títulos medianos o altos. Esta distribución diferente fue estadísticamente significativa.

**Anticuerpos anti-IgA.** Los títulos anti-IgA se determinaron en un subgrupo de 38 pacientes en el

grupo con enfermedad coronaria y 28 pacientes en el grupo con coronarias normales (Tabla 2).

En este caso también se pudo comprobar que la distribución del título de anticuerpos anti-IgA conserva un patrón similar que el título de IgG: bajo en los pacientes con coronarias normales y alto en los pacientes con enfermedad coronaria. En este caso, la menor concentración de anticuerpos en suero no permitió la estratificación en tres grupos y se hizo sólo en dos: bajos a los menores de  $1/40$  y altos a los mayores o iguales a  $1/40$ .

**Títulos de anticuerpos IgG contra *Chlamydia trachomatis*.** Con el objeto de establecer si los títulos elevados de anti-IgG anti-Cp podían en realidad representar una reacción cruzada contra Ct, una infección mucho más difundida y de mayor prevalencia en la población, se seleccionó un subgrupo de 24 pacientes con enfermedad coronaria y con los títulos de anticuerpos IgG anti-Cp más altos y se dosaron en ellos los títulos de IgG anti-Ct. Los títulos de IgG frente a Ct en 20 de los 24 pacientes estudiados fueron de  $\leq 1/64$ . En sólo 4 casos el título fue de  $1/128$ . En estos pacientes, el título de IgG frente a Cp fue de  $1/256$ ,  $1/512$ ,  $1/1.024$  y  $> 1/1.024$ . La diferencia mayor de 2 titulaciones de los anticuerpos frente a Cp con respecto a Ct en todos los casos, con excepción de 1 ( $1/128$  Ct,  $1/256$  Cp), indicaría que no existe una reacción cruzada que justifique los títulos elevados frente a Cp.

### DISCUSION

El presente estudio demuestra que los pacientes coronarios tienen en promedio títulos de inmunoglobulina IgG anti-Cp significativamente elevados, con títulos mayores de  $1/128$ . También se observó que en el grupo en estudio no existen pacientes con títulos muy bajos ( $< 1/8$ ).

En el grupo de pacientes controles se observa una distribución de los títulos inversa a la determinada en los enfermos con aterosclerosis coronaria: en los pacientes con coronarias normales hay mayor incidencia de títulos bajos y no existen títulos medianos o altos. Si un título de IgG  $\geq 1/128$  se considera positivo, se encontraron títulos positivos en el 69% de los enfermos coronarios y sólo en el 18% de los controles ( $p < 0,0001$ ).

Tabla 1  
Títulos de anticuerpos IgG anti-Cp en pacientes con enfermedad coronaria y en controles con coronarias normales

| Título IgG                    | Coronarios (n = 87) |      | Normales (n = 28) |      | p      |
|-------------------------------|---------------------|------|-------------------|------|--------|
|                               | n                   | %    | n                 | %    |        |
| Bajos ( $< 1/128$ )           | 27                  | (31) | 23                | (82) | 0,0001 |
| Medios ( $1/128 \leq 1/256$ ) | 44                  | (51) | 5                 | (18) |        |
| Altos ( $> 1/256$ )           | 16                  | (18) | 0                 | (0)  |        |

Tabla 2  
Título de anticuerpos anti-IgA en pacientes coronarios versus controles

| Título IgA                  | Coronarios (n = 48) |        | Normales (n = 28) |       | p          |
|-----------------------------|---------------------|--------|-------------------|-------|------------|
|                             | n                   | %      | n                 | %     |            |
| Título bajo ( $< 1/40$ )    | 18                  | (37,5) | 28                | (100) |            |
| Título alto ( $\geq 1/40$ ) | 30                  | (62,5) | 0                 | (0)   | $< 0,0001$ |

Cuando se analizaron los títulos de inmunoglobulina IgA anti-Cp, se encontró una distribución similar, con un predominio de títulos bajos entre los controles y de títulos altos entre los enfermos coronarios. Se encontraron títulos positivos ( $> 1/40$ ) en el 62,5% de los enfermos coronarios y en el 0% de los controles ( $p < 0,001$ ).

Como los títulos anti-IgA elevados descienden precozmente, la exclusión de pacientes con infecciones respiratorias en los dos últimos años agrega confiabilidad a estos resultados, que vinculan a Cp a la aterosclerosis coronaria e indicarían su presencia en las lesiones.

Se realizó un control adicional en un subgrupo de 13 pacientes con los títulos más elevados de anticuerpos contra Cp: en ellos se dosaron los títulos anti-Ct para descartar la posibilidad de una reacción inmunológica cruzada a una infección mucho más común y difundida: los resultados mostraron la ausencia de superposición.

El presente estudio tiene como limitación la cantidad reducida de pacientes; sin embargo, estos hallazgos se encuentran en concordancia con lo publicado anteriormente por Pekka Saikku y colaboradores del Helsinki Heart Study, (17) en quienes encontraron títulos elevados anti-Cp en el 50% de los pacientes que desarrollaron un infarto de miocardio contra sólo un 10% de títulos positivos entre los que sirvieron como controles. También existe similitud con las publicaciones de Wimmer y colaboradores, (7) los cuales encontraron serología positiva entre pacientes que presentaron un accidente cerebrovascular o un ataque isquémico transitorio, con la de Blasi y colaboradores, (4) en cuyo estudio la serología fue positiva en pacientes con aneurisma de aorta abdominal aterosclerótica y con la de Dahlen y colaboradores (11) en pacientes con enfermedad coronaria aterosclerótica.

## CONCLUSION

Los resultados del estudio sugieren que hay una relación entre Cp y enfermedad coronaria aterosclerótica y que en nuestro medio es similar a la descrita en otros países con distinta prevalencia epidemiológica de infecciones.

Dado que se extremaron los esfuerzos para diferenciar las dos poblaciones de coronarios y controles y que se trató de descartar un elemento de confusión como las infecciones recientes por Cp o Ct, la asociación entre aterosclerosis coronaria y títulos serológicos anticlamidia se ve reforzada, aunque resulta prematuro especular acerca de la naturaleza de esta relación.

Las futuras líneas de trabajo están dirigidas a profundizar en el análisis del tipo de relación de Cp con aterosclerosis, determinar si es sólo un habitante de

las placas de ateroma o si la inflamación que provoca es otro factor de riesgo para aterosclerosis. Para ello se requerirán estudios epidemiológicos prospectivos de grandes poblaciones, estudios de subgrupos especiales dentro de la enfermedad coronaria (síndromes isquémicos agudos y crónicos) y, finalmente, estudios con intervención terapéutica. En este sentido se publicaron recientemente dos trabajos piloto: uno en pacientes posinfarto de miocardio con títulos elevados de anticuerpos anti-Cp (IgG), en el que el tratamiento con azitromicina logró reducir la incidencia de eventos coronarios, (19) y el otro en angina inestable y tratamiento con roxitromicina, con resultados también favorables. (20)

## SUMMARY

### CHLAMYDIA PNEUMONIAE AND CORONARY ATHEROSCLEROSIS. A SEROLOGICAL STUDY

Many experimental and epidemiological studies show a positive association between *Chlamydia pneumoniae* (Cp) and atherosclerotic coronary artery disease (CAD), but the causal relationship is not clear enough.

#### Objective

To study the IgG and IgA serologic response to Cp in patients with CAD versus controls. Inclusion criteria: patients with evidence of past myocardial infarction, or cinecoronariography with atherosclerotic lesions. Controls: without clinical evidence of atherosclerosis and normal cinecoronariography. Patients suspected of past Cp respiratory tract infection 2 years before, antibioticotherapy (tetracyclines, macrolides, fluorquinolones) in the previous 2 years were excluded.

#### Methods

Immunoglobulin A (IgA) and G (IgG) antibodies (Ab) to Cp were measured using the microimmunofluorescence method. We studied 28 controls and 87 patients. At the same time, with the purpose of establishing if raised titers of IgG anti Cp could represent a cross-reaction to *Chlamydia trachomatis* (Ct), IgG Ab against Ct in 24 selected patients were performed.

#### Results

Were considered three categories of IgG titers: low (LT)  $< 128$ : 27 patients (31%), control 23 (82%); medium (MT) 128-256: 44 patients (51%), control 5 (18%) and high (HT)  $> 256$ : 16 patients (18%), control 0 (0%) ( $p < 0.001$ ). The prevalence of IgA Ab LT  $< 40$  was: 18 patients (37%), control 28 (100%) and HT  $> 40$ : 30 patients (62%), control 0 ( $p < 0.001$ ).

### Conclusion

Almost all the controls had LT-IgG and IgA Ab, 69% of the patients had MT and HT of IgG and 32% of them HT of IgA. There were not serologic links between Cp versus Ct. These results suggest a strong relation between CAD and Cp. It is possible that some patients with CAD could have chronic Cp infection as indicated by the presence of elevated levels of IgG and IgA, but this data are insufficient to attribute Cp a causal role in atherogenesis. New experimental models, larger epidemiological studies and further therapy with appropriate antibiotics are necessary for establishing a causal association between this common infection and CAD.

**Key words** Chlamydia pneumoniae -  
Atherosclerotic coronary artery disease

### BIBLIOGRAFIA

1. Moazed TC, Kuo C, Grayston JT, Campbell LA. Murine models of Cp infection and atherosclerosis. *J Infect Dis* 1997; 175: 883-890.
2. Fong IW, Chiu B, Viira E, Fong MW, Jang D, Mahony J. Rabbit model for C pneumoniae infection. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 48-52.
3. Godzik KL, O'Brien ER, Wang SK, Kuo CC. In vitro susceptibility of human vascular wall cells to infection with Chlamydia pneumoniae. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2411-2414.
4. Blasi F, Denti F, Erba M y col. Detection of Cp but not Helicobacter pylori in atherosclerotic plaques of aortic aneurysms. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2766-2769.
5. Juvonen J, Juvonen T, Laurila A y col. Demonstration of Cp in the walls of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 1997; 25: 499-505.
6. Grayston JT, Kuo CC, Coulson AS y col. Cp (TWAR) in atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation* 1995; 92: 3397-3400.
7. Wimmer ML, Sandmann-Strupp R, Saikku P, Haberl RL. Association of chlamydial infection with cerebrovascular disease. *Stroke* 1996; 27: 2207-2210.
8. Melnick S, Shahar E, Folsom A. Past infection by Cp strain TWAR and asymptomatic carotid atherosclerosis. *Am J Med* 1993; 95: 499-504.
9. Thom D, Grayston T, Siscovick D, Wang S, Weiss N, Daling J. Association of prior infection with Cp and angiographically demonstrated coronary artery disease. *JAMA* 1992; 268: 68-72.
10. Saikku P, Mattila K, Nieminen MS y col. Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR with coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet* 1988; 2: 983-986.
11. Dahlén GH, Boman J, Birgander LS, Lindblom B. Lp(a) lipoprotein, IgG, IgA and IgM antibodies to Cp and HLA class II genotype and early coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1995; 114: 165-174.
12. Muhlestein JB, Hammond EH, Carlquist JF y col. Increased incidence of Chlamydia species within the coronary arteries of patients with symptomatic atherosclerotic versus other forms of cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 1555-1561.
13. Kuo CC, Grayston JT, Campbell LA, Goo YA, Wissler RW, Benditt EP. Cp (TWAR) in coronary arteries of young adults (15-34 years old). *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 6911-6914.
14. Ong G, Thomas BJ, Mansfield AO, Davidson BR, Taylor-Robinson D. Detection and widespread distribution of Cp in the vascular system and its possible implications. *J Clin Pathol* 1996; 49: 102-106.
15. Juvonen J, Juvonen T, Laurila A y col. Immunohistochemical detection of Cp in abdominal aortic aneurysms. *Ann NY Acad Sci* 1996; 800: 236-238.
16. Ramirez JA. Isolation of Cp from the coronary artery of a patient with coronary atherosclerosis. The Chlamydia pneumoniae. Atherosclerosis Study Group. *Ann Intern Med* 1996; 125: 979-982.
17. Saikku P, Leinonen M, Tenkanen L y col. Chronic Chlamydia pneumoniae infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *Ann Intern Med* 1992; 116: 273-278.
18. Jauhiainen T, Tuomi T, Leinonen M, Kark JD, Saikku P. Interference of immunoglobulin G (Ig G) antibodies in Ig A antibody determinations of Chlamydia Pneumoniae by microimmunofluorescence test. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 839-840.
19. Gupta S, Leatham E, Carrington D, Mendall M, Kaski JC, Camm J. Elevated Cp antibodies, cardiovascular events and azithromycin in male survivors of myocardial infarction. *Circulation* 1997; 96: 404-407.
20. Gurfinkel E, Bozovich G, Daroca A, Beck E, Mautner B for the ROXIS Study Group. Randomized trial of roxithromycin in non Q wave coronary syndromes: ROXIS pilot study. *Lancet* 1997; 350: 404-407.