



**Universidad de Granada**  
**Facultad de Medicina**  
**Departamento de Microbiología**

**Desarrollo de una técnica de  
Western-blot para la detección de  
anticuerpos anti-*Chlamydophila  
pneumoniae***

**Matilde María Palanca Giménez**  
**Granada, 2005**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Matilde María Palanca Giménez  
D.L.: Gr. 1047 - 2005  
ISBN: 84-338-3475-4



D. JOSÉ GUTIÉRREZ FERNÁNDEZ, PROFESOR TITULAR DE MICROBIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE GRANADA

**CERTIFICA:**

Que D<sup>a</sup> MATILDE MARÍA PALANCA GIMÉNEZ, licenciada en Farmacia, ha realizado el trabajo de Tesis Doctoral bajo mi dirección, sobre el tema “Desarrollo de una técnica de Western-blot para la detección de anticuerpos anti-*Chlamydomydia pneumoniae*”, el cual ha finalizado con aprovechamiento, para optar al Título de Doctora, siempre que así lo considere el superior juicio del tribunal nombrado al efecto.

**Fdo: D. JOSÉ GUTIÉRREZ FERNÁNDEZ**





D. JOSÉ PATRICIO LINARES PALOMINO, PROFESOR ASOCIADO DE CIRUGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE GRANADA

**CERTIFICA:**

Que D<sup>a</sup> MATILDE MARÍA PALANCA GIMÉNEZ, licenciada en Farmacia, ha realizado el trabajo de Tesis Doctoral bajo mi dirección, sobre el tema “Desarrollo de una técnica de Western-blot para la detección de anticuerpos anti-*Chlamydomyces pneumoniae*”, el cual ha finalizado con aprovechamiento, para optar al Título de Doctora, siempre que así lo considere el superior juicio del tribunal nombrado al efecto.

**Fdo: D. JOSÉ PATRICIO LINARES PALOMINO**





D<sup>a</sup> ALMUDENA ROJAS GONZÁLEZ, DOCTORA EN MEDICINA Y DIRECTORA GERENTE DE LA EMPRESA VIRCELL S.L.

**CERTIFICA:**

Que D<sup>a</sup> MATILDE MARÍA PALANCA GIMÉNEZ, licenciada en Farmacia, ha realizado el trabajo de Tesis Doctoral bajo mi dirección, sobre el tema “Desarrollo de una técnica de Western-blot para la detección de anticuerpos anti-*Chlamydomydia pneumoniae*”, el cual ha finalizado con aprovechamiento, para optar al Título de Doctora, siempre que así lo considere el superior juicio del tribunal nombrado al efecto.

**Fdo: D<sup>a</sup> ALMUDENA ROJAS GONZÁLEZ**



Antes de iniciar el desarrollo del presente trabajo, deseo expresar mi más sincera gratitud a todos aquellos que con su ayuda lo han hecho posible:

A mis directores, los profesores José Gutiérrez Fernández, José Patricio Linares Palomino y Almudena Rojas González, por descubrir y cultivar en mí un verdadero y creciente interés por estos organismos, así como por la colaboración e interés constante que han prestado a lo largo de la realización de esta Tesis Doctoral.

A la doctora Ana Camacho, del Servicio de Biología Molecular de la empresa Vircell SL por su colaboración en los estudios de Western-blot.

A los Profesores Gonzalo Piédrola Angulo y María del Carmen Maroto Vela de la Facultad de Medicina de Granada, por el apoyo institucional y estímulo a lo largo de estos años.

A los facultativos y compañeros del Servicio de Microbiología del Hospital “San Cecilio”, Juan Román, José Liébana, José Antonio Pérez, Marta Álvarez, Trinidad Escobar, Fernando García, Carmen Bernal y Federico García, por haberme dejado tiempo libre para la realización de este trabajo de investigación.

A los compañeros en el recorrido de la Microbiología durante cuatro años: Sonia Suárez, Fernando Fernández, Rosa Daza, Francis Arjona, Natalia Chueca, Alejandro Peña, Silvia Carlos por los momentos compartidos y en especial a Antonio Sorlózano por la ayuda prestada.

A los administrativos, auxiliares y técnicos de laboratorio, por los buenos momentos compartidos, cada día, durante estos años.

A los miembros del grupo de investigación CTS521, por el apoyo técnico y económico prestado.

A la “Fundación Hospital Clínico”, por favorecer, en el ámbito del Hospital “San Cecilio”, la realización de trabajos de investigación.

A mis amigos Sandra, Bernardo, César, Mercedes, Luís, Mar, M<sup>a</sup> del Mar, Javi, Raquel y Raúl por el estímulo prestado.

A todos, gracias.



*A MI FAMILIA*  
*A RAÚL GARRIDO SEGURA*



# ÍNDICE



	Págs.
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>21</b>
<b>1.1. Taxonomía de <i>Chlamydophila pneumoniae</i></b>	<b>23</b>
<b>1.2. Características microbiológicas: ciclo celular</b>	<b>24</b>
<b>1.3. Antígenos</b>	<b>30</b>
<b>1.3.1. El peptidoglucano</b>	<b>30</b>
<b>1.3.2. Proteínas de la envuelta celular</b>	<b>32</b>
<b>1.3.2.1. Lipopolisacárido</b>	<b>32</b>
<b>1.3.2.2. Proteínas de inclusión</b>	<b>35</b>
<b>1.3.2.3. Proteínas polimórficas de membrana</b>	<b>36</b>
<b>1.3.2.4. Proteínas ricas en cisteína</b>	<b>37</b>
<b>1.3.2.5. Proteínas principales de la membrana externa (MOMPs)</b>	<b>38</b>
<b>1.3.2.6. Otras proteínas de la membrana externa</b>	<b>39</b>
<b>1.3.3. Proteínas del proceso celular</b>	<b>39</b>
<b>1.3.3.1. Chaperonas</b>	<b>40</b>
<b>1.3.3.2. Sistema de secreción tipo III</b>	<b>40</b>
<b>1.3.4. Proteínas relacionadas con la biosíntesis de cofactores, grupos prostéticos y transportadores metabólicos</b>	<b>42</b>
<b>1.3.5. Proteínas relacionadas con la degradación proteica</b>	<b>42</b>
<b>1.3.6. Proteínas relacionadas con la transcripción</b>	<b>42</b>
<b>1.3.7. Proteínas relacionadas con la traducción</b>	<b>42</b>
<b>1.3.8. Proteínas relacionadas con el metabolismo intermediario</b>	<b>42</b>
<b>1.3.9. Proteínas relacionadas con el metabolismo energético: Enolasa</b>	<b>42</b>
<b>1.3.10. Proteínas relacionadas con el metabolismo de ácidos grasos y fosfolípidos</b>	<b>43</b>
<b>1.3.11. Purinas, pirimidinas, nucleósidos y nucleótidos</b>	<b>43</b>
<b>1.3.12. Proteínas con funciones reguladoras</b>	<b>43</b>
<b>1.3.12.1. Hsp 70 kDa</b>	<b>43</b>

1.3.12.2. Proteína de respuesta baja en calcio	43
1.3.13. Otras proteínas	44
1.4. Patogenia de la infección. Modelos animales	45
1.5. Enfermedad relacionada. Arteriosclerosis: patogenia	48
1.6. Epidemiología	59
1.7. Diagnóstico de laboratorio	60
1.7.1. Métodos indirectos	60
1.7.2. Métodos directos	63
1.8. Tratamiento y prevención de la enfermedad asociada	68
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>71</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>75</b>
3.1. Parámetros descriptores estudiados	77
3.2. Grupo de casos	79
3.2.1. Criterios de selección	79
3.2.2. Criterios de exclusión	81
3.2.3. Criterios diagnósticos	82
3.2.4. Datos epidemiológicos	84
3.3. Grupo control	89
3.3.1. Criterios de selección	90
3.3.2. Criterios de exclusión	90
3.3.3. Criterios diagnósticos	91
3.3.4. Datos epidemiológicos	92
3.4. Obtención de muestras para el estudio	95
3.4.1. Muestras para serología	95
3.4.2. Biopsias de arteria	95
3.4.2.1. Grupo de casos	95
3.4.2.2. Grupo control	100
3.5. Metodología analítica	101
3.5.1. Nivel de colesterol	102

3.5.2. Niveles de triglicéridos	102
3.5.3. Niveles de fibrinógeno	103
3.5.4. Investigación del ADN de <i>C. pneumoniae</i>	104
3.5.5. Inmunofluorescencia indirecta	109
3.5.6. ELISA	110
3.5.6.1. ELISA IgG e IgA anti cuerpo elemental	110
3.5.6.2. ELISA IgG e IgA anti lipopolisacárido	110
3.5.7. Western-blot comercial de <i>C. pneumoniae</i>	111
3.5.8. Western-blot “in house” de <i>C. pneumoniae</i>	112
3.5.8.1. Electroforesis en SDS-PAGE	112
3.5.8.2. Inmunotransferencia	116
3.5.8.3. Inmunodetección	117
3.6. Método estadístico	118
APÉNDICE	120
ANEXO: Consentimiento informado	123
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>125</b>
4.1. Características clínicas de los casos y controles	127
4.2. Detección del ADN de <i>C. pneumoniae</i> en diferentes muestras	129
4.3. Seroprevalencia de la infección	129
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>153</b>
5.1. Estudio mediante Western-blot comercial	160
5.2. Estudio mediante Western-blot “in house”	164
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>169</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>173</b>



## **ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTE TEXTO**

**ACM:** Arteria cerebral media

**Acs:** Anticuerpos

**ACV:** Accidente cerebrovascular

**AIT:** Accidente isquémico transitorio

**AT:** Arteriosclerosis

**CDC:** Center for Diseases Control (EEUU)

**CE:** Cuerpo elemental

**CI:** Cuerpo de inclusión

**Cp:** *Chlamydomphila pneumomniae*

**CPE:** Cuerpo persistente

**CR:** Cuerpo reticular

**CTS:** Ciencia y Tecnología de la Salud (Junta de Andalucía)

**EAPO:** Enfermedad arterial periférica oclusiva

**EPOC:** Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

**Hsp:** Heat shock protein (Proteína de shock térmico)

**ICAM-1:** Intercellular adhesion molecule-1 (Moléculas de adhesión intercelular tipo I)

**IDO:** Indoleamina 2,3-diooxigenasa

**Inc:** Inclusión

**KDO:** Ácido ceto-deoxi-octulosónico

**LPS:** Lipopolisacárido

**MOMP:** Mayor outer membrane protein (Proteína principal de la membrana externa)

**NIH:** National Institute of Health (EEUU)

**NIST:** National Institute of Standards and Technology (EEUU)

**OMC:** Outer membrane complex (Complejo de la membrana externa)

**OMP:** Outer membrane protein (Proteínas de membrana externa)

**Pmps:** Polimorfic membrane proteins (Proteínas polimórficas de membrana)

**SDS-PAGE:** Dodecil sulfato sódico-electroforesis en gel de poliacrilamida

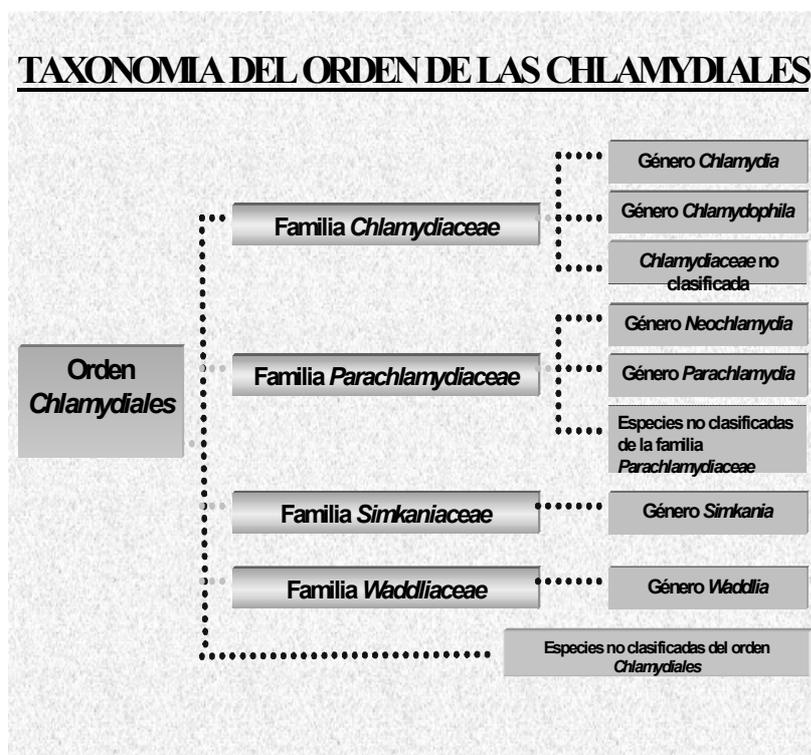
**VCAM-1:** Vascular cell adhesion molecule-1 (Moléculas de adhesión vascular tipo I)

# **1. INTRODUCCIÓN**



### 1.1. Taxonomía de *Chlamydophila pneumoniae*

La familia *Chlamydiaceae* pertenece al orden *Chlamydiales*, e incluye los géneros *Chlamydia* y *Chlamydophila* (Everett y cols., 1999). Las especies de interés clínico humano son *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci* y *Chlamydia trachomatis*. No obstante, junto a los géneros anteriores, patógenos humanos, existen otros pertenecientes al orden *Chlamydiales* que carecen, en estos momentos, de interés clínico (figura 1).



**Figura 1:** Taxonomía del orden *Chlamydiales*

*C. pneumoniae*, antes denominada *Chlamydia* TWAR, es un agente productor de enfermedad respiratoria aguda, incluyendo neumonía, bronquitis, sinusitis y faringitis. Este organismo fue por primera vez aislado en 1965 de la conjuntiva de un niño taiwanés que participaba en la vacunación anti-tracoma (Kuo y cols., 1986). El aislamiento inicial se realizó en saco embrionario de huevo de pollo, siendo éste el

único microorganismo presente.

En 1971, mediante cultivo celular, este microorganismo (TW-183) se observó en forma de inclusiones densas dentro de las células, similares a las observadas con *C. psittaci*, y diferentes a las vistas para *C. trachomatis*. Posteriormente, Dwyer y cols. (1972) aislaron en huevos embrionarios un microorganismo (IOL-207) similar al anterior, a partir del ojo de un niño iraní. A pesar de que el origen de estos dos aislamientos fue la conjuntiva, los estudios de laboratorio sugirieron que el organismo no estaba produciendo enfermedad ocular.

El papel de este microorganismo como patógeno humano no fue definido hasta 1983, cuando se realizó el primer aislamiento respiratorio (AR-39) en Seattle, Washington, de un estudiante universitario con faringitis (Grayston y cols., 1986). La relación entre el microorganismo TW-183 y la neumonía se estableció mediante pruebas serológicas (Saikku y cols., 1985). Por eso, el nombre inicial de “cepa TWAR” que se dio a *C. pneumoniae*, deriva de las designaciones realizadas por parte de los laboratorios que las aislaron por primera vez de la conjuntiva y del aparato respiratorio (TW-183 y AR-39, respectivamente).

## **1.2. Características microbiológicas: Ciclo celular**

Esta bacteria carece de peptidoglucano, aunque posee los genes que codifican los enzimas necesarios para su síntesis. En caso de que exista en la bacteria, su presencia es testimonial, ya que no se puede detectar por los métodos habituales.

El genoma tiene un masa molecular de sólo  $660 \times 10^6$  daltons, más pequeño que en otras procariontas, con la excepción de *Mycoplasma*. Igualmente, carece de ADN extracromosómico. (Jones y Batteiger, 2000). Los diferentes aislamientos de *C. pneumoniae*, realizados hasta la fecha, tienen una homología genética del 94 al 100%, y de menos del 10% con *C. trachomatis* y *C. psittaci* (Cox y cols., 1988).

Estructuralmente contiene regiones conservadas intercaladas por cuatro regiones variables que contienen secuencias cortas, que codifican la proteína principal de la membrana externa (MOMP), presentes en todas las clamidias (Yuan y cols., 1989). A diferencia de lo descrito con las especies de clamidias patógenas humanas, en las que existe una importante variabilidad en las secuencias de MOMP, esto no ocurre con la secuencia de *C. pneumoniae* (Pérez y cols., 1993).

Finalmente, se han descrito dos genes que codifican las proteínas de shock térmico de 60 y 70 kDa (Hsp; los homólogos de *groel* y *dnak* de *C. trachomatis*, respectivamente) (Kikuta y cols., 1991; Kornak y cols., 1991). Estas Hsp se encuentran en el complejo proteico de la membrana externa, son inmunógenas (Iijima y cols., 1994) y altamente conservadas (Stratton, 1998).

*C. pneumoniae* es una bacteria intracelular estricta, por carecer de la capacidad de síntesis de compuestos energéticos que son obtenidos de la célula que infecta. Por lo tanto, para recuperarla en el laboratorio, se requieren células vivas.

*C. pneumoniae* ha desarrollado una auxotrofia de todos los aminoácidos, excepto la lisina, para el crecimiento en cultivo celular (Kuo y Grayston, 1990). Comparativamente, *C. trachomatis* requiere todos los aminoácidos excepto la treonina.

En su ciclo vital adopta dos morfologías redondeadas diferentes, denominadas cuerpo elemental (CE) y reticular (CR). El CE (figura 2) tiene un tamaño entre 0,2 y 0,4  $\mu\text{m}$ , es extracelular, no obtiene nutrientes del exterior, carece de actividad metabólica y de replicación, infecta células, y es muy resistente a los factores ambientales gracias a las proteínas presentes en su membrana externa, con abundantes aminoácidos azufrados, que forman un entramado externo. El CE de *C. pneumoniae* tiene una forma característica de pera, con un espacio periplasmático

periférico. Es morfológicamente distinto del CE esférico de *C. trachomatis* y *C. psittaci*. No obstante, se han descrito también CE esféricos (Kanamoto y cols., 1993). Aunque se desconoce el significado último de esta morfología específica, parece que facilita la infección y está relacionado con una mayor laxitud de la pared celular.



**Figura 2:** Caracteres generales de los cuerpos elementales y reticulares de las Clamidias.

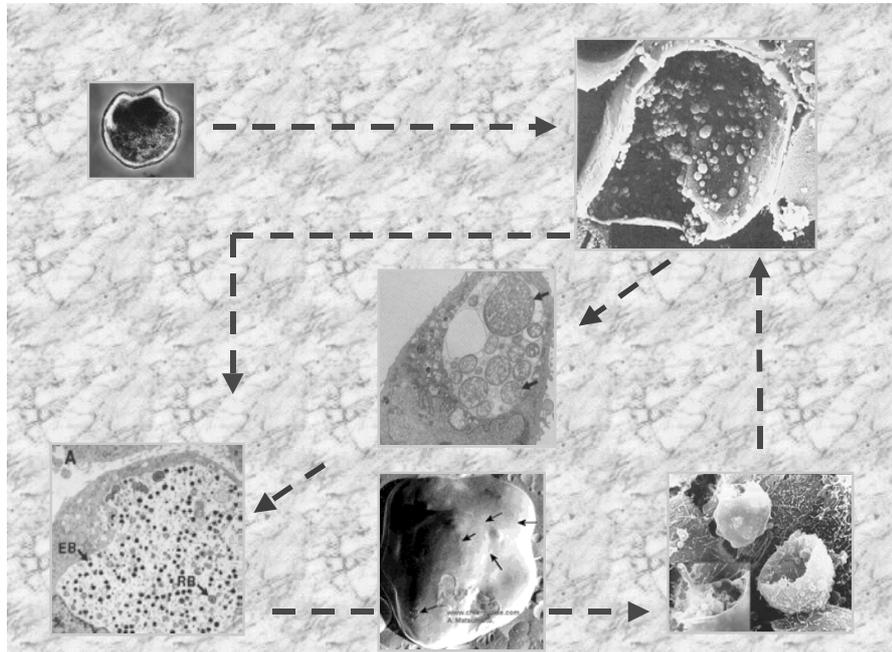
El CR es lábil, tiene un tamaño entre 0,6 y 1,2  $\mu\text{m}$  y es intracelular. Procede de la transformación del CE cuando entra en la célula hospedadora. Obtiene nutrientes del citoplasma de la célula y se multiplica por división binaria.

El paso de CE a CR, y viceversa, requiere un ciclo intracelular de 2-4 días (figuras 3 y 4). Durante éste los CE se fijan a las células por un mecanismo adhesina-receptor no bien conocido (parece que interviene un glucosaminoglucano semejante al sulfato de heparina).

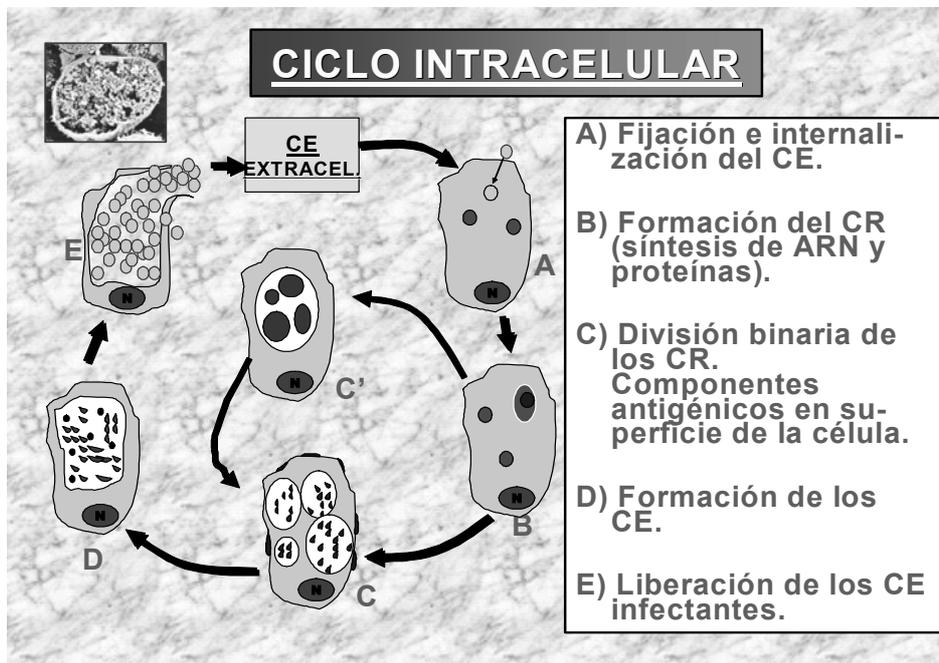
Los CE infectan a la célula hospedadora mediante la formación de protuberancias en la pared celular, invaginación de la membrana de la célula hospedadora y formación de vesículas con vacuolas endocíticas (Kuo y cols., 1988a). Se forma un fagosoma, pero no fagolisosoma. Entonces se modifica su membrana externa, se pierden los aminoácidos azufrados y se activan las porinas.

El CE se transforma en CR cuando penetran metabolitos, tales como los fosfatos ricos en energía y aminoácidos, con aumento de la actividad metabólica, como la de la ATPasa. Ésta es una ATPasa tipo-F y puede competir con la ATPasa mitocondrial de la célula infectada. Esto reduciría la producción de ATP por la mitocondria, y llevaría a una menor transferencia de electrones en la célula infectada, afectando a la cadena respiratoria. (Stratton y Mitchel, 1997a).

El CR se divide de forma binaria y continua, y quedan agrupados en el fagosoma formando los cuerpos de inclusión (CI), visibles al microscopio óptico. El CI y la célula infectada muestran en su superficie antígenos derivados de la bacteria. Los CR madurarán, reduciendo el tamaño y reorganizando su membrana externa recordando los CE. En este momento los CI contendrán CR y CR maduros, futuros CE. Finalmente, todas las células se transforman en CE y se liberan por lisis, extrusión o exocitosis desde la célula.



**Figura 3:** Esquema del ciclo replicativo de *C. pneumoniae*.



**Figura 4:** Ciclo replicativo de *C. pneumoniae*.

Debido a algunas condiciones ambientales, o al propio agente infeccioso, el ciclo se puede detener, permanente o temporalmente, en la fase de CR; ahora se denomina cuerpo persistente (CPE). La persistencia se define como un largo período en el cual este microorganismo permanece en un estado viable, pero no se recupera mediante cultivo.

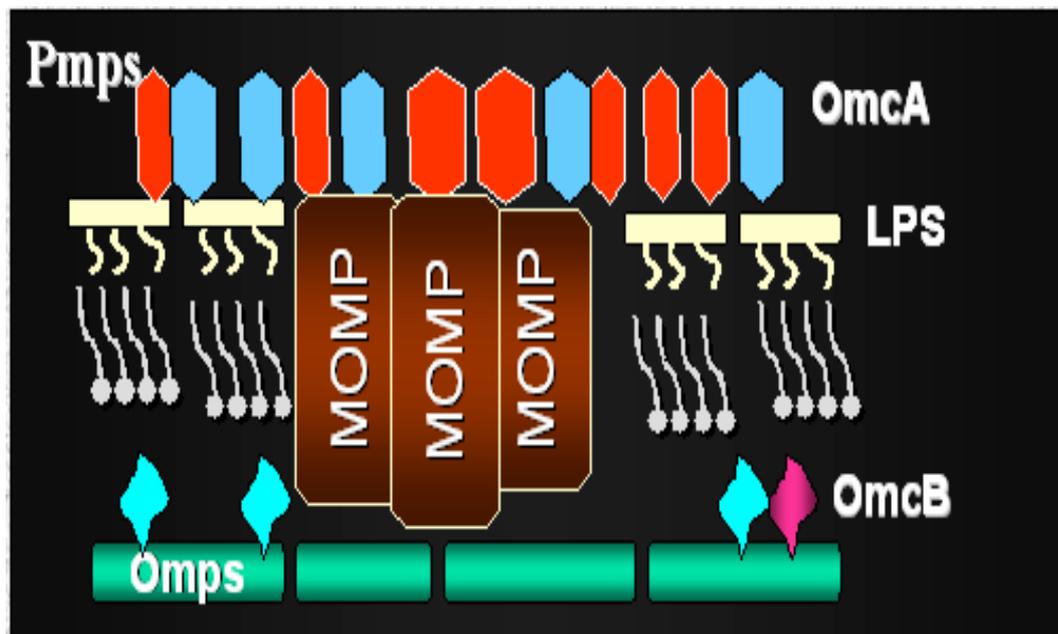
Las clamidias pueden persistir debido a su habilidad para entrar en un estado críptico de quiescencia, que incluye alteraciones en la expresión de antígenos, alteración de la morfología y pérdida de la infectividad.

Aunque no se replican, estas formas crípticas parece que juegan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad debido a la producción de Hsp (Stratton, 1998). Beatty y cols. (1994) realizaron estudios de cultivo en línea celular con epitelio de faringe humana y determinaron que el mecanismo que induce a entrar en un estado persistente es la presencia de bajos niveles de IFN- $\gamma$ .

Estos CPE son CR más grandes, que, por menor número de porinas, se dividen lentamente. Entonces se expresan menos antígenos bacterianos. Se puede considerar a los CPE como una adaptación de la bacteria al hospedador para evitar el sistema inmunológico o mantenerse viable en condiciones adversas. Este estadio puede ser una fase temporal y luego continuarse el ciclo, como antes se ha comentado. Los CPE se han observado *in vivo*, en infecciones crónicas para evadir el sistema inmunológico, e *in vitro*, en presencia de penicilina o ausencia de aminoácidos azufrados. Su presencia tiene repercusiones diagnósticas: falsos negativos del inmunodiagnóstico, por menor presencia de antígenos bacterianos, y del cultivo celular, por menor viabilidad del CPE; y menor respuesta al tratamiento por pérdida de porinas y expresión de dianas.

### 1.3. Antígenos

El análisis de los antígenos específicos fue realizado por primera vez por Kuo y cols. (1986). Los antígenos (figura 5) de la bacteria son complejos y sólo parcialmente conocidos. Se localizan en la membrana externa y, entre otros, destacan los siguientes grupos:



**Figura 5:** Antígenos de *C. pneumoniae*

#### 1.3.1. El peptidoglucano

Existen estudios, inicialmente referidos a *C. trachomatis*, en los que se comprobó que la penicilina o la cicloserina afectaban negativamente el proceso de división celular de los CRs, lo que hizo pensar en la posible presencia de peptidoglucano en los mismos (Matsumoto y Manire, 1970). También apoyó esta hipótesis la presencia en el genoma del serovar D de *C. trachomatis*, de genes capaces de codificar las enzimas necesarias para sintetizar el peptidoglucano (Stephens y cols., 1998). Se ha sugerido que el papel del peptidoglucano en el CR es sustituir la función de las proteínas ricas en cisteína presentes en la envuelta celular

del CE, participar en la división de la bacteria (Holtje, 1998) o en la adhesión a la membrana y la superficie celular (Rockey y Matsumoto, 1999).

Los estudios efectuados con objeto de detectar ácido N-acetilmurámico, la molécula característica del peptidoglucano, no han arrojado resultados concluyentes, o las proporciones encontradas no superaron el nivel de trazas al compararlas con las de alguna bacteria gramnegativa como *Escherichia coli* (Su y Li, 1985).

En CR los estudios destinados a encontrar peptidoglucano han fracasado, debido a la fragilidad osmótica del CR que hace que sea muy difícil aislarlo puro fuera del hospedador (Barbour y cols., 1982).

Por consiguiente, no se puede descartar la presencia en los CRs.

Existen diferentes enzimas que participan en la formación del peptidoglucano ([www.stdgen.lanl.gov/](http://www.stdgen.lanl.gov/)) (consulta 30/05/2005):

1. Amilasa N-acetilmuramoil-l-alanina (*amiA*). Participa en la biosíntesis del peptidoglucano y tiene un peso molecular de 29,4 kDa.
2. Ligasa D-glutamato-2,6-diaminopimelato N-acetilmuramoilalanil (*murE*). Tiene un peso molecular de 52,7 kDa.
3. Proteína fijadora de penicilina 2 (*pbp2 penA*). Tiene un peso molecular de 73,65 kDa.
4. Transferasa 1-Carboxivinil de UDP-N-acetilglucosamina (*murA*). Presenta una mutación que causa resistencia a la fosfomicina. Tiene un peso molecular de 49,3 kDa.
5. Carboxipeptidasa D-alanil-D-alanina (*PBP 6*) (*dacC*). Tiene un peso molecular de 49,1 kDa.
6. Proteína fijadora de penicilina 2 (*pbpB*). Tiene un peso molecular de 124,07 kDa.
7. Pirofosforilasa de UDP-N-acetilglucosamina (*glmU*). Tiene un peso molecular

de 22,7 KDa.

8. Ligasa- 2,6, - diaminopimelato D -alanina- D-alanina N-acetilmuramoilalanil - D-glutamato (*murF*). Tiene un peso molecular de 49 kDa.
9. FosfoTransferasa -N-acetilmuramoil pentapéptido (*mraY*). Tiene un peso molecular de 38,5 kDa.
10. Ligasa N-acetilmuramoil-L-alanina-D-glutamato (*murD*). Tiene un peso molecular de 46,2 kDa.
11. Transferasa GLCNAC (transferasa pirofosforil-undecaprenol N-acetilglucosamina UDP -N- acetilglucosamina -N -acetilmuramil - (pentapeptido) (*murG*). Tiene un peso molecular de 39,4 kDa.
12. Ligasa (proteínas de fusión) (*murF murC*). Tienen un peso molecular de 89,9 kDa.
13. Aminotransferasa fructosa-6-fosfato glucosamina (*glmS*). Tiene un peso molecular de 67,18 kDa.
14. Reductasa UDP-N-acetilenolpiruvoilglucosamina (*murB*). Participa en la biosíntesis de la pared celular, reduciendo UDP-N-acetilmuramato a UDP-N-acetil-3-O-(1-carboxivinil)-D-glucosamina. Tiene un peso molecular de 33,47 kDa.

### **1.3.2. Proteínas de la envuelta celular**

#### **1.3.2.1. Lipopolisacárido**

El lipopolisacárido (LPS) es una molécula antigénica presente en todos los miembros de la familia *Chlamydiaceae*. Su presencia se ha demostrado mediante fijación del complemento (Schachter y Brockhausen, 1992), inmunofluorescencia (Karimi y cols., 1989) y ELISA.

Está presente en los CEs y CRs, en la membrana de las células infectadas y en la región proximal de células anejas a la anterior y no infectadas.

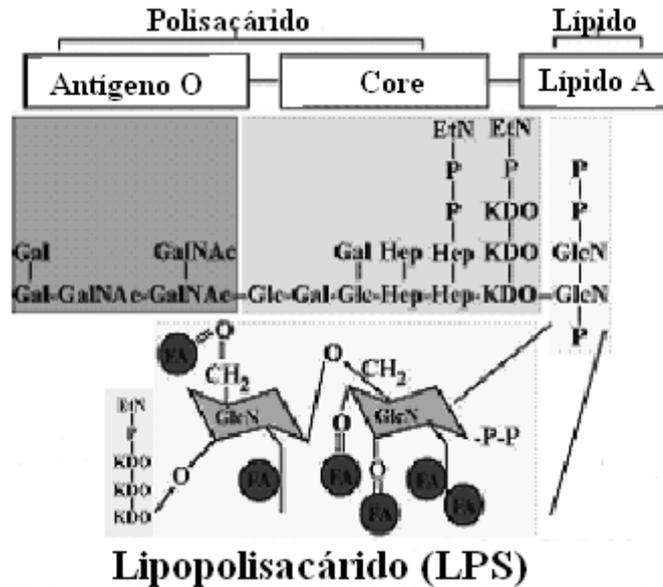
Su presencia se ha demostrado a las 20 horas de la infección celular. Dado que el área de los CRs es diez veces superior a la de los CEs, durante la condensación necesaria para dicha transformación es probable que sean expulsadas grandes cantidades de LPS a través de vesículas desde la inclusión intracelular al citoplasma y la superficie de la célula. Este hecho apoya la hipótesis que implica al LPS en la patogenia de las manifestaciones clínicas asociadas a *C. pneumoniae* (Campbell y cols., 1994).

El LPS de la familia *Chlamydiaceae* es cien veces menos potente que el de *Salmonella minnesota* o *Neisseria gonorrhoeae* como inductor de citoquinas inflamatorias y a su capacidad endotóxica (Ingalls y cols., 1995). Esto se puede deber a la composición diferente en ácidos grasos y se puede relacionar con la naturaleza subclínica de la mayor parte de las infecciones causadas por la primera. Finalmente, el LPS clamidial carece del polisacárido O debido a la ausencia de los genes necesarios (*rfa* y *rfb*) para su formación.

Desde un punto de vista antigénico se han descrito un antígeno específico de familia y otro común con las enterobacterias en fase de quimiotipo rugoso (Lentschat y cols., 1999; Haralambieva y cols., 2001; Mitov y cols., 2003) y *Acinetobacter calcoaceticus* (Brade y cols., 1986) (figura 6). El primero se identificó como un trisacárido del ácido 3-desoxi-D-mano-octulosónico (KDO) con la secuencia KDOp-(2----8)-KDOp-(2----4)-KDO (Belunis y cols., 1992). Además el KDO de *Chlamydiaceae* coincide con las bacterias gramnegativas en el KDO-disacárido con enlaces  $\alpha$ -2-4 (Leinonen, 1993).

De manera indirecta y no bien caracterizada, se han supuesto también en el LPS de *C. pneumoniae* epítomos específicos de especie debido a la capacidad de neutralización por anticuerpos monoclonales (Peterson y cols., 1998). Del mismo modo, los estudios con anticuerpos monoclonales han sugerido que, durante el

proceso de transformación de los CRs en CEs, la estructura del LPS puede sufrir algún cambio (Birkelund y cols., 1988; Birkelund y cols., 1989)



**Figura 6:** LPS de enterobacterias

Existen diferentes enzimas que participan en la formación del LPS ([www.stdgen.lanl.gov/](http://www.stdgen.lanl.gov/)) (consulta 30/05/2005):

- Sintetasa del KDO-citosina monofosfato (CMP) (citidiltransferasa del CMP-3-desoxi-D-mano-octulosonato) (*kdsB*). Se encontró que su peso molecular era de 28,41 kDa (Vandahl y cols., 2001a; Vandahl y cols., 2002a; Vandahl y cols., 2004) y se localiza en la envuelta celular. Esta enzima añade CMP al KDO (Strohmaier y cols., 1995).
- Transferasa del ácido 3-desoxi-D-mano-2-octulosónico (*gseA kdtA*). Tiene un peso molecular de 49,17 kDa y se encuentra en la superficie celular. Este enzima es típicamente parecido al de las bacterias gramnegativas y cataliza la transferencia de 2 residuos KDO a precursores del lípido A (1-4'-bifosfato

tetraacil disacárido), designado lípido IV<sub>a</sub> (Belunis y cols., 1992) que confiere epítomos específicos de género al LPS (Belunis y cols., 1995).

- Sintetasa del disacárido del lípido A (*lpxB*). Tiene un peso molecular de 69 kDa y se encuentra en la envuelta celular. Este enzima cataliza la formación del lípido a disacárido, un precursor del lípido A, responsable del anclamiento a la membrana externa de la célula.
- Aciltransferasa UDP-N-acetilglucosamina (*lpxA*). Tiene un peso molecular de 30,33 kDa y se encuentra en la envuelta celular. Este enzima participa en el primer paso de la biosíntesis del lípido A.
- Aldolasa 2-dehidro-3-desoxifosfooctonato (*kdsA*). Tiene un peso molecular de 28,98 kDa y se encuentra en la envuelta celular. Participa en el primer paso de la biosíntesis del LPS, dando lugar al 2-dehidro-3-desoxi-D-octonato-8-fosfato que es requerido para la maduración y crecimiento del lípido A.
- Desacetilasa del UDP-3-O-acil-GlcNA (*lpxC*). El peso molecular es de 31,03 kDa (Vandahl y cols., 2001a; Vandahl y cols., 2002a; Vandahl y cols., 2004) y se encuentra en la envuelta celular. Este enzima participa en el segundo paso de la biosíntesis del lípido A (Young y cols., 1995).
- N-aciltransferasa del UDP-3-O-(R-3-hidroxi-*miristoil*)-glucosamina, (*lpxD*) con un peso molecular de 38,84 kDa (Vandahl y cols., 2001a; Vandahl y cols., 2002a; Vandahl y cols., 2004) que se encuentra en la envuelta celular. Cataliza la formación de UDP-2,3-bis glucosamina (3-hidroxi-*miristoil*) y de la proteína del portador del acil.
- Fosforilasa UDP-glucosa. Tiene un peso molecular de 51,97 kDa y se encuentra en la envuelta celular. Potencial donante de glucosa en muchas rutas metabólicas: pentosas, galactosa, nucleótidos, etc.

### 1.3.2.2. Proteínas de inclusión

Las proteínas de inclusión (Inc) ([www.stdgen.lanl.gov/](http://www.stdgen.lanl.gov/)) se localizan en la membrana de los CI de *C. pneumoniae* y el resto de miembros del orden

*Chlamydiales*. Para ello utiliza un sistema tipo III de secreción (Rockey y Matsumoto, 1999). Cada proteína posee un dominio hidrofóbico único de 50 a 80 aminoácidos (Bannantine y cols., 2000; Rockey y cols., 2002). Sus funciones se han relacionado con el desarrollo de la inclusión, la evasión del sistema inmunológico, la adquisición de nutrientes e, incluso, son mediadores en los procesos de transición de CRs a CEs y viceversa. Constituyen una familia de proteínas que juegan un importante papel en la infección, crecimiento y supervivencia en el hospedador celular (Toh y cols., 2003). Incluye las proteínas IncA, IncB (18,09 kDa) e IncC (21,41 kDa).

### **1.3.2.3. Proteínas polimórficas de membrana**

Las proteínas polimórficas de la membrana externa (Pmps) ([www.stdgen.lanl.gov/](http://www.stdgen.lanl.gov/)) son porinas lipoproteicas. Se pusieron de manifiesto, por primera vez, en *C. psittaci* (Cevenini y cols., 1991; Souriau y cols., 1994). Su superficialidad e inmunogenicidad justifican el interés por estas proteínas (Lindquist y Stephens, 1998). Existen 21 Pmps en *C. pneumoniae*; son ricas en serina y fenilalanina; y son polimórficas, ya que sus genes sufren mutaciones que originan variaciones en la estructura (Grimwood y cols., 2001). Se piensa que la variabilidad depende del número de residuos de guanina, y no está claro si se debe a la presión del sistema inmunológico o es intrínseca.

Las Pmps A (Pmp 19 de 103,6 kDa), B/C y D (Pmp 21) (parece ser una citolisina de 170,8 kDa que contribuye a la rotura de la célula hospedadora y salida del CE) no se expresan, y si lo hacen, es en una proporción muy pequeña. En cambio, las familias E (Pmp 17 de 44,3 kDa, Pmp 16 de 102,1 kDa, Pmp 15 de 102,2 kDa), F2 (Pmp 18 de 103,6 kDa), G y H (Pmp 14 de 103,6 kDa) son las más expresadas. Las PMPs G incluyen proteínas de pesos moleculares de 89,6 kDa (Pmp 2), 97,6 kDa (Pmp 8), 98,3 kDa (Pmp 9), 98,9 kDa (Pmp 11), 100,1 kDa (Pmp 7), 100,4 kDa (Pmp 1), 102,7 kDa (Pmp 13), 179,6 kDa (Pmp 20) y 144,92 kDa (Pmp 6) (Vandahl y cols., 2001a; Vandahl y cols., 2002b). Las Pmps I contienen proteínas

de 56,08 kDa (Pmp 12) y las Pmps F de 103,61 kDa (Pmp 18).

Las Pmps 6, 20 y 21 se encuentran enclavadas, por lo que, posiblemente, tienen un papel en la entrada al hospedador (transportadores tipo V) (Grimwood y Stephens, 1999; Henderson y Lam, 2001; Birkelund y cols., 2002; Vandahl y cols., 2002b; Shirai y cols., 2000).

### **1.3.2.4. Proteínas ricas en cisteína**

Las proteínas ricas en cisteína ([www.stdgen.lanl.gov/](http://www.stdgen.lanl.gov/)) están presentes en grandes cantidades en el CE y se sintetizan de manera tardía en la maduración del CR hacia CE. No están presentes en el CR (a diferencia de las MOMP) (Newhall, 1987). Se han denominado OmcA y OmcB por su asociación con el complejo de membrana externa (OMC, outer membrane complex).

La estructura OmcA recuerda las lipoproteínas mureínicas de las bacterias gramnegativas. De 9 kDa, es una adhesina donde se fijan las moléculas de heparina. (glucosaminoglucano cuya función es formar un sandwich entre un receptor de la superficie celular y clamidia para facilitar la infectividad).

Está anclada en la membrana externa por su región lipídica, y la zona peptídica se extiende hacia el periplasma (Everett y cols., 1994). Más controvertida es la estructura de la OmcB, una proteína constituida, a su vez, por dos fracciones de unos 60 kDa (Hatch y cols., 1984). Se ha propuesto que OmcB se sitúa por encima de la capa interna de la membrana externa, constituyendo una red poliproteínica (Miyashita y cols., 1993) unida a la mitad interna por su porción lipídica y extendiendo su fragmento hidrofílico de aminoácidos hacia el periplasma (Everett y Hatch, 1995). También se ha propuesto a la OmcB como una adhesina de localización periplásmica y con un extremo N-terminal extendido hacia la superficie, más o menos asociado a un canal hidrófilo de la membrana externa. En cualquier caso, el fragmento expuesto en la superficie sería muy escaso (Mygind y cols., 1998).

La posición de las cisteínas es muy constante, por lo que deben ser muy importantes. Es, además, inmunogénica, con epítomos específicos, pero no se piensa que se encuentre expuesta en la superficie, aunque recientemente se ha demostrado que se pueden unir a ella glucosaminoglicanos ( Montigiani y cols., 2002).

Finalmente, los puentes disulfuro de OmcB forman puentes cruzados con dominios periplásmicos de OmcA y de otras proteínas, contribuyendo a la estabilidad del CE (Everett y cols., 1994).

#### **1.3.2.5. Proteínas principales de la membrana externa (MOMPs)**

Son las proteínas que se hallan en mayor proporción (60%) en los CEs y CRs, codificadas por el gen *ompA* (*ompl*) y permeables al ATP. Tienen una masa molecular de unos 40 kDa (entre 41,6 kDa y 37,72 kDa) y un punto isoeléctrico de 5 (Baboil y cols., 1984). Son comunes a todos los miembros de la familia *Chlamydiaceae*, aunque presentan ligeras diferencias estructurales en cada una de las especies. Las regiones variables de la misma tienden a situarse en la superficie de la membrana, pero en *C. pneumoniae* no es inmunodominante, al contrario que en el resto de los miembros de la familia *Chlamydiaceae* (Christiansen y cols., 1997). Esto se ha intentado explicar por la supuesta incapacidad del sistema inmunológico para identificar los epítomos superficiales de las MOMPs, a causa de un mecanismo de interposición o enmascaramiento que ejercerían las proteínas polimórficas de membrana externa (PMPs) (Christiansen y cols., 1997).

A diferencia de las otras especies de clamidias, *C. pneumoniae* no permite establecer una variabilidad antigénica entre los aislados (Iijima y cols., 1994). Por todo ello, en principio, no parece tener un importante papel en la patogénesis de la enfermedad por *C. pneumoniae*. Diversos estudios sugieren que las MOMPs de *C. trachomatis* juegan un papel en la adhesión a las células (Fan y Stephens, 1997). Se ha especulado con la posibilidad de que faciliten las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas con la célula, que directamente reaccionen con algún receptor

superficial de aquella o, incluso, que participen en el proceso de ataque a través de su fracción glucosídica no proteica (Kuo y cols., 1996). No obstante, la única función típica de las MOMP's es la de actuar como porina. Para ello se deben encontrar químicamente reducidas, para mantener modificadas las proteínas ricas en cisteína y así establecer una situación sin enlaces que permita llevar a cabo su función de porina (Wyllie y cols., 1998). Esto hace pensar que las MOMP's sólo son activas a nivel intracelular (Bavoil y cols., 1984)

### 1.3.2.6. Otras proteínas de la membrana externa

- Lipoproteína asociada al peptidoglucano: Tiene un peso molecular de 21,9 kDa.
- Lipoproteína de membrana externa: Se encuentra unida a la membrana citoplasmática y tiene un peso molecular de 30,25 kDa.
- OMP H: Proteína de membrana externa, con un peso molecular de 19,46 kDa.
- Proteína de membrana interna: Tiene un 32% de similitud con la proteína TP0949 de *Treponema pallidum* y tiene un peso molecular de 89,32 kDa.
- Proteína de membrana externa Clamidia específica: Es una análoga a múltiples PMP's de la familia A, D, E, G y H, de *C. pneumoniae*. Tiene un peso molecular de 179,58 kDa.
- Omp 85 y otras proteínas de membrana externa: Omp 85 es una proteína de la envuelta externa, conservada y presente en muchas bacterias. No se conoce cual es su función. Parece ser un antígeno inmunoaccesible y los anticuerpos pueden neutralizar la infección *in vitro*. No funciona como porina (Stephens y Lammel, 2001). Su peso molecular es de 88,95 kDa.
- También se encuentran otras proteínas con pesos moleculares de 14,82 kDa y 22,69 kDa.

### 1.3.3. Proteínas del proceso celular

Integra proteínas que sirven para la adaptación a condiciones atípicas, división celular, detoxificación, transducción, producción de toxinas y resistencia, transporte

metabólico, función de chaperonas y la secreción. Dentro de este grupo destacamos las siguientes:

#### **1.3.3.1. Chaperonas**

Parte de ellas son proteínas de estrés (Hsp). Las chaperonas son proteínas que, en el caso concreto de una importante acidificación intracelular, corrigen el plegamiento incorrecto de las proteínas desnaturalizadas. La Hsp 60 es una proteína de shock térmico que muestra una débil actividad ATPasa y esta muy conservada. Parece estar implicada en los daños ocasionados en las arterias debido a la sobreestimulación de macrófagos y autoanticuerpos, lo que produciría citoquinas proinflamatorias y metaloproteinasas que degradarían el colágeno (Kol y cols., 1999; Vandahl y cols., 2001a; Lamb y cols., 2002)

Se relaciona por tanto con la arteriosclerosis, por inducir una ataque a la pared endotelial, mediante una reacción de hipersensibilidad retardada propia de las infecciones crónicas (Taylor y cols., 1990), pudiendo ser el eslabón perdido entre los microorganismos incriminados y la autoinmunidad.(Fong y cols., 2002; Mayr y cols., 1999)

#### **1.3.3.2. Sistema de secreción tipo III**

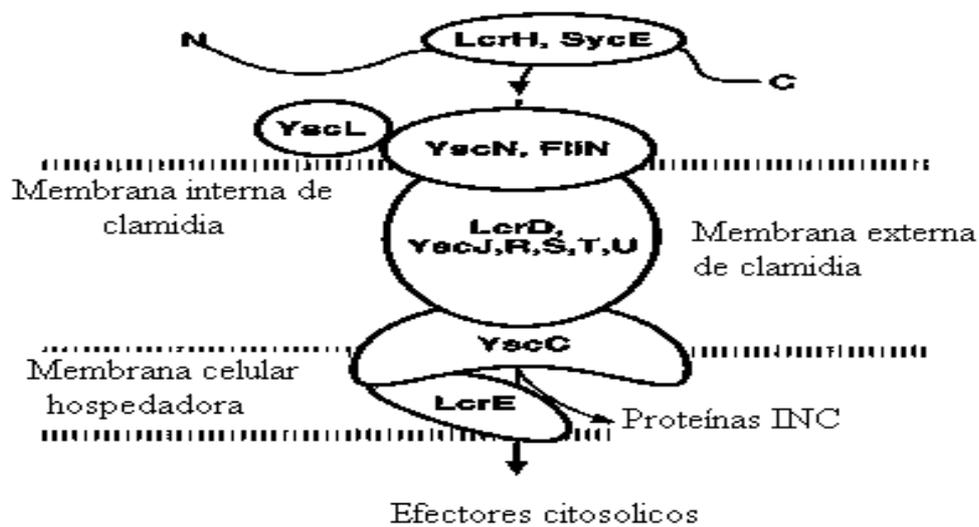
Se ha demostrado tanto en EB como en RB, que clamidia está cubierta por unas protuberancias que parecen constituir este sistema (tabla 1; figura 7).

Una de las protuberancias es mas larga en CR y sirve para la inyección de ciertas proteínas necesarias para la infección, la endocitosis y la muerte de macrófagos (Hueck y cols., 1998). Seria lógico pensar que se tratara de las proteínas INC, las que introdujera, debido a su localización en la membrana de inclusión y la ausencia de señales de secreción en ellas (Subtil y cols., 2001). Además debe existir un sistema de secreción tipo IV porque algunas PMPs son transportadas a la

membrana interna con el carbono terminal anclado a la membrana externa pudiendo tratarse de autotransportadores tipo IV (Vandahl y cols., 2001a).

GEN ID	DEFINICIÓN
<i>CPn0322</i>	Proteína flagelar (YscU)
<i>CPn0323</i>	Proteína D de respuesta baja en calcio de la membrana del sistema III de secreción (LcrD)
<i>CPn0324</i>	Proteína E de respuesta baja en calcio supuesta reguladora del sistema III (LcrE)
<i>CPn0325</i>	Probable chaperona (SycE)
<i>CPn0702</i>	Proteína de traslocación precursora de la proteína D (YscC)
<i>CPn0707</i>	Proteína flagelar ATPasa (YscN)
<i>CPn0823</i>	Proteína de traslocación (YscT)
<i>CPn0824</i>	Proteína de traslocación (YscS)
<i>CPn0825</i>	Proteína de traslocación (YscR)
<i>CPn0826</i>	Proteína de traslocación (YscL)
<i>CPn0828</i>	Proteína de traslocación (YscJ)

**Tabla 1:** Componentes del sistema de secreción tipo III



**Figura 7:** Esquema de actuación de los enzimas involucrados en el sistema III de secreción

#### **1.3.4. Proteínas relacionadas con la biosíntesis de cofactores, grupos prostéticos y transportadores metabólicos**

Se encargan de la síntesis de biotina, folatos, grupo hemo, porfirina, cobalamina, lipoatos, menaquinona, ubiquinona y riboflavina.

#### **1.3.5. Proteínas relacionadas con la degradación proteica**

Se clasifican en 3 grupos:

- Degradación de proteínas, péptidos y glucoproteínas
- Unión y estabilización de proteínas
- Modificación y reparación

#### **1.3.6. Proteínas relacionadas con la transcripción**

Están implicadas en la formación y degradación de RNA, procesamiento de RNA y factores de transcripción.

#### **1.3.7. Proteínas relacionadas con la traducción**

Destacan las proteínas ribosomales, los factores de translación, los aminoácidos y los RNAt y RNAr modificados.

#### **1.3.8. Proteínas relacionadas con el metabolismo intermediario**

Se encuentran los enzimas necesarios para el metabolismo del nitrógeno, de los componentes fosforados, sulfurados y amino azucarados.

#### **1.3.9. Proteínas relacionadas con el metabolismo energético: Enolasa**

Facilita la invasión tisular previniendo la generación de coágulos de fibrina (Fontan y cols., 2000). Se ha visto que la enolasa de la superficie puede causar reacción cruzada con la enolasa humana de las células hematopoyéticas, por lo que en las infecciones por clamidia la inducción de anticuerpos anti-enolasa podría ser

una causa de las reacciones autoinmunes inflamatorias (Montigiani y cols., 2002).

### 1.3.10. Proteínas relacionadas con el metabolismo de ácidos grasos y fosfolípidos

En la tabla 2 se refleja, a modo de ejemplo de dicho metabolismo, las proteínas relacionadas con la biosíntesis y degradación del propanoato.

GEN ID	RUTA	PROTEÍNA
<i>CPn0058</i>	Metabolismo del propanoato	Subunidad $\beta$ -acetil-CoA carboxilasa
<i>CPn0183</i>	Metabolismo del propanoato	Proteína transportadora de biotina del acetil-CoA carboxilasa
<i>CPn0414</i>	Metabolismo del propanoato	Transferasa de la subunidad $\alpha$ de la acetil-CoA carboxilasa

**Tabla 2:** Metabolismo del propanoato

### 1.3.11. Purinas, pirimidinas, nucleósidos y nucleótidos

Se encuentran los interconvertidores nucleótido-nucleósido, es decir, los adenilato kinasa, guanilato kinasa,... proteínas relacionadas con el metabolismo de 2-deoxirribonucleotido, etc.

### 1.3.12. Proteínas con funciones reguladoras

#### 1.3.12.1. Hsp 70 kDa

Es una proteína de shock térmico que se expresa, por tanto, en condiciones estresantes. Se conoce como Dnak, y actúa como una chaperona temprana en la infección. Necesitan ATP y juegan un importante papel en el transporte de proteínas a través de las membranas.

#### 1.3.12.2. Proteína de respuesta baja en calcio

Es un supuesto regulador del sistema III de secreción que parece estar

involucrado con la virulencia.

### **1.3.13. Otras proteínas**

#### Proteínas de transporte y fijadoras de proteínas

Se encuentran clasificadas en peptídicas, aminas, como los oligopéptidos periplásmicos fijadores de proteínas; cationes, aniones y otras como las proteínas de membrana y los transportadores dependientes de ATP.

#### Proteínas relacionadas con la biosíntesis de aminoácidos

Se encuentran involucradas en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, la familia del aspartato, serina - glicina y triptófano - lisina.

#### Proteínas relacionadas con el metabolismo del ADN

Destacan las proteínas involucradas en la replicación, recombinación y reparación del ADN, como la polimerasa, endonucleasas, integrasas...

#### Proteínas no categorizadas

Se encuentran diversas proteínas cuya función celular no se encuentra catalogada, como la helicasa, proteínas relacionadas con el metabolismo de cofactores, proteínas fijadoras de GTP, etc.

#### Proteínas desconocidas

Dentro de este grupo se encuentran proteínas de clase funcional desconocida, unas específicas del género *Chlamydia* y otras de la especie *C. pneumoniae* (Vandahl y cols. 2001b).

### **1.4. Patogenia de la infección. Modelos animales**

Para entrar en el organismo, la bacteria utiliza, entre otros, la célula epitelial columnar o de transición entre el epitelio escamoso y columnar. Además infecta las vías respiratorias y los monocitos.

La respuesta inmunológica que se ocasiona puede resolver la infección. Al igual que con *C. trachomatis*, las personas infectadas con *C. pneumoniae* desarrollan una respuesta inmunológica celular (Braun y cols., 1994). La inmunidad celular es la más importante y suele ser poco intensa, pero persistente.

Hay evidencias de que la inmunidad mediada por células puede ser responsable de la recuperación de la infección o de la inmunopatología. Las células T, CD4 y CD8, son necesarias para la protección eficiente frente a la infección en ratones. Las células T CD4 son activadas por los antígenos de *Chlamydia*, que derivan del contenido de las vacuolas y relacionados con las moléculas de clase II del sistema HLA, que se exponen en las células infectadas como macrófagos, dendritas y células endoteliales; el reconocimiento de los antígenos producirá la secreción de citoquinas. Éstas activan los macrófagos y las células B para producir anticuerpos. Las células T CD8 cuando son activadas por antígenos, pueden responder produciendo IFN- $\gamma$ , actividad citolítica, o supresión de la respuesta inmunológica (Stratton, 1998).

El IFN- $\gamma$  inhibe la replicación de patógenos obligados intracelulares, por inducción de la producción de indoleamina 2,3-diooxigenasa (IDO). La IDO degrada el triptófano a quineurina y N-formilquineurina, deprivando al patógeno de triptófano. Como resultado, el crecimiento del patógeno puede ser restringido. Cuando el triptófano es repuesto, la inhibición se revierte. (Malinverni, 1996). Carlin y Weller (1995) investigaron agentes inmunomoduladores que podían actuar sinérgicamente con IFNs, en la restricción del crecimiento de *Chlamydia* por incremento de la actividad del IDO. La adición de IL-1 al tratamiento de macrófagos

con IFN aumentó la actividad del IDO y suprimió el crecimiento de *Chlamydia*. La IL-1 $\beta$  parece ser más importante por este efecto sinérgico. Finalmente, por actuación sinérgica con bajas e insuficientes concentraciones de IFN- $\gamma$ , puede contribuir al establecimiento de la infección persistente a través de la inducción de la IDO.

El resultado de la respuesta inmunológica frente a *Chlamydia* puede ser de protección o de inmunopatología y parecer ser determinado por el antígeno que predominantemente estimula la activación de las células T.

Por otro lado, hay evidencia de que una infección reciente superada puede conferir protección de enfermedades severas (Thom y cols., 1994); la reinfección es frecuente a lo largo de la vida porque surgen variantes alélicas debido a la presión inmunológica o recombinación genética en la infección mixta. Además, no se ha demostrado la capacidad de neutralización de los anticuerpos para evitar nuevas infecciones (Puolakkainen y cols., 1994). La bacteria detiene la apoptosis de la célula, lo que permite la replicación e infección crónica

El período de incubación de la enfermedad aguda es de varias semanas (media de tres), más largo que para otros muchos patógenos respiratorios (Kishimoto y cols., 1994; Mordhorst y cols., 1994). Se han usado tres modelos animales en la infección por *C. pneumoniae*, el ratón, el hamster y el mono. De éstos, el más susceptible es el ratón, que puede ser inoculado por vía intranasal (Kaukuranta-Tolvanen y cols., 1993; Yang y cols., 1993), intravenosa (Zhang y cols., 1989), subcutánea (Zhang y cols., 1989) e intracerebral (Kuo y cols., 1986).

La enfermedad pulmonar en los ratones se caracteriza por una neumonitis intersticial, con infiltrados de células polimorfonucleares en fase temprana e infiltrados de células mononucleares en fase tardía (Yang y cols., 1993). El examen ultraestructural revela inclusiones de *C. pneumoniae* en las células epiteliales

bronquiales y macrófagos intersticiales (Yang y cols., 1993), siendo similar a la neumonía inducida en los ratones con *C. trachomatis*. Una peculiar característica es la acumulación de células linfoides en las áreas perivasculares y peribronquiales, que aparecen en el día 11 y persisten hasta el día 60 en la infección primaria.

*C. pneumoniae* se distribuye sistémicamente en los ratones después de la inoculación intranasal (Yang y cols., 1995) y es muy frecuente aislarla de macrófagos del bazo y peritoneo. Estos hallazgos han hecho considerar la infección por *C. pneumoniae* como una enfermedad sistémica en los humanos.

*C. pneumoniae* presenta una baja virulencia en los monos babuinos recién nacidos (*Papio cynocephalus anubus*) (Bell y cols., 1989) y monos cynomolgus (*Macaca cyclopid*) (Holland y cols., 1990) cuando se inocula por vía nasofaríngea, orofaríngea o intratecal, y produce una enfermedad poco importante, aunque la bacteria se recupera de la nasofaringe. A diferencia de *C. trachomatis*, la inoculación de *C. pneumoniae* en la conjuntiva humana da lugar sólo a una inflamación poco importante (Kuo y cols., 1986).

Los hamster se muestran también susceptibles tras la inoculación intranasal e intratecal con *C. pneumoniae*, y la enfermedad respiratoria que provoca se caracteriza por una neumonía intersticial multifocal moderada con bronquitis y vasculitis. Una sola inoculación provoca un cuadro auto-limitado de neumonitis de 3 semanas de duración, que está compuesta inicialmente de células polimorfonucleares y que después cambia a mononucleares. Tras inoculaciones repetidas se forman microgranulomas, consistentes en un núcleo central de macrófagos rodeados por linfocitos activados, y que persisten hasta el día 42 de la infección.

Los microorganismos pueden ser recuperados del tracto superior respiratorio por cultivo durante la fase temprana de la enfermedad, pero nunca del tejido pulmonar, aunque éste es intermitentemente positivo mediante reacción en cadena de

la polimerasa (PCR). También se detecta ADN de *Clamidia*, mediante PCR, en bazo y células mononucleares de sangre periférica, lo cual indica que la infección es sistémica, igual que ocurre en los ratones (Moazed y cols., 1994).

### **1.5. Enfermedad relacionada. Arteriosclerosis: patogenia**

A través de la investigación de los anticuerpos, generalmente mediante el empleo de pruebas de microinmunofluorescencia (MIF) (Moazed y cols., 1994), se ha demostrado que la infección tiene una presencia universal (Montes y Cilla, 1992), que los sujetos se infectan alguna vez en su vida y que ésta es más frecuente a medida que aumenta la edad. Frecuentemente produce infecciones crónicas con escasos síntomas, lo que facilita su diseminación.

Es capaz de originar infecciones asintomáticas en niños (figura 8), por infección primaria. Esto no excluye la posibilidad de ocasionar faringitis, otitis y sinusitis. Así, la bacteria se ha asociado con sinusitis purulenta (Hashigucci y cols., 1992), otitis media supurada (Ogawa y cols., 1992) y faringitis, pero se desconoce la frecuencia real de estas enfermedades (Hammerschlag y cols., 1992a).



**Figura 8:** Enfermedad relacionada con *C. pneumoniae*

Las infecciones sintomáticas ocurren en adultos, debido a reinfección, y menos frecuentemente por reactivación. Ocasiona bronquitis y neumonía (hasta el 20% de las neumonías extrahospitalarias ocurridas en los mayores de 65 años y un 5% de los casos de bronquitis y sinusitis).

Tal y como se ve en la imagen radiográfica de la figura 8, se trata de un patrón intersticial, con clínica de neumonía atípica (Aldous y cols., 1992; Grayston, 1992). La radiografía de tórax muestra una neumonía subsegmental, no lobar ni intensa, en los casos no hospitalizados. Más extensa o bilateral en los pacientes hospitalizados, incluso con pleuritis. La bacteria no produce síntomas y signos específicos en la infección pulmonar; sin embargo, algunas características de la presentación clínica pueden ayudar a distinguirla de otras causas de neumonía atípica como *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella* spp. y virus respiratorios (influenzavirus, virus sincitial respiratorio y adenovirus) que pueden causar enfermedades similares (Grayston y cols., 1993).

El inicio es subagudo y frecuentemente con faringitis o sinusitis. En el modelo bifásico de la infección ésta se sigue de bronquitis o neumonía. La tos es muy común y frecuentemente prolongada. La fiebre no es persistente. El enfermo suele tardar en acudir al médico, por lo que ésta puede haber desaparecido. No suele existir leucocitosis, aunque sí se incrementa la velocidad de sedimentación eritrocitaria. La mayoría son relativamente poco importantes y no requieren la hospitalización. Incluso en estos casos menores la recuperación completa es lenta, a pesar del apropiado tratamiento antibiótico. La tos y el malestar pueden persistir durante muchas semanas tras la infección aguda. Los ancianos tienen un curso clínico más severo que los jóvenes adultos. Las enfermedades de base y coinfecciones con otras bacterias, como neumococos, se asocian con una enfermedad más severa (Cosentini y cols., 1994; Gaydos y cols., 1994a; Kauppinen y cols., 1994).

También se ha aislado del pulmón de pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (Augenbraun y cols., 1991) y otros inmunodeprimidos (Gaydos y cols., 1993). Sin embargo, se desconoce si la inmunodepresión incrementa el riesgo de la infección por *C. pneumoniae* o produce una enfermedad más severa. Igualmente ocurre en los sujetos con EPOC (Beaty y cols., 1991). *C. pneumoniae* también se ha identificado como una causa de exacerbación respiratoria aguda en pacientes con fibrosis quística y se ha asociado con síndrome agudo respiratorio en niños con enfermedades celulares (Miller y cols., 1991). Finalmente, se han descrito algunos episodios de infecciones sistémicas graves que evolucionan a la muerte, con neumonía, pericarditis, pleuritis y hepatoesplenomegalia (Grayston, 1994).

Se ha observado que tras la infección respiratoria por *C. pneumoniae* es más probable desarrollar bronquitis asmática, sugiriendo que la bacteria puede ser un factor en el desarrollo del asma o agravamientos asmáticos (Hahn y cols., 1991). *C. pneumoniae* también se ha asociado con la sarcoidosis (Black y cols., 1992), eritema nudoso (Sundelof y cols., 1993), síndrome de Guillain-Barré (Haidl y cols., 1992) y cáncer de pulmón (Laurila y cols., 1997). También se ha descrito endocarditis

(Marrie y cols., 1990) y meningorradiculitis lumbosacra (Michel y cols., 1992).

La asociación entre *C. pneumoniae* y artritis reactiva fue observada por Braun y cols.(1994). En estos estudios, la sangre periférica y linfocitos sinoviales de pacientes con artritis reactiva reaccionaron específicamente con la bacteria en un ensayo de transformación de linfocitos.

Además, la infección del tejido conectivo por *Chlamydia* es facilitada por la capacidad de estos patógenos para infectar y replicarse en monocitos y macrófagos. Boman y cols. (1998) informaron que el 46% de donantes de sangre de Suecia, de mediana edad demostraron la presencia de *C. pneumoniae* en células mononucleares de sangre periférica mediante PCR-anidada, aunque la presencia del ADN de *Chlamydia* en estas células no significa que sean viables y/o infecten otras células (Stratton y cols., 1997b). No obstante, la infección de células mononucleares de sangre periférica claramente permitiría que las especies de *Chlamydia* alcancen los tejidos conectivos y posibilita la infección de las células sinoviales tipo A, que están estrechamente relacionadas con los macrófagos (Stratton, 1998).

Más recientemente se ha asociado con otros procesos de etiología hasta ahora no bien conocidos, tales como la arteriosclerosis y la esclerosis múltiple.

Las placas de ateroma (figura 9) constituyen pequeñas áreas de engrosamiento de la íntima de la pared arterial, de 5 a 15 mm. de diámetro, formadas por acumulaciones de colesterol, macrófagos, células de músculo liso y linfocitos T, en proporción variable según el estadio evolutivo de la lesión. Las placas se hallan recubiertas, en la zona subendotelial, por un tejido conectivo.

La lesión protruye excéntricamente en la luz arterial y, cuando abarca más del 40% de la circunferencia, comienza a reducir progresivamente el calibre del vaso. Además de la obstrucción mecánica, la presencia de la placa ateromatosa origina la

pérdida de la función vasomotora del endotelio. En ocasiones, el crecimiento de la placa causa la atrofia de la capa media, con la consiguiente disminución de resistencia de la pared arterial y la potencial formación de un aneurisma. Además, pueden ocurrir accidentes debido a la formación de un trombo plaquetario en la superficie de la placa con la consiguiente obstrucción aguda, parcial o completa, del vaso afectado. Más raramente, la obstrucción se debe a la producción de una hemorragia en el interior de la placa o a la existencia de un vasoespasmio. El desarrollo de un trombo en la superficie de una placa de ateroma es el resultado de la erosión o rotura del endotelio que lo recubre. La fisura de éste suele producirse en el borde de la placa, que es la zona sometida a una tensión mecánica superior.

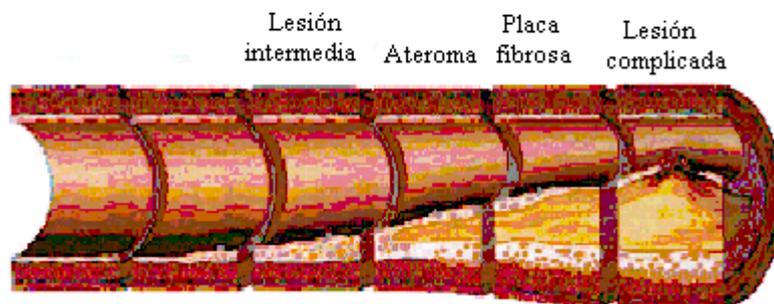
El accidente expone el colágeno subendotelial a las plaquetas circulantes, y en pocos minutos, éstas, en colaboración con la tromboplastina tisular, forman un trombo. La complicación tiende a producirse en áreas en las que las lesiones ateromatosas son poco importantes. La estabilidad de la placa depende del balance entre la síntesis de colágeno por las células de músculo liso y su degradación por efecto de las metaloproteinasas producidas por los macrófagos. Las placas de ateroma proclives a la rotura tienen una cubierta fibrosa delgada con pocas células musculares lisas. Recientemente se ha planteado el posible papel de la apoptosis en la pérdida de células de músculo liso y el consiguiente debilitamiento y rotura de la placa. Las LDL oxidadas, entre otros factores, podrían contribuir a la apoptosis (Kockx y Herman, 1988). La presencia de un infiltrado inflamatorio es otro marcador de vulnerabilidad de la placa (Kullo y cols., 1998). En su aparición podrían intervenir los microorganismos, directamente o a través de la producción de una respuesta autoinmune, quizá suscitada por las Hsp.

Las lesiones ateromatosas se localizan preferentemente en la aorta, sobre todo en la pared posterior del trayecto abdominal y en el orificio de salida de los grandes vasos; en las arterias coronarias, en especial en los primeros centímetros de la descendente anterior y la circunfleja izquierda y en todo el trayecto de la coronaria

derecha; en las arterias poplíteas, en las carótidas internas y en las arterias del polígono de Willis.

La lesión inicial, precursora de las placas, es la denominada estría grasa, cuya aparición puede observarse antes de los 10 años de vida. Se trata de depósitos de colesterol, en su mayor parte en forma de ésteres, localizados en el citoplasma de los macrófagos (Ross, 1999). El posible origen de estas lesiones supone que se deben a una alteración funcional del endotelio en respuesta a una agresión. La disfunción endotelial se caracteriza por un aumento de la permeabilidad y de la producción de radicales libres de oxígeno junto a la expresión de las moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1) y vascular (VCAM-1) en la superficie endotelial.

### Evolución de la arteriosclerosis



**Figura 9:** Placa de ateroma

Entre las posibles causas de agresión endotelial ocupan el primer lugar determinados tipos de hipercolesterolemia, la diabetes mellitus, el hábito tabáquico y el estrés mecánico al que se ve sometida la pared arterial en las zonas de flujo turbulento, eventualmente agravado por la existencia de hipertensión arterial.

El colesterol lesivo para el endotelio es el transportado por las lipoproteínas de baja densidad (LDL), el relacionado con episodios de hiperlipemia posprandial

(aumento de lipoproteínas de muy baja densidad -VLDL- y quilomicrones) (Gould, 1998) y el asociado aumento de la lipoproteína Lp(a) (forma alterada de la LDL) (Frishman, 1998). Las moléculas de LDL se depositan en la íntima y se oxidan por efecto del exceso de radicales libres de oxígeno.

Simultáneamente, los monocitos de la sangre se adhieren al endotelio, migran hacia la íntima y se convierten en macrófagos. Las LDL oxidadas son atrapadas rápidamente por receptores específicos presentes en la superficie de los macrófagos. La expresión de estos receptores no está regulada por el contenido intracelular de colesterol, de forma que la captación de éste persiste hasta que los macrófagos cargados de colesterol acaban adoptando el aspecto de células espumosas. Es probable que los receptores implicados en la captación de las LDL oxidadas intervengan también en la fagocitosis de ciertos microorganismos como *Listeria* spp. y el virus del herpes simple (Suzuki y cols., 1997). Los macrófagos activados producen IL-1, factor de necrosis tumoral (TNF), factores angiogénicos y factores de crecimiento que contribuyen a la migración y proliferación de las células de músculo liso de la capa media. Éstas, a su vez, generan la matriz extracelular que fibrosa la superficie de la placa. Los factores angiogénicos estimulan la proliferación de pequeños vasos sanguíneos en la periferia de la placa.

En el curso clínico de la enfermedad aterosclerótica se distinguen dos fases. En la primera, las lesiones de la pared arterial progresan intermitentemente a lo largo de muchos años.

Durante este período el proceso suele ser asintomático, sin embargo, cuando la disminución del calibre vascular es importante (superior al 75%) pueden producirse defectos de perfusión de intensidad, variable según el grado de compensación establecido por el desarrollo de la circulación colateral. De acuerdo con la localización de la estenosis, el déficit de perfusión se manifiesta en forma de claudicación intermitente de las extremidades inferiores o de episodios de angina de

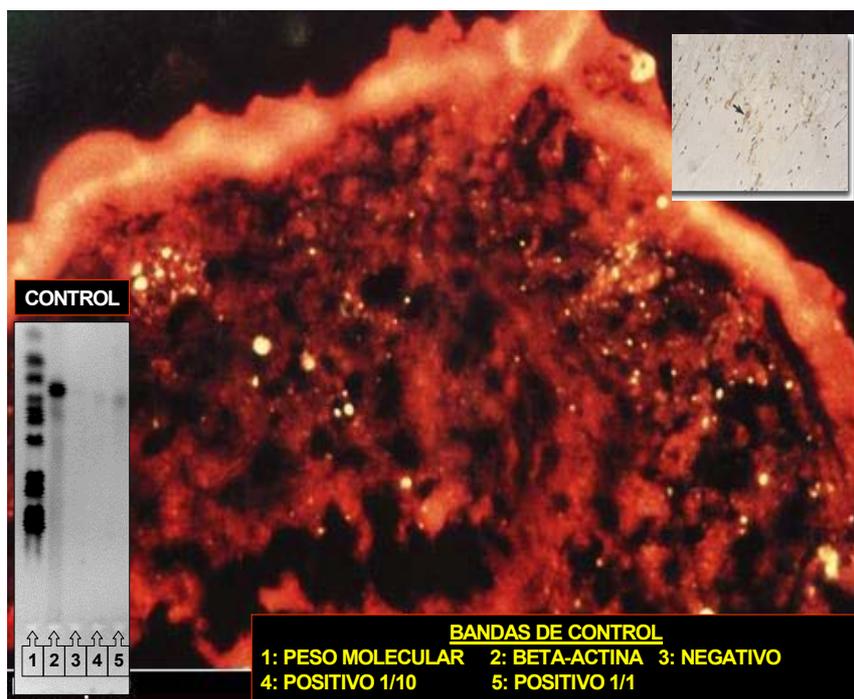
esfuerzo. Cuando las lesiones de las arterias coronarias son difusas, la isquemia cardíaca crónica puede originar insuficiencia cardíaca.

La segunda fase evolutiva de la arteriosclerosis se caracteriza por la aparición de episodios de isquemia aguda, que en las arterias coronarias pueden cursar en forma de angina inestable, de un infarto agudo de miocardio o de muerte súbita.

La presencia de anticuerpos dirigidos contra la Hsp 60 se ha asociado con la aparición de arteriosclerosis carotídea. Varios de los microorganismos causales de periodontitis y *C. pneumoniae* poseen una Hsp que tiene una elevada secuencia de identidad con la Hsp humana (Mattila y cols., 1998). Recientemente se ha observado que tanto la Hsp 60 de *Chlamydia* como la humana, inducen la expresión de moléculas de adhesión intercelular como E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1 en las células endoteliales, células de músculo liso y macrófagos (Kol y cols., 1999).

A pesar de todo lo anterior, muchos de los pacientes con arteriosclerosis plenamente desarrollada y hasta el 30% de pacientes con infarto agudo de miocardio (Sumpter y Dunn, 1997) no tienen ninguno de los principales factores de riesgo reconocidos hasta el momento como predictivos de aparición de la enfermedad, como hipercolesterolemia, hipertensión arterial, hábito tabáquico o diabetes mellitus.

La asociación entre enfermedad arterial coronaria y otros síndromes arterioscleróticos e infección por *C. pneumoniae* se ha sugerido mediante estudios seroepidemiológicos y la demostración del organismo en placas de ateroma (figura 10).



**Figura 10:** Demostración de la relación entre la placa de ateroma y *C. pneumoniae* mediante inmunofluorescencia, PCR y cultivo

El primer estudio se realizó en Finlandia (Saikku y cols., 1988), en el que pusieron de manifiesto la posible existencia de una asociación entre la cardiopatía isquémica y la infección crónica por *C. pneumoniae*. El diagnóstico de esta infección se estableció por la presencia de un título único elevado de IgG específica detectada en una prueba de MIF (Puolakkainen y cols., 1993; Melnick y cols., 1993).

Se han obtenido evidencias microbiológicas de la presencia de *C. pneumoniae* en placas de ateroma mediante microscopía electrónica en ateromas de coronarias (Kuo y cols., 1993a), tinción inmunocitoquímica y pruebas de PCR de coronarias (Kuo y cols., 1993b), carótidas (Grayston y cols., 1995) y ateroma aórtico (Kuo y cols., 1993b). La bacteria se encontró mas comúnmente en lesiones re-estenóticas que en primarias (Campbell y cols., 1995).

En otro estudio en muestras de autopsia de jóvenes de 15 a 35 años de edad

(Wissler, 1991) la bacteria no fue detectada por PCR o inmunocitoquímica en 31 muestras de arteria coronaria sin ateroma, pero fue demostrada en 2 de 11 muestras con lesiones iniciales (engrosamiento de la íntima) y en 6 de 7 muestras con placas arterioscleróticas en desarrollo (Kuo y cols., 1995). Aunque estos estudios claramente asocian la bacteria con la placa de ateroma, el papel de la infección en la patogénesis de la arteriosclerosis es desconocido con exactitud.

Algunas observaciones procedentes de la infección experimental de conejos sugieren que la infección por *C. pneumoniae* puede facilitar el desarrollo de placas de ateroma en animales hipercolesterolémicos. En un estudio se detectó la presencia de lipopolisacárido de *Chlamydiaceae* en las placas de ateroma de animales alimentados con una dieta rica en colesterol e infectados por *Chlamydia*; en cambio, no se encontró en los animales no infectados ni en los infectados alimentados con una dieta baja en colesterol. Entonces, parece que la lesión inicial inducida por el colesterol es necesaria para que *C. pneumoniae* pueda infectar y residir en la arteria (Fong y cols., 1997).

Además, la infección por *C. pneumoniae* induce in-vitro un marcado aumento de la captación de ésteres de colesterol en monocitos humanos incubados en presencia de LDL, de modo que éstos acaban evolucionando a células espumosas (Kalayoglu y Byrne, 1998). A pesar de estos hallazgos, la larga evolución clínica de la arteriosclerosis y la consideración de la mayoría de los datos disponibles en la actualidad no permiten dilucidar si la infección posiblemente contribuye al desarrollo de los episodios finales de la enfermedad ateromatosa, como la trombosis o el vasoespasmo; o interviene en el inicio de la placa.

Resumiendo los conocimientos que existen hasta la fecha, es posible que *C. pneumoniae* participe en el siguiente cronograma:

1. Lesión de endotelio provocada por una causa infecciosa o no. *C. pneumoniae* puede infectar, vehiculada por monocitos, el endotelio, músculo liso y los macrófagos, con más facilidad en presencia de grasas. Al infectar estas células endoteliales teóricamente permitiría liberar CE infectados al medio extracelular, que serviría para extender la infección en algunos tejidos localmente o vía sistémica en la circulación (Stratton y Mitchel, 1997b).
2. La célula endotelial infectada incrementa la síntesis de: a) proteína quimiotáctica-1 de monocito y moléculas de adhesión intercelular que fijan leucocitos que pueden estar infectados y b) factores tisulares procoagulantes con trombosis.
3. Los monocitos se activan, migran al subendotelio, liberan citoquinas proinflamatorias (TNF, IL 1, 6 y 8, factor nuclear kappa B) y expresan la molécula CD14. Los efectos del incremento de las concentraciones de citoquinas humanas en la replicación intracelular de *C. pneumoniae* en un sistema de cultivo *in vitro* fueron investigados por Summersgill y cols. (1995).
4. El INF, de los LTh1 sensibilizados, aumenta laIDO de células endoteliales y mononucleares, que oxida el triptófano hasta N-formilquineurina y quineurina. Estas sustancias reducen la salida extracelular de *C. pneumoniae*, aumentan la persistencia intracelular debido a que *C. pneumoniae* requiere triptófano para su crecimiento, reducen la expresión de la MOMP y aumenta la expresión de Hsp 60, (Sakash y cols., 2002). Si no hay arteriosclerosis no se observa la Hsp 60. Ésta estimula la síntesis de autoanticuerpos y a los macrófagos para producir citoquinas y metaloproteinasas que degradan el colágeno. Malinverni (1996) informó que el IFN- $\gamma$  recombinante restringía la replicación intracelular de *C. pneumoniae* y la adición de TNF- $\alpha$  reducía las concentraciones de IFN- $\gamma$  necesarias para suprimir el crecimiento intracelular, produciéndose un efecto

sinérgico. Los efectos inhibitorios de IFN- $\gamma$  y del TNF- $\alpha$  fueron revertidos por la adición de triptófano a las monocapas.

5. Los macrófagos infectados, captan LDL, transformándose en células grasas. Las plaquetas agregadas liberan un factor de crecimiento celular que hace proliferar un músculo liso desdiferenciado que libera colágeno, elastina y proteoglicanos con formación de tejido fibroso. Finalmente, se forma la placa madura, con un centro de lípidos y colesterol, rodeada de una capa fibrosa.

### **1.6. Epidemiología**

Mucha de la información actual sobre la epidemiología de la infección por *C. pneumoniae* se deriva de estudios serológicos con la prueba de MIF. Éstos indican que es una causa común de infección en todo el mundo, con una seroprevalencia de al menos el 50% entre los adultos (Marton y cols., 1992; Montes y Cilla., 1992), habiéndose demostrado su presencia al menos desde 1963 (Aldous y cols., 1992; Grayston, 1992).

La infección primaria parece ser más común entre niños de edad escolar (desde 5 a 14 años). Los niños con edad inferior se infectan menos frecuentemente. A los 20 años aproximadamente el 50% de las personas han sido infectadas. La seroprevalencia continúa incrementándose en el grupo de sujetos de más edad, pero a un ritmo más lento, y alcanza el 70% en los más ancianos. Este ritmo de prevalencia existe a pesar del hecho de que la infección primaria induce una respuesta de anticuerpos detectable entre 3 y 5 años, sugiriendo que la mayoría de los sujetos se reinfectan a lo largo de la vida (Haidl y cols., 1994).

La seroprevalencia es aproximadamente igual en ambos sexos para edades inferiores a los 15 años; sin embargo, entre hombres adultos, es considerablemente más alta que entre las mujeres, sin que exista explicación hasta la fecha.

*C. pneumoniae* parece tener presencia en todo el mundo, aunque la prevalencia puede variar según las regiones (Forsey y cols., 1986). Se ha demostrado una prevalencia superior y más precoz en los países tropicales y menos desarrollados que en los más desarrollados (Wang y Grayston, 1990).

Los humanos son el único reservorio conocido de *C. pneumoniae*, y la transmisión es de persona a persona a través de las secreciones de las vías respiratorias de sujetos infectados, enfermos o no. Esta transmisión parece no ser muy eficiente y ocurre más frecuentemente de manera indirecta (Ekman y cols., 1993a; Grayston y cols., 1993). Además, se han descrito variaciones en la eficiencia de la transmisión (Mordhorst y cols., 1994). Puede sobrevivir en aerosoles y objetos, a temperatura ambiente y con alta humedad relativa, durante largos períodos de tiempo (Falsey y Walsh, 1993; Theunissen y cols., 1993).

No se ha descrito ningún reservorio animal de *C. pneumoniae*; no obstante se ha informado de un aislamiento en un caballo (Storey y cols., 1993) y un oso koala (Kaltenboeck y cols., 1993). Estos aislamientos manifestaban CEs redondos y de manera específica, el aislado de caballo contenía un plásmido.

## **1.7. Diagnóstico de laboratorio**

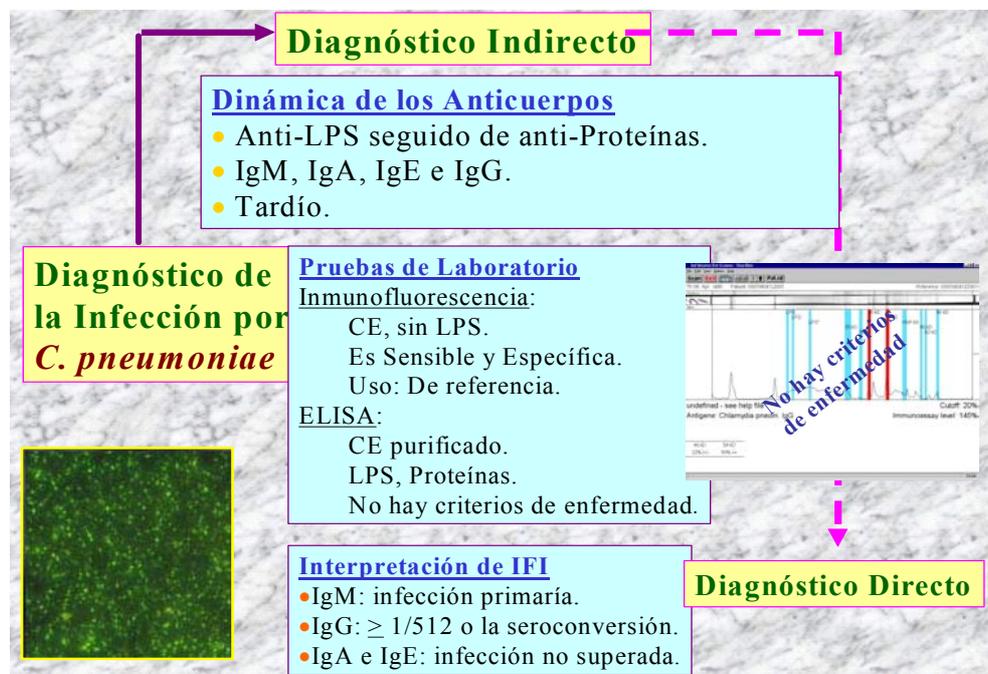
La investigación de los anticuerpos es la principal forma, aunque tardía, de realizar un diagnóstico de laboratorio de la infección por *C. pneumoniae*, por su facilidad en la ejecución, rapidez y relación con el estado de enfermedad del sujeto, y porque la detección de la bacteria es compleja y no exenta de riesgos (figura 11).

### **1.7.1. Métodos indirectos**

En la infección primaria surgen primero los anticuerpos anti-LPS y luego los anti-proteínas. La infección por *C. pneumoniae* induce una respuesta de IgG, IgA e IgM que se pueden detectar mediante MIF o ELISA, los dos pueden emplear CEs en

los que se ha eliminado el LPS.

El ELISA puede contener células infectadas con inclusiones que contienen el LPS específico de *Chlamydiaceae* (pruebas especie-específicas) o CE en los que se elimina el LPS (Kutlin y cols., 1997). Los ELISA presentan las ventajas de una lectura objetiva, un manejo más fácil y la posibilidad de la automatización. La sensibilidad y la especificidad son elevadas comparadas con la MIF, pero no se han descrito criterios de infección y se observa un número importante de resultados dudosos (en torno al punto de corte de la técnica) (Jaqueti, 2000).



**Figura 11:** Diagnóstico indirecto de la infección por *C. pneumoniae*

La serología mediante MIF es la prueba de referencia para el diagnóstico de la infección (Thom y cols., 1994). Debido a que la mayor parte de los estados de enfermedad se deben a reinfecciones, es necesario cuantificar la IgG, para adecuar su valor predictivo positivo. Los criterios serológicos de infección mediante MIF son (Kishimoto y cols., 1994; Thom y cols., 1994):

❖ Infección reciente o aguda: IgM  $\geq 16$ , IgG  $\geq 512$  y/o elevaciones de las IgG en 4 títulos o más, en dos muestras obtenidas con 3 semanas de intervalo (más difícil de demostrar por el carácter crónico de los procesos).

❖ Infección antigua o pasada: IgG entre 8 y 256; IgM  $< 16$ .

Se debe tener en cuenta que la MIF también presenta problemas. La lectura requiere un microscopio de fluorescencia y la interpretación es subjetiva.

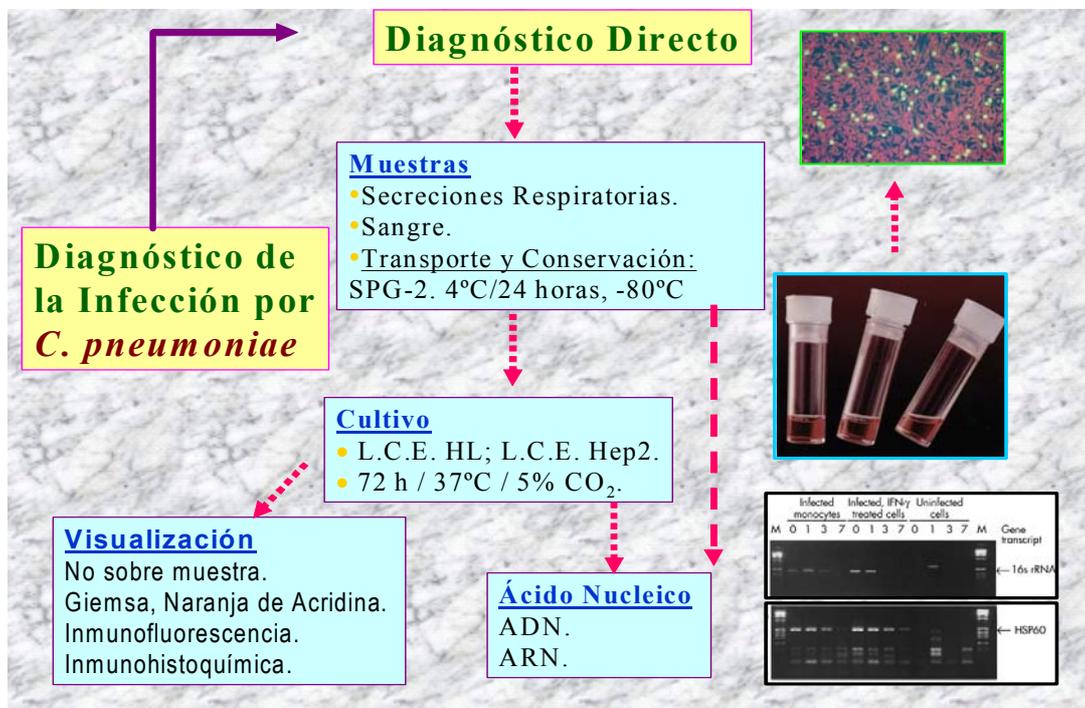
La técnica es manual y laboriosa, lo cual repercute en el coste (Jaqueti, 2000). Con fines de investigación, una tercera muestra de suero obtenido 2 meses después de la primera puede ser necesaria para detectar elevaciones tardías en los anticuerpos. Se han descrito falsos negativos al detectar anticuerpos mediante MIF en pacientes en los que *C. pneumoniae* fue aislada (Roblin y cols., 1994a), justificándose por una lenta respuesta inmunológica. Falsos positivos de IgM, en la MIF, pueden aparecer si los pacientes tienen factor reumatoide, cuya prevalencia se incrementa con la edad. Por lo tanto, se recomienda la extracción del factor reumatoide IgG en la MIF para la búsqueda de IgM (Verkooyen y cols., 1992). La IgM, mediante MIF, aparece tras 3 semanas de la aparición de la enfermedad. La IgG puede no hacerlo hasta las 6 u 8 semanas después del inicio de la enfermedad. En la reinfección la IgM puede no aparecer o aparecer a títulos bajos, no detectados mediante MIF. La IgG sube rápida y frecuentemente en 1 ó 2 semanas, y puede alcanzar un valor de 512 o más. La IgM usualmente comienza a descender a los 2 meses y desaparece entre 4 y 6 meses después de una infección aguda; la IgG persiste y puede ser detectada durante al menos 3 años, después de la infección aguda.

También está disponible una prueba de Western-blot. Para éste último están en evaluación los criterios que definen un estado de enfermedad actual. Finalmente, se ha sugerido que la pruebas con antígeno preparado de aislamientos de *C. pneumoniae*

de la región geográfica donde el paciente reside son más sensibles para la detección de anticuerpos (Hukki-Immonen y cols., 1992); aunque esto no se ha demostrado (Wang y Grayston, 1994).

### 1.7.2. Métodos directos

Una vez visto el diagnóstico indirecto pasamos a ver el directo (figura 12). No siempre hay relación entre los resultados de éste y la presencia de enfermedad, porque la bacteria puede colonizar las vías respiratorias altas.



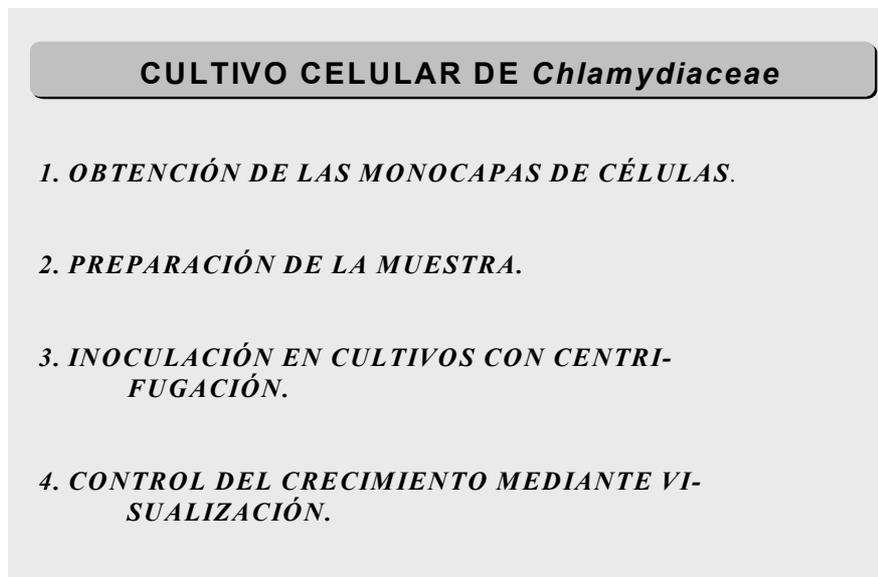
**Figura 12:** Diagnóstico directo de la infección por *C. pneumoniae*.

En la muestra clínica es muy importante obtener células. Está representada por secreciones del aparato respiratorio (Kuo y Grayston, 1988) y sangre. Las muestras procedentes de nasofaringe presentan mejores resultados que las obtenidas de la orofaringe. También se pueden utilizar líquido pleural y lavado broncoalveolar (Jaqueti, 2000). Se debe evitar el pus, el empleo de hisopos de madera y el esputo.

La bacteria es lábil, por eso se debe emplear un medio de transporte de tampón fosfatos, sacarosa y ácido glutámico con antibióticos, o el medio M4. La muestra se puede conservar durante 24 h, a 4°C o a -80°C, durante más tiempo, de forma gradual y con riesgo de falsos negativos (Kuo y Grayston, 1988b).

Para el cultivo en células se deben utilizar protocolos específicos de trabajo (figuras 13 a 16) con células del tipo HL (Cles y Stamm, 1990; Kuo y Grayston, 1990) o HEp-2 (Wong y cols., 1992). También se desaconseja un pH bajo (<5) y alto (>8) y una concentración de NaCl de menos de 80 mM (Theunissen y cols., 1992). El crecimiento puede ser lento, de 3 a 7 días. Para facilitar la infección se realiza el procedimiento de cultivo con centrifugación.

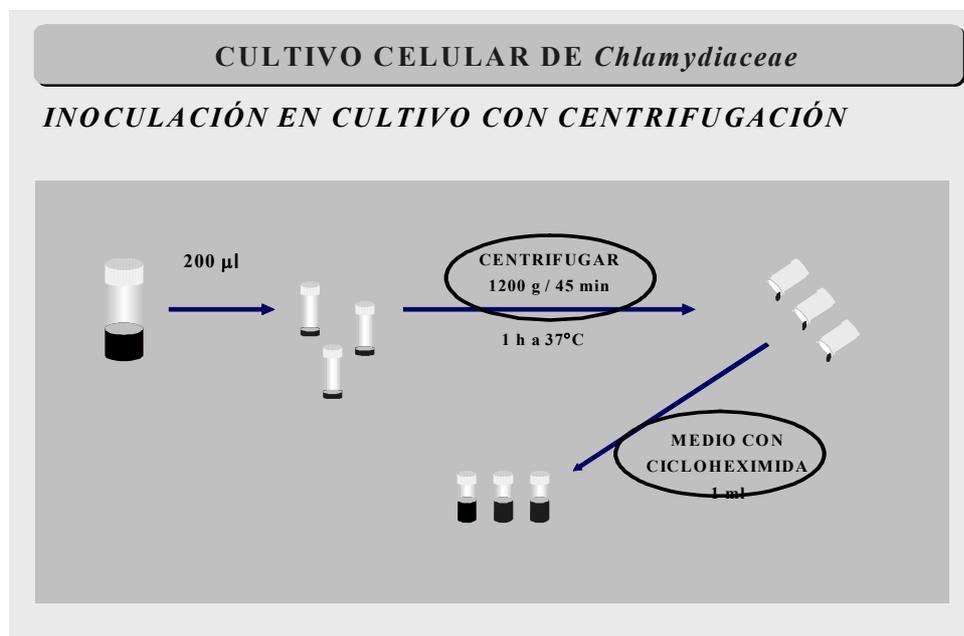
La sensibilidad de esta prueba es superior al 70% vs la PCR. Tras la incubación se visualizan los CI y CEs.



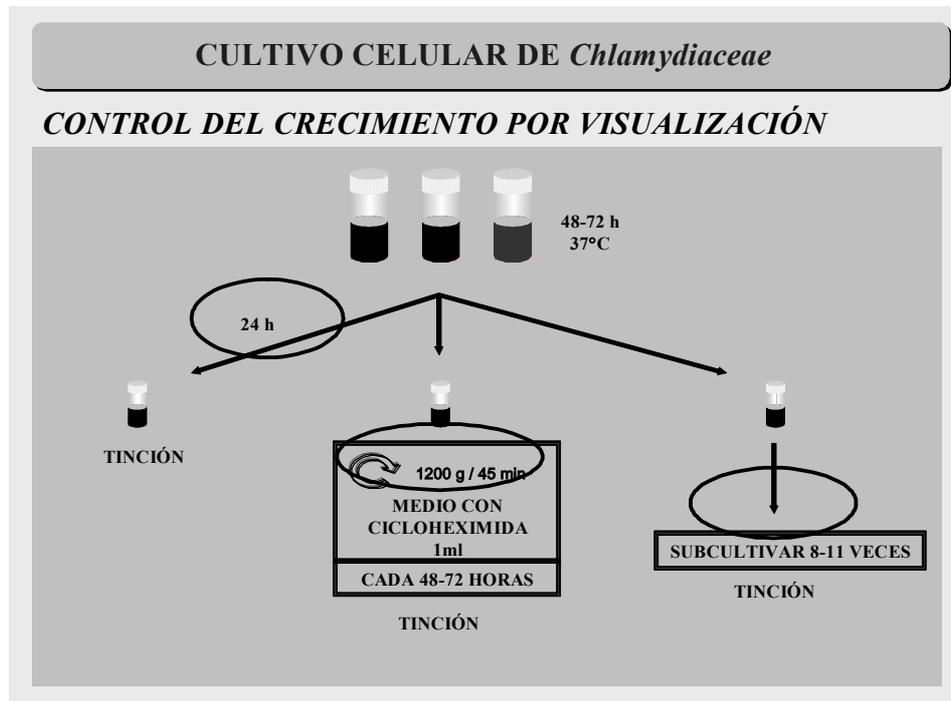
**Figura 13:** Procedimiento del cultivo celular de *C. pneumoniae*



**Figura 14:** Procedimiento de cultivo celular de *C. pneumoniae* en muestras de tejido vascular



**Figura 15:** Procedimiento de cultivo celular de *C. pneumoniae*



**Figura 16:** Procedimiento de cultivo celular de *C. pneumoniae*

*C. pneumoniae* crece escasamente en el cultivo y las inclusiones formadas son más pequeñas que las observadas con las otras especies de clamidias. El aislamiento se realiza mejor en células, aunque como *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* también se puede cultivar en sacos embrionarios de huevos de pollos (Kuo y cols., 1986). La incorporación de cicloheximida en el medio de cultivo, para inhibir el metabolismo de la célula hospedadora, mejora la sensibilidad del aislamiento. La cantidad de bacteria presente se puede expresar en UFI.

La visualización no se debe realizar sobre la muestra clínica, sino sobre las células infectadas. Se pueden usar para ello los colorantes de Giemsa y naranja de acridina o con anticuerpos especie específicos.

Mediante PCR se pueden investigar los ácidos nucleicos (ADN Cr o al ARNr 16S). Esta prueba es aplicable sobre la muestra clínica. Algunos cebadores

específicos de *C. pneumoniae* se han usado en la detección de la bacteria y dirigidos frente a una secuencia especie específica, de función desconocida (Campbell y cols., 1992), el gen del ARNr 16S (Gaydos y cols., 1992), el gen *MOMP* (Kaltenboeck y cols., 1993) y el gen de la proteína rica en cisteína de 60-kDa de la membrana externa (Watson y cols., 1991). Han sido usados exitosamente para la detección en muestras de secreción faríngea, lavado broncoalveolar (Gaydos y cols., 1994b) y esputo (Tong y Sillis, 1993). En estos estudios, la PCR parece ser más sensible que el aislamiento.

La PCR ha sido también aplicada a la detección de *C. pneumoniae* en biopsias frescas o fijadas en formol y parafina (Malinverni y cols., 1995). Junto a otras pruebas han permitido estudiar la neumonía de la comunidad (Grayston y cols., 1993; Tong y Sillis, 1993), la bronquitis (Grayston y cols., 1993) y la neumonía en pacientes inmunocomprometidos (Gaydos y cols., 1993). Por último, la PCR ha sido usada para demostrar la presencia de *C. pneumoniae* en ateromas coronarios y muestras de atrectomía (Campbell y cols., 1995). No obstante la PCR presenta varios inconvenientes (Jaqueti, 2000): la complejidad, falsos negativos debido a la presencia de inhibidores (moco y sangre) y ADNasas en la muestra, falsos positivos debidos a la contaminación, y puede ser positiva sin que exista enfermedad relacionada (Hyman y cols., 1995)

De manera similar se puede realizar la investigación del antígeno LPS de la bacteria u otros específicos de especie mediante anticuerpos, útiles en el estudio del cultivo celular (Ekman y cols., 1993b).

## **1.8 Tratamiento y prevención de la enfermedad asociada**

No se suelen hacer estudios de resistencias debido a que los fracasos clínicos son escasos y a la difícil estandarización de las pruebas de laboratorio. No obstante, hay ensayos de inmunoperoxidasa que intentan solucionar este problema. Los antibióticos a usar deben atravesar la membrana celular y el interior del CI. En este sentido son útiles doxiciclina, macrólidos (de elección en niños), quinupristin-dalfopristin, y quinolonas. No se han publicado estudios controlados del tratamiento de la infección por *C. pneumoniae*.

Azitromicina y claritromicina han demostrado ser efectivos frente *C. pneumoniae in vitro* (Hammerschlag y cols., 1992c; Welsh y cols., 1992) e *in vivo* (Cassel y cols., 1994; Roblin y cols., 1994b). *C. pneumoniae* es también sensible a las fluoroquinolonas (Hammerschlag y cols., 1992b). Eritromicina y doxiciclina muestran *in vitro* buena actividad frente a la bacteria (Kuo y Grayston, 1988c), y estos agentes se recomiendan en la terapia inicial. No es sensible *in vitro* a penicilina, ampicilina o sulfamidas.

Las recidivas son frecuentes en los tratamientos cortos (Hammerschlag y cols., 1992c) y por lo tanto se recomienda el uso intensivo durante largo tiempo: doxiciclina, 100 mg dos veces al día durante 14 días; o eritromicina, 500 mg, 4 veces al día durante 14 días (o 250 mg cuatro veces al día durante 21 días si la dosis elevada no es tolerada). Si los síntomas como la tos o el malestar persisten después de un curso de antibióticos puede ser necesaria una segunda tanda. Salvo que se demuestre resistencia, se recomienda doxiciclina para el segundo curso.

## 1. Introducción

---

Hasta el momento no existe vacuna disponible para el control de la infección. No se suelen utilizar medidas específicas de prevención debido a la falta de gravedad de la enfermedad que produce, la colonización faríngea asintomática y la fácil transmisión, excepto que se demuestre su participación en la arteriosclerosis y la esclerosis múltiple.



## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## 2. Hipótesis y objetivos

---

Hasta la fecha se ha investigado de forma importante la posible relación entre la arteriosclerosis (AT), fundamentalmente localizada en las arterias coronarias, y la infección por *C. pneumoniae* (Cp). Sin embargo, son menos frecuentes los estudios en sujetos con enfermedad arterial periférica oclusiva (EAPO). Con esto, se ha querido diferenciar este proceso de la enfermedad central, ya que: primero, parece que la enfermedad central y la periférica son procesos con una patogenia diferente y, segundo, se han realizado pocos estudios, bien caracterizados, hasta la fecha sobre la enfermedad periférica (Gutiérrez y cols., 2005). Respecto a la patogenia de la AT, decir que la EAPO comparte cualitativamente muchos de los factores de riesgo, con la enfermedad central, para la aparición de la placa de ateroma. Sin embargo, la frecuencia de presentación de los mismos es diferente (Fowkes y cols., 1992).

Así, se han publicado algo más de 43 estudios, bien caracterizados, en los que se analiza, mediante pruebas independientes, la asociación entre la EAPO y la infección por Cp. De estos se puede concluir que existe una asociación entre estas cuando se utilizan las pruebas inmunohistoquímicas (Chiu y cols., 1997), PCR anidada en biopsias de arterias (Taylor y cols., 2002), estudios de PCR en muestras no arteriales (Al-Amor y cols., 2001), pruebas de ELISA (Linares y cols., 2001), MIF para detectar altos títulos de IgG e IgA (Sessa y cols., 2003), y otros métodos de detección de la bacteria diferentes de los anteriores (Ramos y cols., 1999).

Sin embargo, no se ha encontrado asociación cuando se ha empleado la PCR simple en biopsias arteriales (Rose y cols., 2002), en las pruebas de MIF que detectan IgG en bajos niveles (Elkind y cols., 2000) o IgM (LaBiche y cols., 2001), y en los estudios de ELISA para detectar IgM (Vécsei y cols., 2002a ; Vécsei y cols., 2002b).

Según lo anterior, el hallazgo de la asociación entre la EAPO y la infección por Cp depende del método empleado en estos trabajos. La mayoría establecen una relación con una probabilidad variable. Y no se encuentra esta relación con las formas menos sensibles de PCR y la IgM, ya que lógicamente la EAPO hay que

entenderla como una enfermedad crónica.

Por lo tanto, a nuestro entender, para obtener una conclusión definitiva, falta en la literatura analizada un estudio con suficiente número de casos y muestras, comparativo frente a controles, que utilice la combinación de varias técnicas microbiológicas, entre ellas el Western-blot (WB) para detectar anticuerpos (Acs), en un mismo sujeto y muestra, relacionando los resultados entre ellos y con la actividad de la enfermedad. Además, hemos destacado el WB dado que las pruebas de MIF y ELISA sólo permiten realizar un análisis global de los Acs. sintetizados, pero no informan frente a qué antígenos se sintetizan; y no existen estudios que se basen en las pruebas de WB. Sin embargo, su uso en estos enfermos permitiría conocer frente a qué antígenos se sintetizan los Acs. y, quizás, podría aportar información sobre la patogenia de la enfermedad.

Por todo lo anterior, en este trabajo se desarrolla una prueba de WB para el análisis de la respuesta de Acs frente a *C. pneumoniae* en sujetos con EAPO, y se analiza su relación con la enfermedad y la presencia de la bacteria, con los siguientes objetivos específicos:

1. Realizar una prueba de PCR sensible para detectar ADN de *C. pneumoniae* en la placa de ateroma.
2. Establecer el serodiagnóstico de la infección en sujetos con EAPO y controles adecuados mediante equipos comerciales de MIF, ELISA y WB.
3. Desarrollar una prueba de Western-blot con antígenos de *C. pneumoniae*.
4. Relacionar los inmunógenos de *C. pneumoniae* reconocidos por los sueros de los sujetos anteriores.
5. Asociar todas las pruebas anteriores entre sí y con la situación clínica del enfermo.

# **3. MATERIAL Y MÉTODOS**



Se desarrolló un estudio siguiendo un modelo epidemiológico de tipo observacional, analítico, retrospectivo, de casos y controles. La justificación de la elección de este modelo epidemiológico vino dada por las características propias de una enfermedad como la arteriosclerosis (AT) donde existe un largo periodo de inducción y desarrollo. Dicho modelo ayudó a estudiar de forma más adecuada el comportamiento de determinados factores de riesgo y etiológicos.

El tamaño muestral necesario para obtener resultados valorables se calculó, *a priori*, considerando que la seroprevalencia debía tener la menor diferencia posible entre el grupo de casos y de controles. Basándonos en los estudios previos descritos en el apartado de introducción, se asumió una diferencia del 30% entre casos y controles para una tasa en el grupo control del 40%. Partiendo de la base de que el grupo control contaría con las 3/4 partes de individuos, respecto al grupo de casos, y asumiendo un error  $\alpha=0,05$  y una potencia del test del 80% ( $1-\beta$ ), se calculó que el grupo de casos debería tener, al menos, 64 sujetos y el control 48.

Para la realización de este trabajo se estudiaron un total de 118 pacientes distribuidos en los dos grupos básicos de estudio: 68 casos y 50 controles. Los casos estuvieron conformados por pacientes arterioscleróticos, clínicamente confirmados, en diferentes localizaciones anatómicas, distribuyéndose en cuatro subgrupos clínicos distintos atendiendo a dicha localización. Los controles fueron individuos sin evidencia alguna de enfermedad arteriosclerótica, que acudieron a nuestro centro por padecer patología varicosa con indicación de tratamiento quirúrgico. Se describen a continuación las características de ambos grupos.

#### **3.1. Parámetros descriptores estudiados**

Para describir a ambos grupos, tanto casos como controles, se han determinado parámetros epidemiológicos, clínicos y analíticos. Estos datos fueron recogidos en situación basal de los pacientes, caracterizando a cada uno de los grupos. Se

describen los criterios de medición y las categorías establecidas.

#### **Edad**

Medida en años. También se clasificaron los sujetos del estudio en categorías de edad en intervalos de 5 años, comenzando a partir de los 55 y hasta los 85 años.

#### **Sexo**

Masculino y femenino.

#### **Exposición al tabaco**

A través de la realización de historias clínicas, se clasificó a los pacientes en tres categorías: fumadores activos, exfumadores (sin hábito tabáquico en los últimos seis meses y con historia anterior de tabaquismo al menos 10 años ininterrumpidos a lo largo de su vida) y pacientes sin ninguna relación con el tabaquismo. Desde el punto de vista práctico se han considerado como expuestos al hábito tabáquico tanto a los fumadores, como a los exfumadores, por tanto, esta categoría la convertimos en solo dos: relacionados con el tabaco y sin relación con el mismo. No se ha considerado en ningún caso la situación de fumador pasivo, dado que no ha sido posible obtener datos fiables respecto a esta cuestión; tampoco hemos dado significación respecto del tipo y la forma de consumo de tabaco.

#### **Diabetes**

La diabetes mellitus se ha considerado como una sola enfermedad, no haciéndose distinciones según el tipo de tratamiento (insulin-dependientes, o tratados con antidiabéticos orales o dieta) o según el tipo de enfermedad diabética (tipo I o II).

#### **Tensión arterial**

Sólo se registró y analizó la tensión arterial sistólica medida con esfigmomanómetro estándar en brazo derecho y medida en mm de Hg, salvo en los

pacientes en los que se conocía estenosis u oclusiones de las arterias subclavia o axilar derecha, que se midió en brazo izquierdo. En el grupo de casos se consideró la tensión media de los días segundo y tercero desde el ingreso. En los controles se midió la tensión durante la Consulta de Preanestesia previa a la intervención quirúrgica. Este parámetro de tensión arterial sistólica se consideró de forma independiente de la condición o no de hipertensos de los pacientes y de si estaban o no tratados con antihipertensores durante los días segundo y tercero tras el ingreso.

#### **Obesidad**

El peso de los individuos se midió en kilogramos, siempre con la misma báscula y en los primeros días tras el ingreso en el grupo de casos, o en el plazo del mes anterior a la intervención en el grupo de controles. Se consideró a los pacientes obesos cuando tenían un peso real superior al 30% del peso teórico ideal.

#### **Antecedentes de arteriopatía**

Se han referido a las tres grandes formas clínicas de enfermedad arteriosclerótica, coronaria, cerebral y periférica. Se consideró que el paciente presentaba alguna de las tres formas cuando se documentó, en su historial, al menos un episodio clínico de enfermedad en una de esas tres manifestaciones de arteriosclerosis.

### **3.2. Grupo de casos**

El primer grupo se formó con 68 pacientes portadores de arteriosclerosis sistémica que afectaba a diversos sectores arteriales.

#### **3.2.1. Criterios de selección**

La selección de estos pacientes se realizó entre los tratados en el Servicio de Angiología y Cirugía Vascular del Hospital Universitario “San Cecilio” de Granada. Se admitieron tanto a varones como a mujeres. Este grupo lo constituyeron pacientes

arterioscleróticos severos de distinta localización con indicación de tratamiento quirúrgico. Se incluyeron dos de las formas de enfermedad arteriosclerótica más comunes:

- Enfermedad oclusiva: de localización aorto-iliaca, femoral o carotídea.
- Enfermedad aneurismática: de localización aorto-iliaca.

La forma clínica de cada localización anatómica de las lesiones arterioscleróticas es diferente, por lo que se siguieron criterios específicos de selección para cada sector:

#### **Enfermedad oclusiva o estenótica carotídea**

Desde el punto de vista clínico se incluyeron 23 pacientes con estenosis carotídea grave, es decir, pacientes con indicación quirúrgica basados en los criterios de los estudios NASCET (estenosis mayor del 70% y sintomatología de ACV o AIT previos) (NASCET 1991), o con criterios ACAS (ACAS 1995) (estenosis graves asintomáticas). La muestra de pared arterial obtenida fue la endarteria reseca durante la intervención quirúrgica.

#### **Enfermedad oclusiva aorto-iliaca**

Fueron 17 pacientes con enfermedad oclusiva o estenótica de aorta abdominal infrarrenal o iliaca, en grado II-b (claudicación intermitente de miembros inferiores a menos de 250 metros), o en estadio III (dolor de reposo en miembros inferiores) correspondiente a la clasificación de Fontaine. Los pacientes incluidos en este estudio fueron aquellos a los que se les pudo recoger, durante la cirugía revascularizadora, una muestra de pared arterial enferma de arteriosclerosis. Se obtuvo la biopsia de una zona macroscópicamente afectada de arteriosclerosis.

#### **Enfermedad oclusiva fémoro-poplítea**

Fueron 14 pacientes con enfermedad oclusiva o estenótica de arterias femoral común, femoral superficial o poplítea. Los pacientes seleccionados en este grupo estaban en situación clínica de isquemia crónica grado II-b (claudicación intermitente de miembros inferiores a menos de 250 metros), grado III (dolor de reposo en miembros inferiores) o en estadio IV (lesiones tróficas isquémicas en miembros inferiores). A los enfermos incluidos en este subgrupo también se les recogió, durante la cirugía revascularizadora, una muestra de pared arterial macroscópicamente afectada de arteriosclerosis.

#### **Enfermedad aneurismática de aorta**

En este grupo se incluyeron 14 pacientes portadores de aneurisma de aorta abdominal infrarrenal de más de 5 centímetros de diámetro máximo y que fueron intervenidos quirúrgicamente para exclusión de su aneurisma. De ellos se obtuvo también una biopsia de pared de aorta aneurismática.

#### **3.2.2. Criterios de exclusión**

El primer criterio de exclusión fue la no aceptación a participar en este estudio tras información, y por tanto el no firmar el consentimiento informado (Anexo I) que fue pasado a todos los candidatos.

También fueron criterios de exclusión los siguientes:

1. Pacientes con esperanza de vida inferior a seis meses.
2. Neoplasias en tratamiento quimioterápico y/o radioterápico.
3. Aneurismas de aorta abdominal intervenidos de urgencia por rotura o fisuración.
4. Pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica con tratamiento corticoideo a largo plazo.

5. Pacientes que precisaban tratamiento corticoideo o inmunosupresor por enfermedades reumáticas o autoinmunes.
6. Pacientes con infecciones previas que precisaron terapéutica antibiótica.
7. Pacientes alérgicos a betalactámicos. En nuestro hospital está protocolizado a este tipo de pacientes realizar profilaxis preoperatoria de cirugía arterial con eritromicina.
8. Pacientes alérgicos a contrastes yodados.
9. Gestación y menores de edad.
10. En el caso de los pacientes con aneurismas, todos aquellos de posible causa infecciosa, o no ateromatosa.
11. Hay que señalar que no se excluyeron pacientes diabéticos, ni con enfermedad coronaria, cerebrovascular o arterial previa conocida.

### **3.2.3. Criterios diagnósticos**

La metodología diagnóstica que se siguió para confirmar la enfermedad arteriosclerótica en el grupo de los casos fue la siguiente:

Exploración clínica: haciendo especial referencia a la exploración de pulsos a todos los niveles, y auscultación del árbol arterial.

Exploración hemodinámica: se practicaron dos tipos de pruebas diagnósticas en todos los pacientes:

a) determinación y registro de las ondas pletismográficas en miembros inferiores a nivel de muslos, pantorrillas y tobillos.

b) determinación y registro de presiones sistólicas segmentarias en miembros inferiores, utilizando como testigos la señal Doppler de las arterias tibial posterior o pedia.

### 3. Material y métodos

---

Todas estas pruebas se llevaron a cabo por la misma diplomada en enfermería, en el Laboratorio Vascular del Servicio de Angiología y Cirugía Vascular antes referido. El aparato utilizado para todas las pruebas hemodinámicas fue VasoScan VL (Irlanda).

Eco-Doppler: esta técnica se utilizó en los pacientes con estenosis carotídea. Se siguieron criterios velocimétricos para calcular el grado de estenosis. Esta técnica se realizó en el Servicio de Radiología.

Ecografía abdominal: utilizada en la mayoría de los casos de aneurisma de aorta abdominal como primera prueba diagnóstica. Esta técnica se realizó en el Servicio de Radiología.

Tomografía Axial Computerizada: utilizada en todos los casos de aneurisma aórtico, realizándose cortes axiales de 8 ó 10 mm., tras la infusión de contraste radiológico intravenoso. Esta técnica se realizó en el Servicio de Radiología.

Arteriografía: fue la técnica de elección en todos los casos de enfermedad oclusiva en todas las localizaciones anatomoclínicas estudiadas: aorto-ilíaca, femoral, carotídea. Se utilizó preferentemente arteriografía convencional en patología proximal y periférica, y angiografía digital en patología carotídea. Esta técnica se realizó en el Servicio de Radiología.

Todos los pacientes se diagnosticaron de forma conjunta por los miembros del Servicio de Angiología y Cirugía Vascular, conociendo todas las pruebas diagnósticas y la situación clínica de cada enfermo. La sintomatología clínica siempre fue la que orientó al diagnóstico de arteriosclerosis, y se confirmó mediante los hallazgos exploratorios obtenidos en las técnicas diagnósticas por imagen, adecuadas en cada territorio, como fueron: arteriografía, ecografía-doppler o TAC. En todos los casos el diagnóstico de enfermedad arteriosclerótica y la indicación quirúrgica fue adoptada

por consenso de los miembros del Servicio.

### 3.2.4. Datos epidemiológicos

El grupo de casos se formó con 68 pacientes. A continuación se describen los datos referidos al grupo de enfermos y a los cuatro subgrupos en función del sector anatomoclínico con afectación predominante en cada paciente.

#### Subgrupos clínicos

En función del sector arterial con indicación quirúrgica distinguimos cuatro subgrupos (tabla 3).

El grupo "Periférico" se constituyó por pacientes con enfermedad oclusiva del sector femoro-poplíteo. En el grupo "Aneurisma" se incluyó a aquellos pacientes con enfermedad aneurismática abdominal infrarrenal. El grupo "Carótida" incluyó a los pacientes con estenosis carotídea. Por último, dentro del grupo "Proximal" se incluyeron a los pacientes con enfermedad oclusiva del sector aorto-ilíaco.

SUBGRUPO	PACIENTES	PORCENTAJE
<i>Periférico</i>	14	20,6%
<i>Aneurisma</i>	14	20,6%
<i>Carótida</i>	23	33,8%
<i>Proximal</i>	17	25%

**Tabla 3:** Subgrupos de los casos

Esta catalogación en cuatro subgrupos se basó en que la arteriosclerosis tiene distintos patrones de comportamiento clínico y evolutivo dependiendo del sector que se afecte. Como ya se comentó anteriormente, la epidemiología y factores de riesgo en estas formas clínicas de arteriosclerosis son específicas.

**Edad**

La edad media del grupo fue de  $66,87 \pm 8,56$  años. Los intervalos de edad más frecuentes fue de los 70 a 74 años y 60 a 64 años. La distribución de la edad respecto a cada subgrupo clínico fue la que se describe en la tabla 4.

SUBGRUPO	EDAD	DESVIACIÓN
<i>Periférico</i>	67,93	$\pm 7,14$
<i>Aneurisma</i>	67,5	$\pm 12,15$
<i>Carótida</i>	65,3	$\pm 7,34$
<i>Proximal</i>	63,59	$\pm 7,71$

**Tabla 4:** Distribucion de la edad en los subgrupos

Los enfermos de mayor edad desarrollaron enfermedad arteriosclerótica de los miembros inferiores. Los más jóvenes sufrieron, fundamentalmente, estenosis o trombosis del sector aorto-iliaco (enfermedad proximal).

**Sexo**

La distribución por sexo fue: varones 57 (83,8%) y mujeres 11 (16,2%). La distribución dentro de los subgrupos queda reflejada en la tabla 5. Estas distribuciones de la enfermedad arteriosclerótica es muy similar a la observada en la práctica clínica diaria, siendo la enfermedad aneurismática y la del sector proximal relativamente rara en mujeres. La distribución por sexo de la arteriosclerosis, como se constata en la literatura, es más frecuente en el sexo masculino, lo que coincide con la distribución en nuestro estudio.

SUBGRUPO	HOMBRES	MUJERES
<i>Periférico</i>	11 (78,6%)	3 (21,4%)
<i>Aneurisma</i>	13 (92,9%)	1 (7,1%)
<i>Carótida</i>	17 (73,9%)	6 (26,1%)
<i>Proximal</i>	16 (94,1%)	1 (5,9%)

**Tabla 5:** Distribución del sexo en los subgrupos

### Hábito tabáquico

Se estudió el hábito tabáquico en los pacientes. Como ya se ha comentado, se consideró como expuesto al hábito tabáquico tanto a los fumadores como ex-fumadores; por tanto, encontramos que tenían relación con el tabaquismo 51 pacientes (75%), y no tenían relación 17 pacientes (25%).

La distribución del factor tabaquismo dentro de los subgrupos fue la que se expone en la tabla 6. Se demuestra que el hábito tabáquico estuvo muy presente en el grupo de enfermedad aneurismática, aunque en todos los subgrupos más de la mitad de los pacientes tenían relación con el tabaco.

SUBGRUPOS	SÍ RELACIÓN TABACO	NO RELACIÓN TABACO
<i>Periférico</i>	10 (71,4%)	4 (28,6%)
<i>Aneurisma</i>	11 (78,6%)	3 (21,4%)
<i>Carótida</i>	17 (73,9%)	6 (26,1%)
<i>Proximal</i>	13 (76,5%)	4 (23,5%)

**Tabla 6:** Distribución del hábito tabáquico en los subgrupos

### Diabetes

La diabetes mellitus se ha clasificado en dos categorías: diabéticos y no diabéticos. Se encontró que había 19 pacientes diabéticos (27,9%), frente a 49 no diabéticos (72,1%). La distribución dentro de los subgrupos mostró un alto número de casos de diabetes en el grupo de pacientes con patología de tipo carotídea (tabla 7), y en el resto de los subgrupos la distribución de diabéticos fue más homogénea.

SUBGRUPOS	DIABÉTICOS	NO DIABÉTICOS
<i>Periférico</i>	3 (21,4%)	11 (78,6%)
<i>Aneurisma</i>	4 (28,6%)	10 (71,4%)
<i>Carótida</i>	7 (30,4%)	16 (69,6%)
<i>Proximal</i>	5 (29,4%)	12 (70,6%)

**Tabla 7:** Distribución de la diabetes en los subgrupos

#### Tensión arterial sistólica

Se midió la tensión arterial sistólica en todos los pacientes estudiados y mostró una cifra media global de 148,1 mm. de Hg  $\pm$  18,4. La distribución por subgrupos mostró que los aneurismas tenían una tensión media superior (tabla 8).

SUBGRUPO	TENSIÓN SISTÓLICA	DESVIACIÓN
<i>Periférico</i>	153,6	$\pm$ 12,8
<i>Aneurisma</i>	156,4	$\pm$ 21,7
<i>Carótida</i>	138,7	$\pm$ 18,7
<i>Proximal</i>	149,4	$\pm$ 14,3

**Tabla 8:** Distribución de la tensión en los subgrupos

#### Obesidad

Fueron obesos 16 pacientes (23,5%), frente a 52 con peso normal (76,5%). La distribución en los subgrupos queda reflejada en la tabla 9.

SUBGRUPOS	OBESOS	NO OBESOS
<i>Periférico</i>	4 (28,6%)	10 (71,4%)
<i>Aneurisma</i>	3 (21,4%)	11 (78,6%)
<i>Carótida</i>	6 (26,1%)	17 (73,9%)
<i>Proximal</i>	3 (17,6%)	14 (82,4%)

**Tabla 9:** Distribución de la obesidad en los subgrupos

#### Enfermedad arteriosclerótica

Se estudiaron los antecedentes de enfermedad arteriosclerótica en los 68 pacientes. Para ello se distinguieron tres categorías:

a) Enfermedad cerebrovascular previa: considerándose que estaba presente cuando los pacientes habían sufrido accidente isquémico transitorio o ictus previo. Esta circunstancia estuvo presente en 33 casos (48,5%).

b) Cardiopatía isquémica: considerándose que estaba presente en aquellos

pacientes que sufrían cualquier tipo de enfermedad coronaria, desde angina estable a infarto de miocardio previo. Se incluyeron aquellos pacientes con intervención coronaria previa y situación funcional normal. Esta alteración estuvo presente en 31 casos (45,6%).

c) Enfermedad vascular periférica previa: Se considero sólo a aquellos pacientes que habían sufrido técnicas de cirugía arterial previa hacía más de un año del procedimiento actual. Antecedentes de cirugía vascular previa se encontraron en 12 pacientes (17,6%).

Destacó lógicamente, que todos los pacientes del grupo carotídeo fueron intervenidos por padecer enfermedad cerebrovascular. La cardiopatía isquémica fue el antecedente más frecuente en todos los subgrupos. Destacando especialmente en el subgrupo de enfermedad aneurismática. También se encontró una pobre asociación entre los antecedentes de cirugía arterial previa con cualquiera de los subgrupos clínicos.

### **Colesterol**

Se estudió el nivel de colesterol en muestra sanguínea en el grupo de casos, donde se determinó un valor de la media de 205,28 mg/dl con una desviación típica de 41,53. Se define como hipercolesterolemia aquellos valores iguales o superiores a 220 mg/dl. En el grupo de casos 24 sujetos (35,3%) fueron hipercolesterolémicos, frente a 44 (64,7%) no hipercolesterolémicos. La distribución entre los diferentes grupos de casos se describe en la tabla 10.

<b>SUBGRUPOS</b>	<b>HIPERCOLESTE-ROLÉMICOS</b>	<b>NO HIPERCOLESTE-ROLÉMICOS</b>
<i>Periférico</i>	6 (42,9%)	8 (57,1%)
<i>Aneurisma</i>	6 (42,9%)	8 (57,1%)
<i>Carótida</i>	8 (34,8%)	15 (65,2%)
<i>Proximal</i>	4 (23,5%)	13 (76,5%)

**Tabla 10:** Distribución de la hipercolesterolemia en subgrupos

#### **Triglicéridos**

Se estudió el nivel de triglicéridos en muestra sanguínea en el grupo de casos, donde se determinó un valor de la media de 125,44 mg/dl con una desviación típica de 40,26. Se define como hipertrigliceridemia aquellos valores iguales o superiores a 150 mg/dl. En el grupo de casos 19 sujetos (27,9%) son hipertrigliceridémicos, frente a 49 sujetos (72,1%) no hipertrigliceridémicos. La distribución entre los diferentes grupos de casos se describe en la tabla 11.

<b>SUBGRUPOS</b>	<b>HIPERTRIGLICE- RIDÉMICOS</b>	<b>NO HIPERTRIGLICE- RIDÉMICOS</b>
<i>Periférico</i>	4 (28,6%)	10 (71,4%)
<i>Aneurisma</i>	5 (35,7%)	9 (64,3%)
<i>Carótida</i>	8 (34,8%)	15 (65,2%)
<i>Proximal</i>	2 (11,8%)	15 (88,2%)

**Tabla 11:** Distribución de la hipertrigliceridemia en subgrupos

#### **Fibrinógeno**

Se estudió el nivel de fibrinógeno en muestra sanguínea en el grupo de casos, donde se determinó un valor de la media de 370,26 mg/dl con una desviación típica de 97,97.

### **3.3. Grupo control**

El grupo control se constituyó a partir de 50 individuos con insuficiencia venosa crónica superficial, subsidiaria de tratamiento quirúrgico. El tipo de cirugía indicada fue safenectomía más varicectomía complementaria. Los pacientes de este grupo no habían sido diagnosticados de arteriosclerosis periférica, coronaria o cerebrovascular.

### **3.3.1. Criterios de selección**

Fueron seleccionados de entre los pacientes tratados en el Servicio de Angiología y Cirugía Vasculat del Hospital Universitario “San Cecilio” de Granada. El proceso de selección del grupo control se efectuó una vez terminada la inclusión de los casos. El motivo de este proceder fue poder ajustar el grupo control al grupo de casos en función de las variables edad y sexo.

Se admitieron varones y mujeres de edad superior a 55 años, que padecieran insuficiencia venosa superficial con dilataciones varicosas e indicación de tratamiento quirúrgico. Fueron pacientes en estadio clínico II (edema persistente) o grado III (trastornos tróficos de la piel), según la clasificación del Comité de Consenso Internacional en Enfermedad Crónica Venosa (Porter y Moneta, 1995). Sólo se incluyó a aquellos pacientes con indicación de safenectomía interna completa. La selección de los pacientes se realizó de forma continuada en el tiempo, ajustándose según edad y sexo. Si aceptaban participar en el estudio se iniciaba el protocolo de anamnesis y determinaciones analíticas.

### **3.3.2. Criterios de exclusión**

En primer lugar, la inclusión en este estudio ha sido voluntaria y no han participado aquellos pacientes que, tras ser informados de la posibilidad de ser incluidos en el trabajo, voluntariamente, no aceptaron firmar el consentimiento informado que se les ofertó como garantía (Anexo I).

También fueron excluidos del estudio todos aquellos pacientes que reunían alguno de los siguientes criterios clínicos o sociales:

1. Pacientes menores de 55 años, para ajustar con el grupo de casos.
2. Pacientes con úlceras venosas, aunque estuvieran completamente cicatrizadas, debido a que estos pacientes suelen precisar, para el tratamiento de sus complicaciones, antibioterapia.

3. Pacientes con episodios previos de varicoflebitis, por que también se pueden tratar con antibioterapia, en algunas ocasiones.
4. Pacientes con criterios clínicos de isquemia crónica de miembros inferiores. Se han excluido incluso a los pacientes en estadio funcional I de la clasificación de Fontaine, esto es, ausencia de pulsos distales sin ninguna clínica isquémica.
5. Pacientes con antecedentes de enfermedad cerebrovascular.
6. Pacientes con cardiopatía isquémica.
7. Pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica con tratamiento corticoideo a largo plazo.
8. Pacientes que precisaban tratamiento corticoideo o inmunosupresor por enfermedades reumáticas o autoinmunes.
9. Pacientes alérgicos a betalactámicos.
10. La diabetes no se consideró criterio de exclusión.

#### **3.3.3. Criterios diagnósticos**

La metodología diagnóstica que se siguió en este grupo de pacientes se orientó a asegurar que no sufrían arteriosclerosis. Las pruebas clínicas e instrumentales utilizadas para el diagnóstico de la enfermedad varicosa no tienen relevancia alguna para el estudio sobre enfermedad arteriosclerótica. La metodología ha sido la siguiente:

Exploración clínica: con especial atención a la exploración de pulsos a todos los niveles, y auscultación del árbol arterial.

Electrocardiograma basal: como prueba diagnóstica de la batería del estudio preanestésico, también sirvió para asegurar la ausencia de enfermedad coronaria.

Exploración hemodinámica: sólo se practicó cuando, aun existiendo pulsos distales en los miembros inferiores, en la anamnesis surgió alguna duda de posible

presencia de enfermedad isquémica. Las técnicas seguidas fueron: determinación y registro de las ondas pletismográficas en miembros inferiores a nivel de muslos, pantorrillas y tobillos; y, en algunos casos, determinación y registro de presiones sistólicas segmentarias en miembros inferiores.

Eco-Doppler: esta técnica se ha utilizado para el diagnóstico y planificación de la cirugía de varices sobre el sistema venoso superficial. También se ha practicado una exploración básica a nivel carotídeo para descartar la presencia de estenosis carotídea asintomática.

### **3.3.4. Datos epidemiológicos**

El grupo control estuvo formado por 50 pacientes.

#### **Edad**

La edad media del grupo fue de 60,12 años  $\pm$  3,49. Aunque se hubiera asegurado un mejor ajuste admitiendo a pacientes más mayores, generalmente no hay muchos pacientes mayores de 70 años con indicación de cirugía de varices. El beneficio potencial de la resección de varices en varones, de edad avanzada, con posibles enfermedades que eleven el riesgo quirúrgico, no está demostrado. De cualquier manera, más de la mitad de los pacientes del grupo control fueron mayores de 60 años.

#### **Sexo**

El sexo siguió una distribución ajustada a la del grupo control. Se reclutaron 40 varones (80%) y 10 mujeres (20%).

#### **Hábito tabáquico**

Aunque en principio no se persiguió el ajuste por este factor, se encontró una distribución parecida a la del grupo de casos. Se siguieron las mismas categorías

### 3. Material y métodos

anteriormente utilizadas: fumadores activos, pacientes sin ninguna relación con el tabaquismo, y exfumadores. La distribución de este factor es el que se describe en la tabla 12. Desde el punto de vista práctico, también se consideraron como expuestos al hábito tabáquico, tanto a los fumadores como exfumadores; por tanto esta categoría se convirtió en solo dos: con relación al tabaquismo 30 pacientes (60%) y sin relación alguna con el tabaquismo 20 pacientes (40%).

SEXO	RELACIÓN CON EL TABACO	NO RELACION CON EL TABACO
<i>Varones</i>	25 (62,5%)	15 (37,5%)
<i>Mujeres</i>	5 (50%)	5 (50%)

**Tabla 12:** Relación del tabaquismo en función del sexo en los controles

#### Diabetes

Han sido pocos los pacientes diabéticos que se encontraron en este grupo. Solamente dos casos y ambos eran varones (tabla 13).

SEXO	DIABÉTICO	NO DIABÉTICO
<i>Varones</i>	2 (5%)	38 (95%)
<i>Mujeres</i>	0	10 (100%)

**Tabla 13:** Relación de la diabetes según el sexo en los controles

#### Tensión arterial sistólica

Se midió la tensión arterial sistólica en todos los pacientes del grupo control, mostrando una cifra media global de: 122,6 mm de Hg  $\pm$  15,2. Respecto al sexo se encontró que la media en los varones fue de 124,3  $\pm$  15,5 y en la mujeres de 116  $\pm$  12,6.

La condición de hipertenso se presentó en 4 casos (8%), de ellos 3 varones y una mujer.

### **Obesidad**

Considerando los mismos parámetros de obesidad que los referidos en el grupo de casos, se halló que 14 pacientes eran obesos (28%) frente a 36 con normopeso, (72%). La distribución por sexo mostró que había 8 varones obesos (57,1%), frente a 6 mujeres (42,9%).

### **Enfermedad arteriosclerótica**

En este grupo se excluyó a todos los pacientes con antecedentes de arteriosclerosis.

### **Colesterol**

Se estudió el nivel de colesterol en muestra sanguínea en el grupo de controles, donde se determinó un valor de la media de 170,42 mg/dl con una desviación típica de 25,1. En el grupo de controles 2 sujetos (4%) fueron hipercolesterolémicos, frente a 48 sujetos (96%) no hipercolesterolémicos.

### **Triglicéridos**

Se estudió el nivel de triglicéridos en muestra sanguínea en el grupo de controles, donde se determinó un valor de la media de 104,04 mg/dl con una desviación típica de 37,65. En el grupo de controles 4 sujetos (8%) eran hipertrigliceridémicos, frente a 46 sujetos (92%) no hipertrigliceridémicos.

### **Fibrinógeno**

Se estudió el nivel de fibrinógeno en muestra sanguínea en el grupo de controles, donde se determinó un valor de la media de 355,0 mg/dl con una desviación típica de 79,11.

### **3.4. Obtención de muestras para el estudio**

Para estudiar el papel de la infección por *C. pneumoniae*, en ambos grupos se efectuaron determinaciones serológicas para evaluar la seroprevalencia, Western-blot de suero para determinación de perfil antigénico y se investigó la presencia del patógeno en biopsias arteriales.

#### **3.4.1. Muestras para serología**

Las muestras serológicas, para determinar la respuesta inmune frente a *C. pneumoniae*, se obtuvieron en los dos días siguientes al ingreso hospitalario. Se consiguió una muestra de sangre periférica de 3 ml de la que se obtuvo el suero, que se conservó a -20 °C hasta su posterior procesamiento.

#### **3.4.2. Biopsias de arteria**

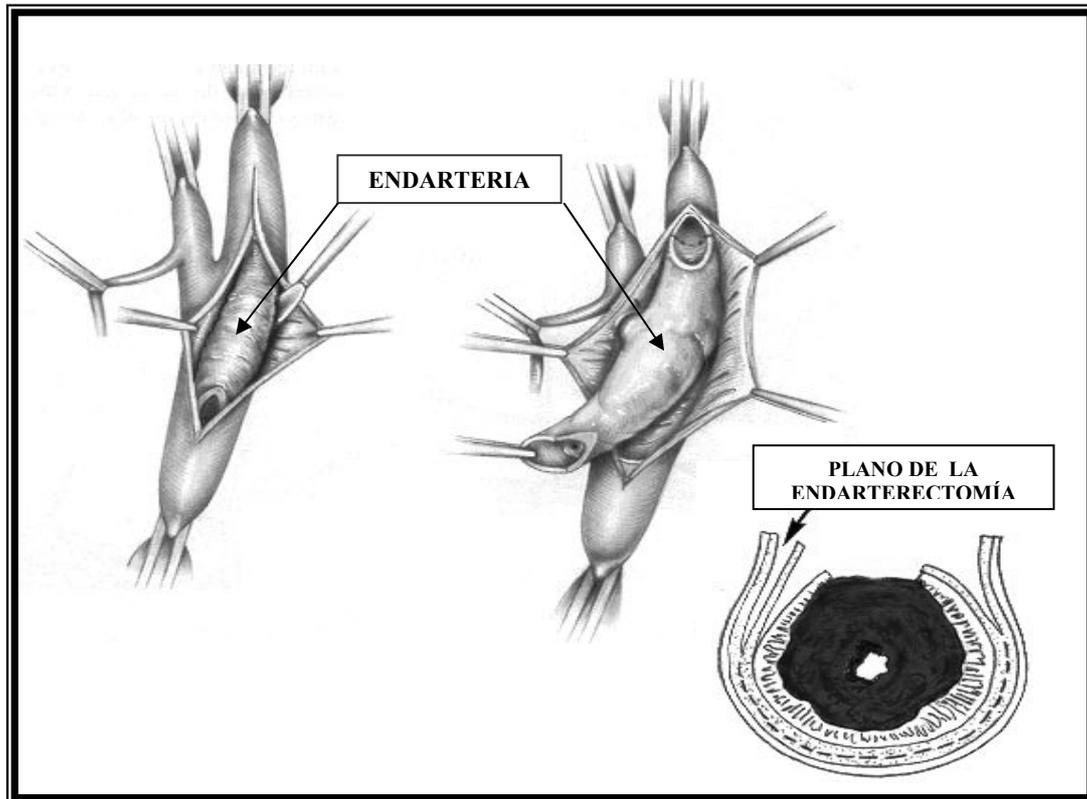
De todos los pacientes, casos y controles, se obtuvieron biopsias de pared arterial para investigar la presencia de ADN de *C. pneumoniae*. Del grupo de pacientes-casos se consiguió una muestra específica de cada zona arterial patológica, y de los controles se obtuvo un segmento de arteria sana (arteria pudenda).

##### **3.4.2.1. Grupo de casos**

De cada subgrupo de pacientes se obtuvo una biopsia de la zona afectada por la arteriosclerosis. Se evitó recoger zona de trombo parietal, dado que los trombos arteriales adheridos a pared ateromatosa son muy pobres en células, salvo hematíes y plaquetas. A continuación se describen las zonas biopsiadas en cada subgrupo:

Subgrupo “carótida”

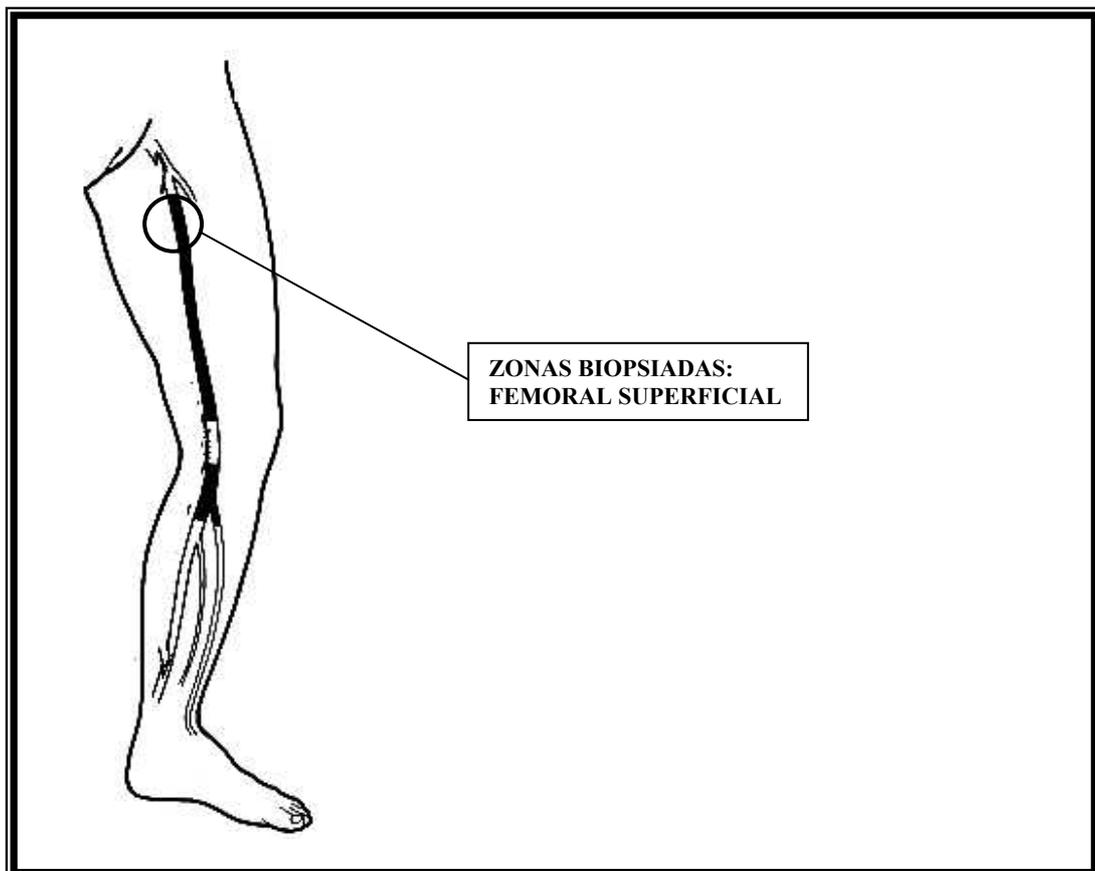
En este subgrupo la muestra obtenida fue la endarteria de la carótida en su zona más estenótica, y se obtuvo durante la cirugía (figura 17). La muestra de pared, como en todas las endarterectomías, incluyó el endotelio ateromatoso y los dos tercios medios de la media, hasta la membrana limitante externa.



**Figura 17:** Estenosis carotídea. Técnica quirúrgica.

#### Subgrupo “periférico”

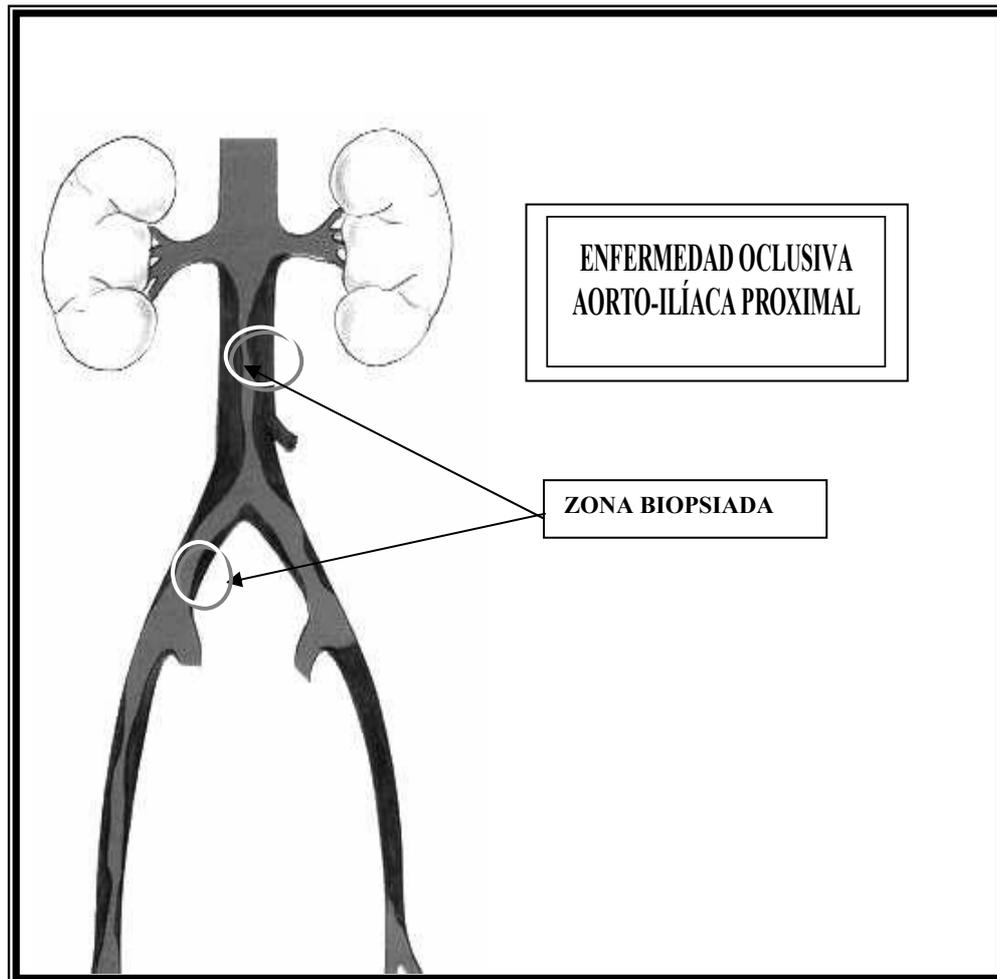
En este subgrupo la muestra obtenida fue preferentemente de arteria femoral (figura 18). En todos los casos se consiguió una muestra de al menos 1 cm<sup>2</sup> de pared arterial que presentara engrosamiento arteriosclerótico. Se eliminaron del estudio las muestras fuertemente calcificadas. La biopsia siempre incluyó todas las capas de la pared arterial.



**Figura 18:** Obliteración femoral superficial y poplítea

Subgrupo “proximal”

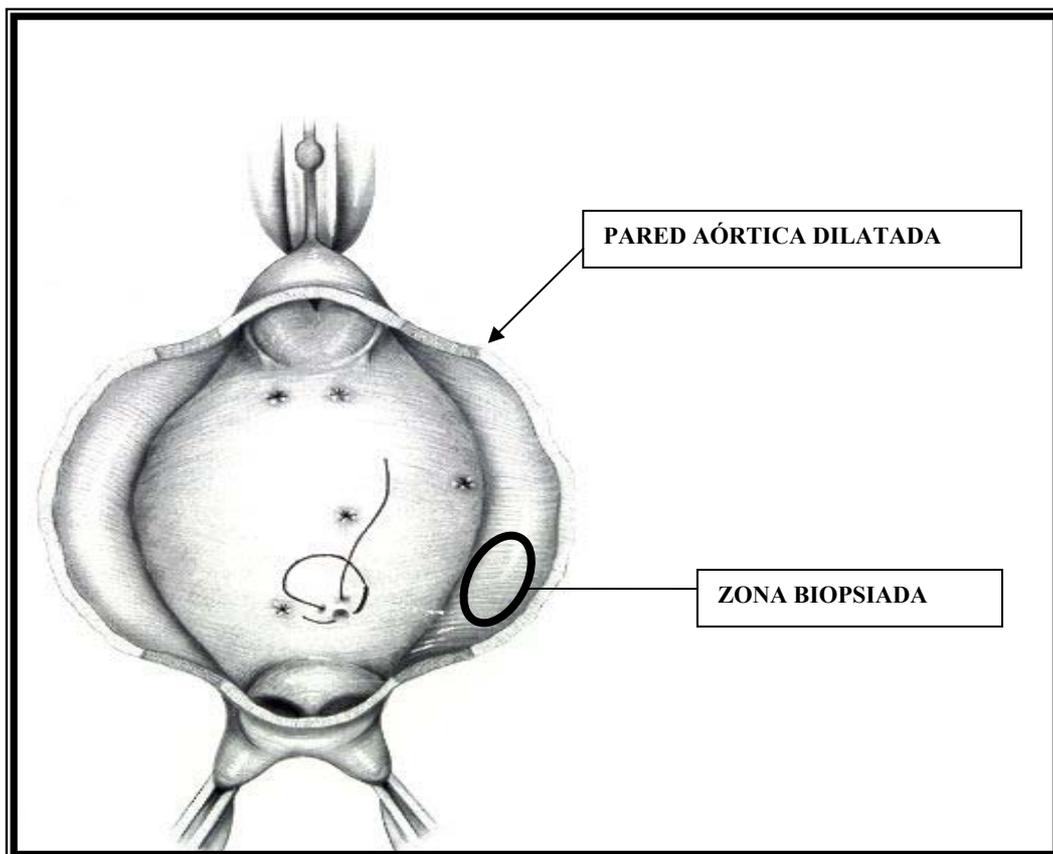
En el subgrupo de pacientes portadores de patología aorto-iliaca se obtuvieron muestras de pared arterial (figura 19). Al igual que en el grupo anterior, la muestra fue de toda la pared arterial, siempre con arteriosclerosis macroscópica.



**Figura 19:** Patología aorto-iliaca

#### Subgrupo “aneurisma”

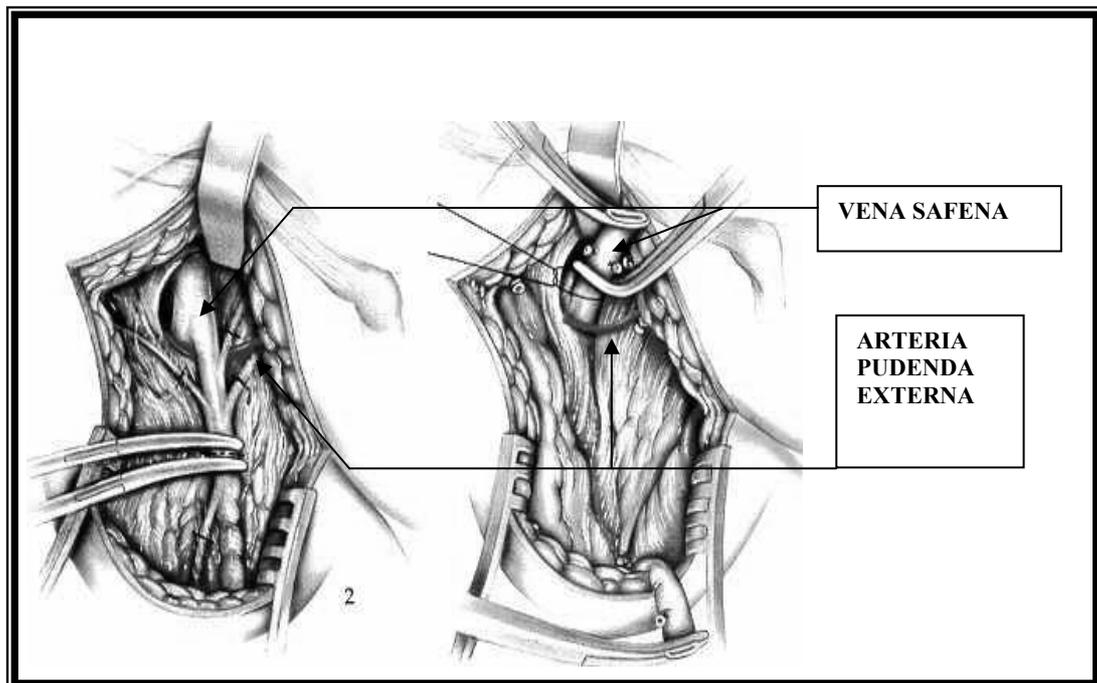
A los pacientes con enfermedad aneurismática de la aorta infrarrenal se les recogió una muestra de pared del aneurisma (figura 20). Las biopsias se obtuvieron de la zona anterior del aneurisma evitando siempre la zona posterior de la aorta, que no suele estar afectada de patología ectasiante.



**Figura 20:** Aneurisma aórtico infrarrenal

### 3.4.2.2. Grupo control

En los 50 pacientes del grupo control la muestra de arteria que se recogió fue un trozo de 1 cm de la arteria pudenda externa, rama muscular de la arteria femoral común. La arteria pudenda externa topográficamente cruza dorsal y perpendicular a la porción más proximal de la safena interna justo a nivel del cayado de esta vena (figura 21). Para facilitar la extracción de esta arteria se utilizó a un grupo de pacientes ajustado según edad y sexo que padecían patología varicosa con insuficiencia ostial del cayado de safena interna, que como hemos comentado anteriormente, anatómicamente está en vecindad con la arteria pudenda. Por otra parte, la resección y extracción de este segmento de arteria pudenda, no plantea ningún problema clínico en sujetos sanos.



**Figura 21:** Relación del cayado y la vena safena.

Entonces, se recogieron un total de 118 muestras de vasos. Que se distribuyeron del siguiente modo:

- 68 biopsias de arterias con enfermedad arteriosclerótica.
- 50 segmentos de arteria pudenda.

En todos los casos la masa de arteria recogida fue al menos de medio centímetro cúbico, salvo en el caso de la arteria pudenda, que fue menor. El diámetro de esta arteria es de 1 mm, aproximadamente, y la longitud extraída, ha sido, generalmente, de 1 cm.

Las biopsias fueron inmediatamente lavadas con suero fisiológico, en el mismo quirófano y en ambiente estéril. Se incluyeron inmediatamente en frascos estériles con medio de transporte y conservación S.P.G.-2 (tampón de ácido glutámico, sacarosa y fosfato) (Gibco, Reino Unido). La composición del S.P.G.-2 por litro es: 75 g. de sacarosa, 0,52 g. de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,22 g. de  $\text{Na}_2\text{HPO}_2$  y 0,72g de ácido glutámico.

Una vez rotuladas, se refrigeraron en congelador a temperatura de entre  $-4^\circ\text{C}$  y  $-10^\circ\text{C}$  durante un periodo de 4 a 16 horas. Tras esta primera congelación se transportaron en cubeta isotérmica, asegurando la cadena de frío, hasta un congelador con temperatura media constante de  $-70^\circ\text{C}$ , en almacenamiento, hasta su posterior procesamiento mediante heminested PCR.

#### **3.5. Metodología analítica**

Se describe a continuación la metodología analítica seguida para efectuar todas las determinaciones de laboratorio. Estas fueron las siguientes: nivel de colesterol, nivel de triglicéridos, fibrinógeno, serología de anticuerpos frente a *C. pneumoniae*, determinación de ADN de *C. pneumoniae* mediante reacción en cadena de polimerasa.

### **3.5.1. Nivel de colesterol**

Se ha medido el nivel de colesterol total en todos los pacientes. La determinación de colesterol se hizo mediante la técnica del test enzimático *in vitro* para la determinación cuantitativa del colesterol en suero y plasma humanos (Colesterol CHOD-PAP, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) con el analizador automático de química clínica, Hitachi-Boehringer-Mannheim modelo 917. La determinación de colesterol de Roche cumple con los requisitos de 1992 del National Institute of Health (NIH) en cuanto a un rendimiento aceptable (precisiones y segmento de eje < 3%). Se ha considerado a los pacientes como hipercolesterolémicos cuando su nivel de colesterol superaba los 220 mg/dl.

El método se basa en la determinación de 4-colestenona después del desdoblamiento enzimático de los ésteres de colesterol con colesteroleserasa y la transformación del colesterol por una colesteroxidasa, así como la medición subsiguiente del peróxido de hidrógeno formado a través de una reacción de Trinder. La optimización del desdoblamiento de los ésteres (>99,5%) permite la estandarización por standards primarios y secundarios y una comparación directa con los métodos de referencia del Center of Disease Control (CDC) y del National Institute of Standards and Technology (NIST), ambos de los Estados Unidos.

### **3.5.2. Niveles de triglicéridos**

La determinación de triglicéridos se hizo mediante la técnica del test enzimático *in vitro* para la determinación cuantitativa de triglicéridos en suero y plasma humanos (triglicéridos GPO-PAP, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) con el analizador automático de química clínica, Hitachi-Boehringer-Mannheim, modelo 917. Se ha considerado que los pacientes padecían hipertrigliceridemia cuando su nivel de triglicéridos en sangre superaba los 150 mg/dl.

El método emplea una lipasa lipoproteica de microorganismos para la hidrólisis completa y rápida de triglicéridos a glicerol con oxidación subsiguiente a dihidroxi-acetonafosfato y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno forma, bajo la acción catalítica de la peroxidasa con 4-aminofenazona y 4-clorofenol, un colorante rojo en una reacción de punto final según Trinder.

#### **3.5.3. Nivel de fibrinógeno**

El fibrinógeno se midió como marcador de proceso inflamatorio crónico, con el fin de intentar establecer un paralelismo entre afectación sistémica y seroprevalencia.

El kit y el robot analizador utilizado, establecen como niveles de fibrinógeno normal y bajo, los valores de 277 mg/dl y 118 mg/dl, respectivamente, siendo éstos los niveles aceptados por el laboratorio de Hematología del Hospital Universitario “San Cecilio” de Granada.

La determinación de fibrinógeno se hizo mediante la técnica del cálculo del fibrinógeno derivado, mediante el Kit de tromboplastina PT-Fibrinogen HS (Instrumentation Laboratory, Milán, Italia) en el analizador ACL Futura (Instrumentation Laboratory Company, Lexington, EE.UU).

El kit PT-Fibrinogen HS es un extracto liofilizado de cerebro de conejo con una concentración óptima de iones de calcio y compuesto por viales de tromboplastina de cerebro de conejo con estabilizantes, polibrene (inhibidor de heparina), tampón y conservantes. Un especial y meticuloso procedimiento de fabricación ha conseguido una alta sensibilidad para los factores II, V, VII y X, dando resultados comparables con el Estándar de Referencia Internacional. La alta sensibilidad analítica hace a este reactivo particularmente apropiado para la monitorización de los niveles de fibrinógeno.

### 3.5.4. Investigación del ADN de *C. pneumoniae*

Se llevó a cabo la detección, en todas las muestras, del genoma de la bacteria mediante heminested-PCR. La secuencia de ADN estudiada correspondió a un fragmento, de 474 pares de bases, denominado Pst-1. Éste fue secuenciado el 7 de mayo de 1992 por Campbell y cols. (1992), del grupo de Grayston, en Seattle (EEUU.). Esta secuencia se haya en el locus S83995 (PubMed, GenBank, NCBI gibbsq 83995). El recuento de bases es el siguiente: 157 adenina, 91 citosina, 106 guanidina, 120 timina.

La secuencia completa de bases es la siguiente (en negrita se reflejan la secuencia de los primers HL-1, HM-1 y HR-1 con la dirección de polimerización señalada con flechas):

1 HL-1 →  
CCATTATTCACCGTCGTACAGCAGAAATCGTTGTTTCATGAAGGCCTACT  
CTTTGATCAAG

61  
AGACAATAGAACGGATAGAACAAGAAGATTTAGTGGATCTTTTAATGCC  
TAACTGTGAAA

121  
TGTATGAAGTGTTGAAAGGACTTCTATCAGATTACGAAACGGCATTACAA  
CGGCTAGAAA

181  
TCAATTATAAGACTGAAGTTGAGCATATTCGTGAGGGAGATGCAGATTTA  
GATCATG HM-1

238 →  
**GTGTCATTCGCCAAGGTTAAAGTCTACGTTGCCTCTAAGAGAAAA**  
CTTCAAGTTGGAGA

297  
TAAAATGGCTGGACGACACGGAAATAAAGGTGTTGTTTCCAAAATCGTTC

CCGAAGCGGATATG

**361**

CCATATCTCTCTAACGGAGAACTGTACAAATGATCCCTGAACCCCCCT  
CGGTGCCTTC

**421**

AAGGATGAACCTTGGACAGGTATTAGAAACACACCGTAGGTTATGCAG  
CAAAC

← **HR-1**

#### **Condiciones generales de la PCR**

Para prevenir la posible contaminación y resultados de falsos positivos, se tomaron muchas precauciones en cada paso del ensayo. Así, la premezcla de los reactivos, la extracción del ADN, la amplificación y la detección, fueron realizados en estancias diferentes. Las batas, las pipetas, las puntas anti-aerosoles, los tubos y los reactivos fueron mantenidos en cada habitación. Se hicieron cambios de guantes con frecuencia. Durante la adición del ADN a los tubos de amplificación, se emplearon mascarillas faciales.

Los controles negativos incluyeron un control libre de ADN (H<sub>2</sub>O bidestilada estéril). Los controles positivos internos incluyeron un ADN diferente al de la bacteria (gen de la  $\beta$ -Actina), y los controles positivos externos contenían el genoma purificado de la bacteria. Al menos dos controles negativos se emplearon para el análisis de cada 10 muestras clínicas. Para prevenir los falsos negativos las premezclas de los reactivos de amplificación fueron alicuotadas, y los extractos de ADN fueron analizados detectando el gen de la  $\beta$ -Actina mediante PCR. Todos los extractos de ADN fueron amplificados por duplicado o triplicado.

#### **Preparación de las muestras**

Las biopsias, una vez obtenidas, fueron inmediatamente lavadas con suero fisiológico y se incluyeron en el medio de transporte y conservación estéril SPG-2.

## *Chlamydophila pneumoniae*

---

También se extrajo ADN de cuerpo reticular de *C. pneumoniae* (Vircell, Granada, España).

Estas muestras se refrigeraron entre -4°C y -10°C durante un periodo de 4 a 12 horas para después mantenerlas a -70°C hasta su posterior procesamiento mediante heminested-PCR.

### **Extracción**

Se inició una vez descongelada y cortada la muestra. Para 25-50 mg de tejido se añadió 200 µl de tampón de lisis y 40 µl de Proteinasa K. La mezcla se incubó durante 1 hora a 55°C. A continuación se añadió 200 µl de tampón de unión y se incubó 10 minutos a 72°C.

Posteriormente, se añadió 100 µl de isopropanol y se transfirió la mayoría del material a un tubo con filtro que, tras lavados sucesivos, permitió obtener un sedimento de 200 µl que se conservó a -20°C hasta su procesamiento por PCR

### 3. Material y métodos

#### Amplificación

##### Primera PCR

Se descongelaron los reactivos, menos la polimerasa, y se mantuvieron en frío. Se añadieron los reactivos en el siguiente orden expresado en la tabla 14.

REACTIVO	VOLUMEN 1 TUBO	CONCENTRACIÓN FINAL
<i>Agua destilada estéril</i>	61,075	
<i>Tampón PCR 10X</i>	10	1 X
<i>MgCl</i>	20	5 mM
<i>DNTP</i>	0,5	50 $\mu$ M
<i>Primer 1 (HL-1)</i>	2,5	0,5 $\mu$ M
<i>Primer 2 (HR-1)</i>	0,725	0,5 $\mu$ M
<i><math>\beta</math>-Actina A</i>	1,5	
<i><math>\beta</math>-Actina B</i>	1,5	
<i>Taq DNA Polimerasa</i>	0,2	1 U/100 $\mu$ l
<i>Volumen total</i>	98	

**Tabla 14:** Reactivos para la primera PCR

Secuencia de los cebadores de la  $\beta$ -Actina

$\beta$ -Actina A: 5' - AGGCCAACCGCGAGAAGATGACC - 3'

$\beta$ -Actina B: 5' - GAAGTCCAGGGCGACGTAGCAC - 3'

Se añadieron 2  $\mu$ l del extraído de muestra, agua destilada o control positivo de *C. pneumoniae* a cada vial de 98  $\mu$ l. La PCR se realizó en un termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf, Alemania), bajo el siguiente protocolo: desnaturalización durante 4 min. a 96°C para posteriormente realizar cuarenta ciclos de amplificación consistentes en desnaturalización a 96°C durante un minuto, alineamiento a 55°C durante 1 min. e integración del primer a 72° durante 1 min. La amplificación fue completada con una incubación final a 72°C durante 10 min.

Segunda PCR:

Se añadieron los reactivos en la siguiente forma (tabla 15):

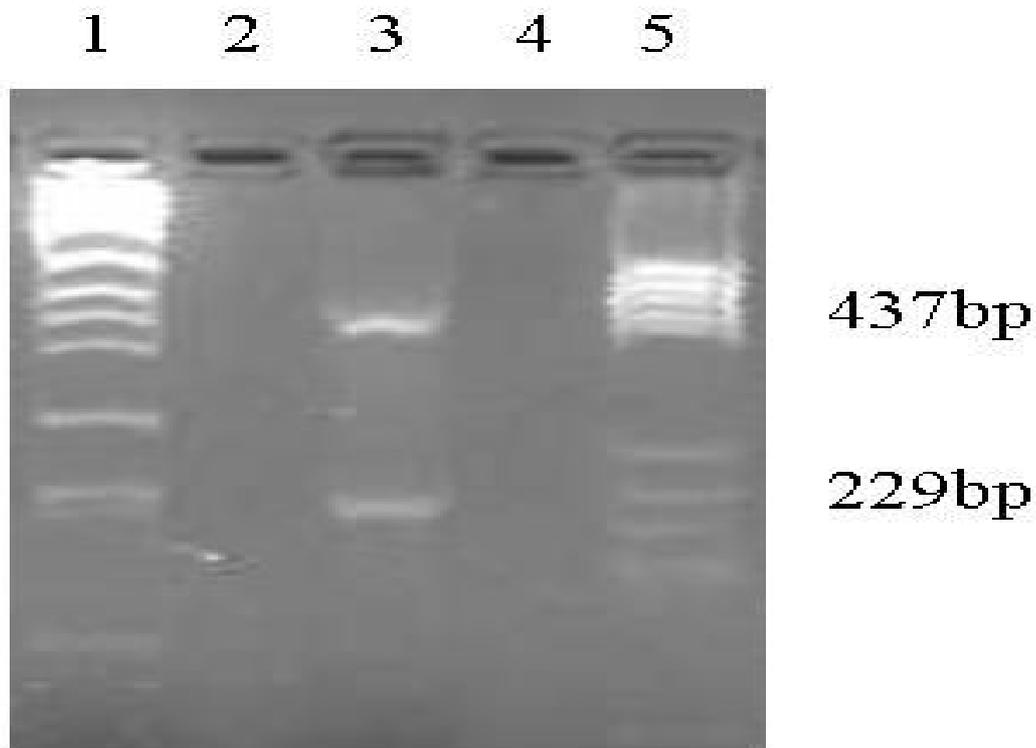
REACTIVO	VOLUMEN 1 TUBO	CONCENTRACIÓN
<i>Agua destilada estéril</i>	72,317	
<i>Tampón PCR 10X</i>	10	1 X
<i>MgCl</i>	12	3 mM
<i>DNTP</i>	2	200 µM
<i>Primer 1 (HM-1)</i>	0,758	0,5 µM
<i>Primer 2 (HR-1)</i>	0,725	0,5 µM
<i>Taq DNA Polimerasa</i>	0,2	1 U/100 µl
<i>Volumen total</i>	98	

**Tabla 15:** Reactivos de la segunda PCR

Se añadieron 2 µl del primer amplificado a la mezcla de 98 µl. Las condiciones de amplificación fueron similares a las anteriormente descritas excepto que el realineamiento se hizo a 48° C.

**Revelado e interpretación de los resultados**

20 µl del producto final de la segunda PCR, se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2% sometido a 110 V durante 1 h., en un tampón de Tris-Borato-EDTA (pH 8,3). Los ácidos nucleicos se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Para la interpretación de los resultados se siguió el criterio de observación de bandas (figura 22). La lectura se consideró positiva cuando apareció en el gel una banda de 229 pares de bases con o sin otra banda de 437 pares de bases. La lectura se considero negativa cuando no aparecieron las bandas anteriores pero sí la derivada del gen de la β-Actina, de 331 pares de bases. Si ninguna de las tres bandas estuvo presente el resultado se consideró no concluyente.



**Figura 22:** Amplificación del ADN de *C. pneumoniae*: Por orden:  
1: MW 154-2176 pb; 2 y 4: controles negativos; 3: positivo; 5: MW 8-587

### 3.5.5. Inmunofluorescencia indirecta

Se investigaron los anticuerpos en suero mediante dilución de la muestra a un título de 1/32, dilución que asegura la especificidad de la reacción y tiene suficiente sensibilidad para detectar los anticuerpos.

Se utilizaron equipos comerciales con cuerpos elementales de *C. pneumoniae* fijados (Focus, EEUU.) y purificados de la presencia del LPS mediante sarcosil. Las muestras fueron estudiadas por duplicado, para confirmar la validez de los resultados. La lectura se realizó en microscopio de fluorescencia Olympus BX40F4 (Japón) con objetivo de 400X, y la interpretación de los resultados de los portaobjetos se realizó por personal cualificado con experiencia.

### **3.5.6. ELISA**

#### **3.5.6.1. ELISA para detectar IgG e IgA anti-CE**

Se usó un ELISA comercial (*C. pneumoniae*, Vircell, España) que emplea un complejo de membrana externa de *Chlamydophila*. 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 CEs purificados por tratamiento con fosfato sódico 10 mM con sarcosil al 2%, EDTA 1,5 mM y NaCl 0,14 mM. Las placas de 96 pocillos (Nunc Maxisorb, Dinamarca) se recubrieron con el antígeno anterior (0,2 µg/pocillo) en PBS 8,5 mM. Se dispensó 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 (DadeBehring 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 minutos con 50 µl de ácido sulfúrico 0,5 M. Las absorbancias se midieron a 450/620 nm.

#### **3.5.6.2. ELISA para detectar IgG e IgA anti-LPS**

Como antígeno se empleó un fragmento específico del LPS de la membrana externa de clamidia, químicamente definido, fijado a pocillos de una placa de microtitulación (Chlamydien-rELISA, Medac, Alemania). Los sueros se diluyeron al 1/100 y se añadieron 50 µl por pocillo (por duplicado). Tras 60 minutos de incubación a 37°C, se añadieron 50 µl de IgG de cabra, anti-IgG o anti-IgA humana según fuera el ensayo, conjugada con peroxidasa, y se incubó durante 60 minutos. A continuación, se añadió a cada pocillo 50 µl de ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se dejó incubar 30 min. Finalmente, se detuvo la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M y se leyó mediante espectrofotómetro a una longitud de onda de 450/620 nm.

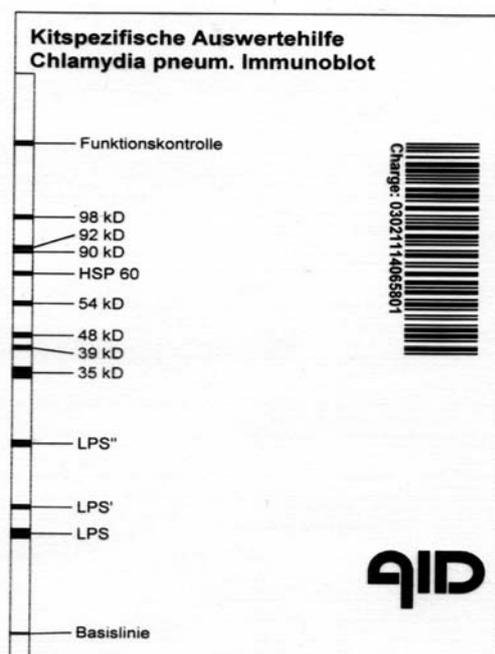
Todos los ensayos incluyeron controles positivos, positivos límite (por duplicado) y negativos. Los resultados de las cuatro pruebas anteriores se expresaron como índices, dividiendo la absorbancia de la muestra por la del positivo límite. Para el análisis de resultados sólo se consideró positivo un índice  $\geq 1,1$ .

Las muestras con un resultado dudoso se repitieron y el nuevo valor se consideró como definitivo en caso de ser positivo o negativo.

#### **3.5.7. Western-blot comercial de *C. pneumoniae***

Se usó una prueba comercial (*Chlamydia pneumoniae* IgG+IgA Inmunoblot, AID GmbH, Alemania) con antígenos de *Chlamydia pneumoniae* separados electroforéticamente mediante SDS-PAGE. Se adicionó 1 ml del suero diluido (1/51) a cada tira y se incubó 40 min. En el caso de la IgA, la muestra se diluyó con anti-IgG (DadeBehring Diagnostics Inc., Alemania). En un segundo paso, se añadió 1 ml de anti-IgG o anti-IgA humana conjugada con fosfatasa alcalina y se incubó 30 min. Como sustrato se usó 1 ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato / azul de nitrotetrazolio y la reacción se detuvo tras 15 min con 1 ml de ácido acético al 3%.

La interpretación fue realizada con el sistema de AID-SCAN. Este se basa en tiras específicas de referencia (figura 23) cuya información está almacenada en un disco y se emplea como patrón de referencia en la prueba de Western-blot. El sistema dispone de un programa que compara las posiciones de las bandas obtenidas con las de referencia. Si se confirman las bandas, éstas se identifican y se expone el resultado. Esta prueba interpreta la presencia de las siguientes bandas: LPSs (de 3 pesos moleculares diferentes); 35 kDa, 39 kDa, 48 kDa, 54 kDa, 60 kDa, 90 kDa, 92 kDa y 98 kDa.



**Figura 23:** Patrón de referencia del equipo comercial

### 3.5.8. Western-blot “in house” de *C. pneumoniae*

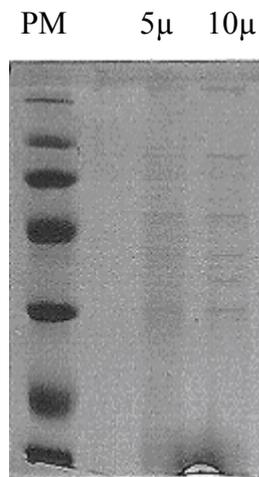
Antes de pasar a su desarrollo quiero expresar que, debido al agotamiento de las muestras, no fue posible su aplicación en todas las muestras de suero. De esta forma se realizó en 56 casos y 48 controles.

#### 3.5.8.1. Electroforesis en SDS-PAGE

Para la realización del Western-blot (WB), en una primera fase, se prepararon las tiras con antígeno separado que posteriormente se utilizaron. Esto incluyó inicialmente el procesamiento de los extractos crudos. Se utilizó la cepa VR 1356 de *C. pneumoniae* inoculadas en células HEp-2 crecidas en medio RPMI (BioWhihaker, EEUU) con un 10% de Suero Fetal Bovino (Kraeber, Alemania). Se realizó una inoculación por centrifugación a 1500g durante 45 min; como medio de crecimiento se empleó RPMI (BioWhihaker, EEUU) con cicloheximida (Sigma, EEUU) a una concentración de 1µg/ml. Las monocapas celulares así infectadas se incubaron durante 96 h. A partir de las mismas, se obtuvieron CE mediante un proceso de

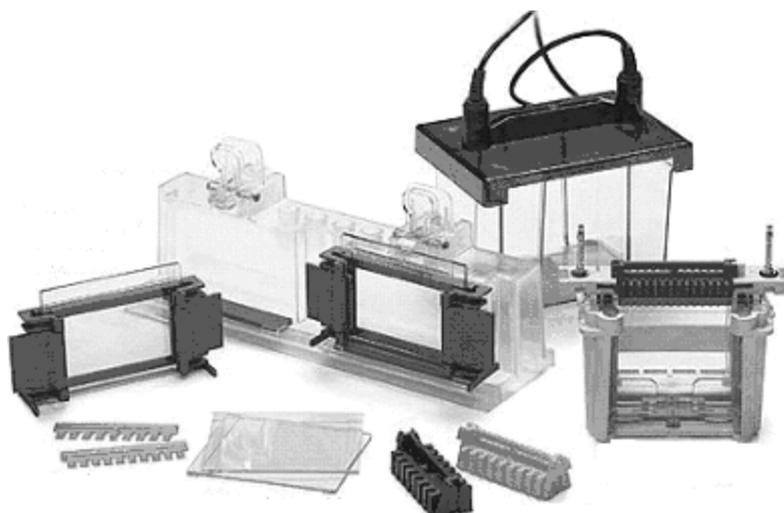
centrifugación.

Los CE fueron, mediante el procedimiento de Ladany y cols. (1989), descongelados y resuspendidos, sucesivamente, en tampón de lisis al 16% (SDS 1%, DTT 0,2 mM, urea 3 M, fosfato sódico 100 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5) con NaCl 0,5 M, lisozima (100 mg/ml, Roche, Suiza) e inhibidores de la proteasa 1x (Roche, Suiza). Se lisaron por sonicación (15 seg. al 50%, Bandelin Sonopuls GM 70, Alemania) y fueron hervidos durante 10 min. Posteriormente, varios volúmenes anteriores fueron cargados en un gel de electroforesis al 15% para establecer el volumen correcto del extracto que se usó en el Western-blot. Antes de realizar el WB del material, los extractos se evaluaron en geles de electroforesis teñidos con Azul de Coomassie (Azul de Coomassie, Pierce Chem., USA), hasta en 3 ocasiones, para estimar la presencia idónea de las bandas proteicas: cuando se observó una separación y homogeneidad óptima de las mismas (figura 24). Se realizó una determinación de Bradford tras la sonicación para determinar la cantidad de proteínas que se estaban cargando por pocillo en la electroforesis de proteínas.



**Figura 24:** Electroforesis del digerido de los cuerpos elementales para la puesta a punto de la cantidad de *C. pneumoniae* idónea

Para la elaboración de los geles (figura 25) se utilizaron los “*casting stand*” (Bio-Rad, EEUU) con spacers de 0,75 mm de espesor que permiten obtener 2 geles de 6 x 8 cm. El depósito de la solución de acrilamida (“*separating gel*”) se hizo con la ayuda de una pipeta. A continuación se dispuso isopropanol en la superficie de cada gel. Se dejó polimerizar a temperatura ambiente durante 1 hora, se eliminó el isopropanol y se añadió una solución de “*stacking gel*” intercalando los peines entre los cristales para modelar 10 pocillos. Se dejó polimerizar la solución 1 hora a temperatura ambiente, y se extrajo el peine. Por último, se lavaron los pocillos con la solución de tampón de migración (“*running buffer*”) y se colocaron los geles en la cubeta de electroforesis. Los geles obtenidos se conservaron entre las placa de vidrio, en cámara húmeda a 4°C, durante 2-3 días, si su uso no fue inmediato.



**Figura 25:** Preparación de geles y cámara de electroforesis

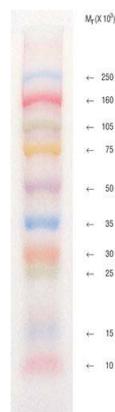
Para la realización de todas las electroforesis se siguió el método de Laemmli (1970). Para ello se utilizó una mini-cámara electroforética (Mini Protean 3 Cell, Bio Rad, EEUU) con una fuente de alimentación (Power Pac 3000, Bio-Rad, EEUU) a 150 V, constante, y 50 mA (figura 25).

### 3. Material y métodos

---

Se prepararon 10 µl del extracto de la bacteria y tampón de carga a una concentración final 1X (“*cracking buffer*” 4X) para cada pocillo, que se calentaron y enfriaron sucesivamente para desnaturalizar las proteínas. Se centrifugó (130 g, 5 seg.) y se cargo en cada pocillo. Uno, en cada gel, se reservó para el marcador de peso molecular, a fin de estimar la movilidad relativa de las proteínas sujetas al análisis.

Para analizar el tamaño de las proteínas del extracto el marcador de peso molecular estuvo formado por: fosforilasa b (97 kDa), albúmina (66 kDa), ovalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de la tripsina (20,1 kDa) y lactoalbúmina (14,4 kDa) (Pharmacia biotech, USA). Para analizar las bandas proteicas presentes en el Western-blot se empleó el marcador de peso molecular Rainbow (Culteck Amersham, Dinamarca) compuesto por proteínas recombinantes de referencia de bajo peso molecular (entre 10 y 250 kDa) que se incorporó en cada electroforesis (figura 26). Estas proteínas estan marcadas con diferentes colorantes para visualizar el desarrollo del gel sin necesidad de teñirlo.



**Figura 26:** Patrón de peso molecular

### 3.5.8.2. Inmunotransferencia

La prueba se desarrolló siguiendo la metodología descrita por Tsang y cols. (1983). Para ello 10  $\mu$ l del extracto optimizado en su lisis se cargó en cada pocillo del gel SDS-PAGE (15%). Tras la electroforesis del gel, se eliminó el "stacking gel" y se sumergió en solución de transferencia a 4°C. Posteriormente, se obtuvieron, comparable al tamaño del gel, un trozo de membrana de nitrocelulosa de 0,2  $\mu$ m (Acefesa, España) y 2 papeles de filtro (Papel Whatman, Merk, España) que se incubaron en la solución de transferencia; así como 2 láminas de fibra que se mojaron en esta solución 2 segundos antes de montar esta.

Los antígenos se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,2  $\mu$ m mediante la Unidad Mini Trans Blot (Bio-Rad) a 100 V, constante, y 200 mA durante 2 horas o a 30 V y 90 mA, constante, durante toda la noche (figura 27).

Terminada ésta, se extrajo la membrana de nitrocelulosa y se añadió Rojo Ponceau (Sigma, España) para teñir las proteínas y permitir recortar adecuadamente las tiras de nitrocelulosa. Posteriormente se decoloraron las tiras mediante NaOH 0,1 N.



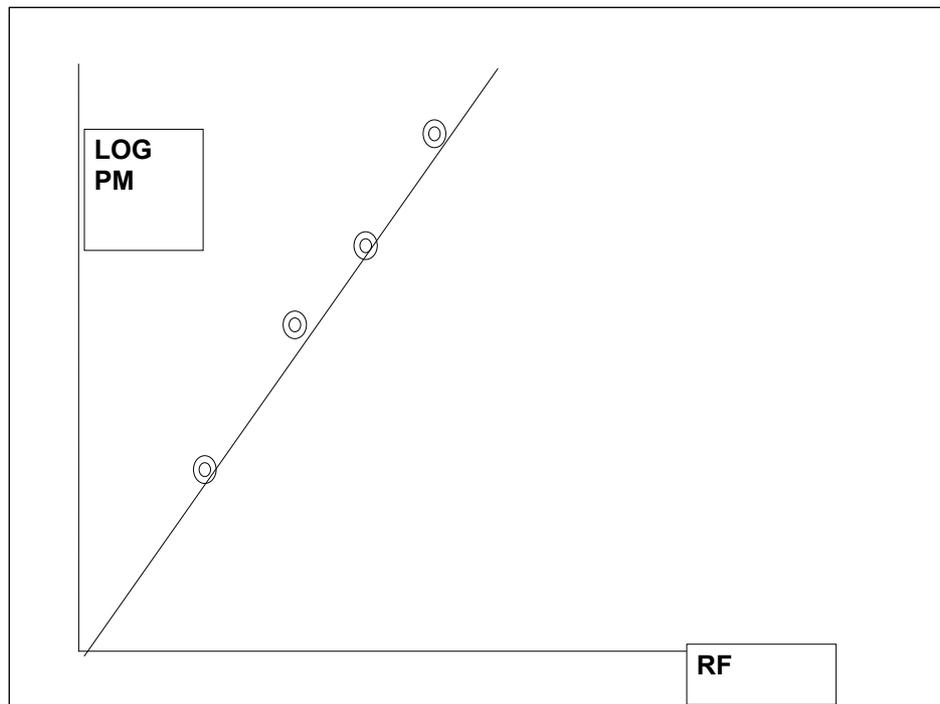
**Figura 27:** Cámara de WB

#### 3.5.8.3. Inmunodetección

Inicialmente las tiras fueron bloqueadas sumergiéndolas en PBS (pH 7,2; Bio-Merieux, Francia), Tween 20 (0,1%, Merck, España) y leche desnatada (5%, Asturiana, España), a temperatura ambiente durante 2 h. Una vez transcurrido este tiempo se lavó con PBS y se colocó cada tira en un recipiente de incubación. Se utilizaron tantas membranas como sueros a testar en cada ensayo, así como la correspondiente al estándar de peso molecular.

La muestra diluída 1/50 se incubó durante 1 hora, a temperatura ambiente, en agitación. Las tiras se lavaron 5 veces, se incubaron con anti-IgG, marcada con peroxidasa (Dako, Dinamarca) diluída 1:2000 en PBS. Seguidamente, se hizo otro ciclo de lavado igual al anterior. El sustrato utilizado fue TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kenentec Diagnostic, Dinamarca). Las membranas fueron examinadas por el mismo investigador, adjudicando, en función de la intensidad, valor de negativo, dudoso o positivo. Las bandas de intensidad dudosa se desestimaron para este estudio.

Para la interpretación de las bandas (figura 28) presentes se utilizó el principio de que las movilidades relativas de las proteínas (Rf: distancia recorrida por la proteína / frente coloreado de la fase móvil) son una función lineal de los logaritmos de sus pesos moleculares (Shapiro y cols., 1967). En base a esto, primero se analizó el comportamiento del patrón de los pesos moleculares utilizados en cada ensayo, lo que permitió elaborar una recta de calibrado o de mínimos cuadrados, para interpolar posteriormente los resultados obtenidos en cada suero. Esta recta se utilizó en cada grupo de desarrollo electroforético. Se calculó el Rf de cada banda obtenida, tras enfrenar el suero del enfermo, lo que permitió calcular el correspondiente peso molecular al extrapolar en la recta patrón. La aplicación anterior se realizó, de forma automática, utilizando la técnica clásica de regresión lineal con ajuste por mínimos cuadrados del polinomio de regresión.



**Figura 28:** Curva patrón de peso molecular

### **3.6. Método 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.

Antes de la evaluación de los resultados el 10% de las muestras fueron de nuevo analizadas obteniéndose el mismo resultado.

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 (Civel Software Corporation, Version 2.1, 1996). La prueba de Hosmer-Lemeshow se usó para ajustar el modelo.

### 3. Material y métodos

---

La comparación de las variables continuas entre enfermos y controles se realizó mediante la prueba T de Student.

Las variables discretas se analizaron mediante la prueba de Fischer bilateral exacta y  $\chi^2$ .

La relación entre variables se estableció mediante el test de correlación R de Pearson y la concordancia con el índice kappa.

## APÉNDICE

### **Solución de lisis**

Dodecil sulfato sódico 1% (Fluka, Suiza); Ditiotritol 0,2 mM (Fermentas, Lituania); Tris-HCl 50 mM pH 7,5 (Sigma, Alemania) y NaCl 0,5 M.

### **Solución caotrópica de diálisis**

Fosfato sódico 50 mM pH 7, Urea 8 M, NaCl 10 mM.

### **Gel de electroforesis**

"*Separating Gel*": 7,28 ml de Acrilamida-Bisacrilamida 29:1 al 40% (15%, Solugel, Pronadisa, España), 3,91 ml de agua destilada, 0,17 ml de SDS al 10% (0,1%, Sigma, España), 4,25 ml de "*separating buffer*" 4X (1X, Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, Fluka, Suiza), 17 µl. de N,N',N,N'-tetrametil etilendiamina (0,1% TEMED, Sigma, España) 127,5 µl de persulfato amónico al 10 % (0,08%, APS, Sigma, España).

"*Stacking Gel*" : 0,48 ml de Acrilamida-Bisacrilamida 29:1 al 40% (5%), 1,68 ml de agua, 0,03 ml de SDS al 10 % (0,1%), 0,72 ml de "*stacking buffer*" 4X (1X Tris-HCl 0,5 M pH 6,8) , 2,7 µl. de Tris-TEMED (0,1%) y 21 µl de APS al 10% (0,08%).

### **Tampón de electroforesis ("*Running Buffer* 10X")**

Base Tris 0,25M, glicina 1,93M (Fluka, Suiza), SDS 1%, agua destilada csp 1 l.

### **Tampón de transferencia ("*Transfer Buffer*")**

Base Tris 0,019M, glicina 0,15M, metanol 20% (Merck, España), SDS 0,02% y agua destilada csp 1 l.

#### **Tampón de la muestra ("SDS Cracking Buffer 4X")**

Tampón Tris-HCl 0,5 M 1 ml (0,0625 M, pH 6,8, 25°C), SDS 10% 1,6 ml (2%), glicerol 100% 0,8 ml (10%),  $\beta$ -mercaptoetanol 100% 0,4 ml (0,71 M, Sigma, España), Azul de bromofenol 0,5 % w/v 0,2 ml (0,0025%) (Panreac, España), agua destilada 4 ml en un volumen final de 8 ml.

#### **PBS ("Buffered Saline 1x")**

NaCl 8 g, KCl 0,2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g, agua destilada csp 1 l, pH 7,4/ HCl

#### **Tampón de lavado ("Wash Buffer")**

PBS 1x, Tween-20 0,1 %.

#### **Tampón de bloqueo ("Blocking Buffer").**

Tampón de lavado 100 ml y leche en polvo desnatada 5g.

#### **Inmunodetección**

Anti-inmunoglobulina G y A humanas conjugadas con peroxidasa (Dako, Dinamarca) 1/2000 en tampón de lavado.

Sustrato 4460-A TMB blotting plus 3',3,5',5-tetrametilbenzidina y peróxido de hidrógeno ( KEN EN TEC diagnostic, Dinamarca).

#### **Soluciones de Revelado**

"Coomassie" (Tampón de tñido): Coomassie blue brilliant R-250 2,5 g ( Bio-rad, EEUU), metanol 50%, ácido acético glacial 9% y agua destilada csp 1 l.

*Chlamydophila pneumoniae*

---

"Destain" (Tampón de decoloración): ácido acético glacial 10% y agua destilada csp  
1 l.

"Rojo Ponceau" (Tampón de visualización): S. solution (0,1%, Sigma, España) y  
ácido acético glacial 5% v/v.

**ANEXO**  
**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

El servicio de Angiología y Cirugía Vascular del Hospital Clínico Universitario esta llevando a cabo un estudio clínico en pacientes sometidos a cirugía arterial/venosa, como en su caso.

El estudio consiste en obtener una serie de muestras biológicas antes y durante la intervención quirúrgica. No se modifica la intervención quirúrgica por la obtención de estas muestras, y no se deriva riesgo extra para usted.

Se obtendrán muestras de sangre antes de operarse, y durante la intervención se analizará un trozo de arteria enferma/sana de arteriosclerosis.

**ESTUDIO CLÍNICO: "Detección de *C. pneumoniae* en la arteriosclerosis".**

Yo,.....(nombre y apellidos)  
he leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con.....(nombre investigador).

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º Cuando quiera.

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Fecha:

Firma del participante



## **4. RESULTADOS**



### 4.1. Características clínicas de los casos y controles

A partir de 118 sujetos se obtuvieron muestras adecuadas para el análisis, sin pérdida accidental o destrucción de la misma, salvo en las muestras de suero señaladas anteriormente, por agotamiento, para la realización del Western-blot “in house”. No fue necesario excluir ninguna muestra del estudio debido a un resultado dudoso. En la tabla 16 se reflejan las características de la población en relación a la edad, sexo, consumo de tabaco, hiperlipidemia, hipertensión arterial, diabetes mellitus y obesidad. La mayor parte de la población fue de edad superior a los 59 años.

No hubo diferencias significativas en la distribución de edad (por encima de los 59 años) correspondiente al tercer cuartil, sexo, obesidad o exposición al tabaco entre los dos grupos. La edad media de los casos fue 6 años superior a la de los controles. La diabetes, hipertensión e hiperlipidemia fueron más frecuentes en los casos.

	<b>CASOS n= 68</b>	<b>CONTROL n=50</b>	<b>P</b>
<i>Edad (años)</i>	65,9 ± 8.5	60,1 ± 3,5	< 0,0001*
<i>&gt; 59 años</i>	84,4%	76%	0,2†
<i>Varones</i>	83,8%	80%	0,6†
<i>Fumadores (antes o ahora)</i>	75%	60%	0,08†
<i>Diabetes mellitus</i>	27,9%	4%	<0,0001‡
<i>Hipertensión</i>	58,8%	8%	<0,0001†
<i>Hipercolesterolemia</i>	35,3%	4%	<0,0001‡
<i>Hipertrigliceridemia</i>	23,5%	8%	0,007†
<i>Obesidad</i>	26,6%	28%	0,6†

\*: test de Student; †: test  $\chi^2$  ; ‡: test de Fischer

**Tabla 16:** Características clínicas de los casos y controles

Un problema en este trabajo fue diferenciar la participación de la infección, del resto de los parámetros descritos que intervendrían en la génesis de la arteriosclerosis (AT). Para controlarlos se realizó un estudio multivariante que analizó el hecho de pertenecer al grupo de casos o de controles, en ambos grupos, y teniendo en cuenta el tamaño de la muestra, se aplicó la prueba de regresión logística exacta. La tabla 17 indica los resultados de la regresión logística.

El único factor identificado, clara y fuertemente, como significativo, fue el hecho de pertenecer al grupo de casos o controles ( $OR=38,1$ ; IC 95%: 9,2-157,7). El alto valor de la  $OR$  estimada en este caso pudo ser explicada por una sobreestimación debida al tamaño pequeño de la muestra e intensa relación entre los factores de riesgo. El resto de las variables no alcanzaron significación.

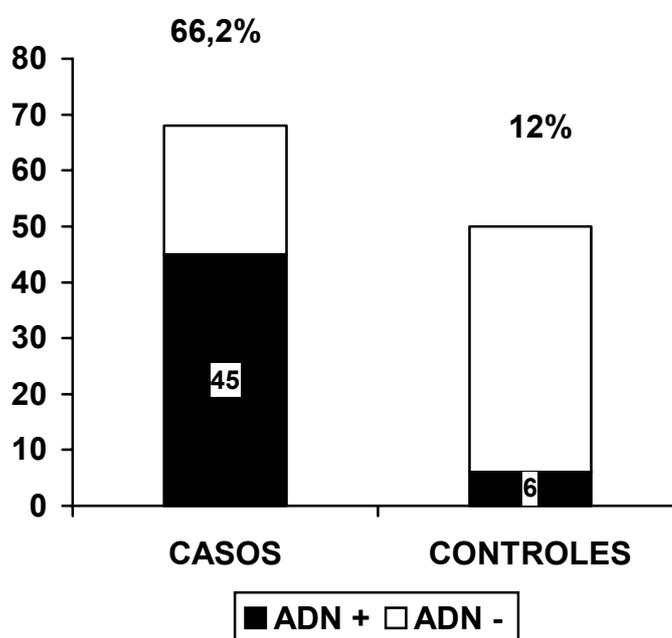
La bondad del modelo fue ajustada usando la prueba de Hosmer-Lemeshow, que fue no significativa ( $X^2 =12,7$ ;  $p=0,1$ ; 8 g.l.). Además, cuando se analizaron los valores extremos y de peso no se detectó su presencia. Por todo lo anterior, se comprobó que ambos grupos, casos y controles, están ajustados para las distintas variables y la única que determina diferencia es la presencia o ausencia de enfermedad arterial periférica, por lo tanto el hecho de participar en el grupo de casos o controles.

<b>VARIABLES</b>	<b>SIGNIFICACIÓN</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>
<i>Casos/controles</i>	<0,0001	38	9,2-157,7
<i>Masculino</i>	0,7	1,3	0,3-5,2
<i>&gt; 59 años</i>	0,6	0,7	0,2-2,1
<i>Fumadores</i>	0,7	0,8	0,2-2,7
<i>Hipercolesterolemia</i>	0,9	0,9	0,3-2,9
<i>Hipergliceridemia</i>	0,7	0,8	0,2-2,6
<i>Hipertension</i>	0,09	0,4	0,1-1,1
<i>Diabetes mellitus</i>	0,9	1,1	0,3-3,7
<i>Obesidad</i>	0,4	1,6	0,6-4,5

**Tabla 17:** Análisis multivariante

## **4.2. Detección del ADN de *C. pneumoniae* en diferentes muestras**

El ADN de Cp se detectó en el 66,2% de los casos (45 muestras) y 12% de los controles (6 muestras) ( $p < 0,0001$ ; OR: 15,3; IC 95%:5,7-41,4) (figura 29).



**Figura 29:** Resultados de la detección de ADN en las biopsias estudiadas

## **4.3. Seroprevalencia de la infección**

En la tabla 18 se reflejan los resultados obtenidos en las pruebas de ELISA, para detectar IgG o IgA frente a los CE y lipopolisacárido (LPS), y MIF, para detectar IgG anti-CE, así como su significación estadística.

Destacó en los casos un mayor número de muestras con IgG anti-CE (mediante ELISA y MIF) ( $p < 0,0001$ ;  $X^2$ ), con una OR de 14,6 para el primero y de 10,3 para

## *Chlamydophila pneumoniae*

el segundo. No ocurrió así para la IgG anti-LPS y la IgA.

PRUEBA	CASOS	CONTROL	P	OR	IC 95%
<b><i>ELISA IgG</i></b>	<b>73,5%</b>	<b>16%</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>14,6</b>	<b>5,7-36,9</b>
<b><i>ELISA IgA</i></b>	<b>8,8%</b>	<b>16%</b>	<b>0,2</b>	<b>0,5</b>	<b>0,1-1,5</b>
<b><i>ELISA IgG anti-LPS</i></b>	<b>20,6%</b>	<b>24%</b>	<b>0,6</b>	<b>0,8</b>	<b>0,4-1,9</b>
<b><i>ELISA IgA anti-LPS</i></b>	<b>22,1%</b>	<b>32%</b>	<b>0,2</b>	<b>0,6</b>	<b>0,2-1,3</b>
<b><i>MIF IgG</i></b>	<b>76,5%</b>	<b>24%</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>10,3</b>	<b>4,4-24,3</b>

**Tabla 18:** Seroprevalencia de anticuerpos frente a *C. pneumoniae*

En la tabla 19 se relacionan los resultados anteriores con la presencia de ADN de la bacteria en las biopsias. Nuestro estudio muestra que no hubo una gran relación entre la presencia de ADN y anticuerpos. La comparación entre los resultados de las pruebas para detectar la IgG anti-CE, mediante MIF y ELISA, y el ADN de la bacteria puso de manifiesto un grado de relación bajo y estadísticamente significativo. La IgA no se relacionó con la detección genética.

	X <sup>2</sup>	PEARSON
<b><i>MIF IgG-CE</i></b>	<b>0,001</b>	<b>0,3</b>
<b><i>ELISA IgG-CE</i></b>	<b>0,0001</b>	<b>0,4</b>
<b><i>ELISA IgA-CE</i></b>	<b>0,1</b>	<b>-0,2</b>
<b><i>ELISA IgG-LPS</i></b>	<b>0,3</b>	<b>-0,1</b>
<b><i>ELISA IgA-LPS</i></b>	<b>0,5</b>	<b>-0,1</b>

**Tabla 19:** Grado de correlación de las pruebas serológicas y la detección de ADN

En la figura 30 se refleja el aspecto de las bandas observadas en el Western-blot comercial. El patrón individual de los sueros fue reproducible en las repeticiones de los ensayos. La seroprevalencia y el número de proteínas reconocidas en esta prueba fue elevada y no hubo ningún patrón específico dentro del grupo de casos o controles.



**Figura 30:** Aspecto de las bandas obtenidas mediante Western-blot comercial

Cuando las tiras fueron leídas mediante el escaner y los resultados interpretados en el programa (figuras 31 a 34), se obtuvieron diferentes valores para la IgG, que oscilaron desde un resultado negativo, hasta tiras que mostraron gran número de bandas. Igual ocurrió para la IgA. Los resultados de los Western-blot de IgG e IgA para el mismo suero fueron parecidos. No hubo muestras que mostraran anticuerpos sólo frente al LPS.

*Chlamydomphila pneumoniae*

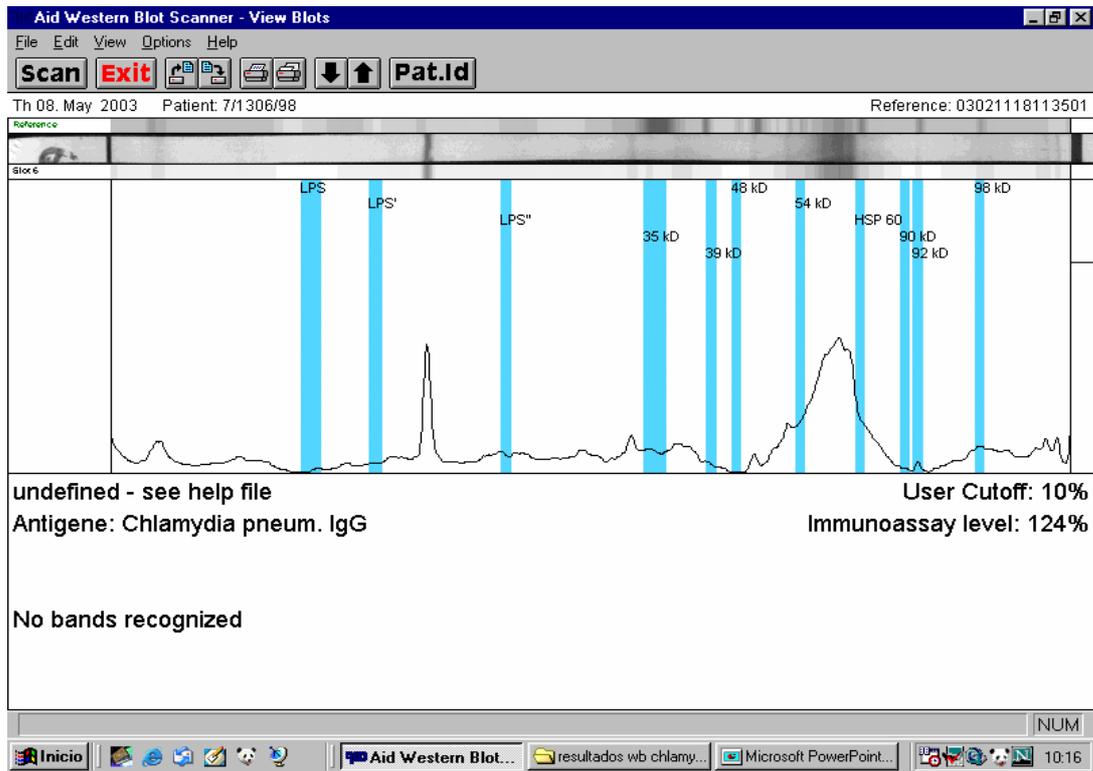


Figura 31: Resultado negativo de Western-blot comercial para IgG

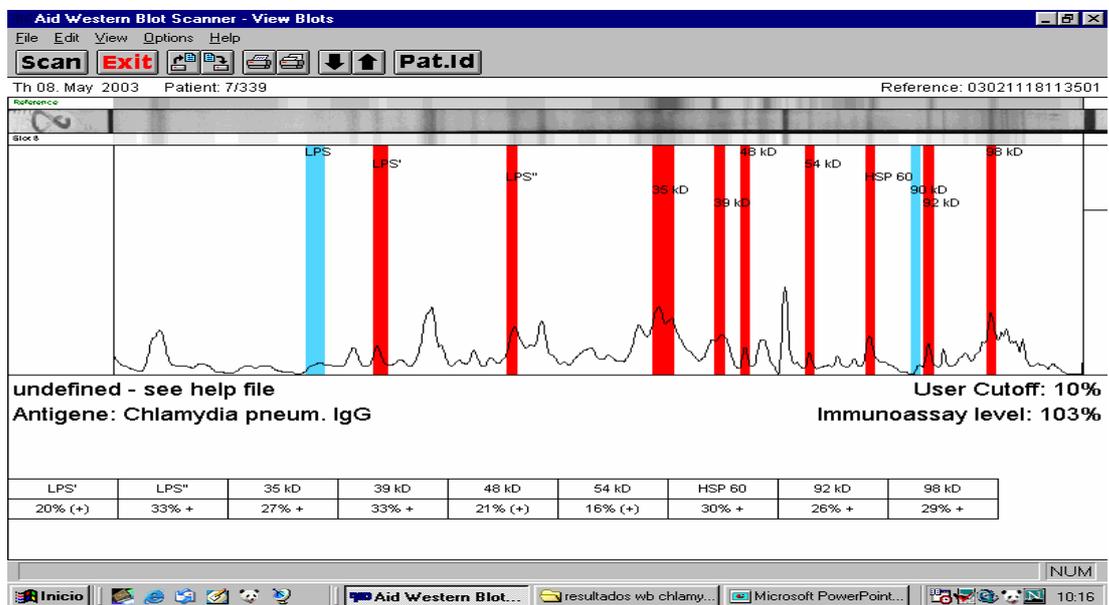
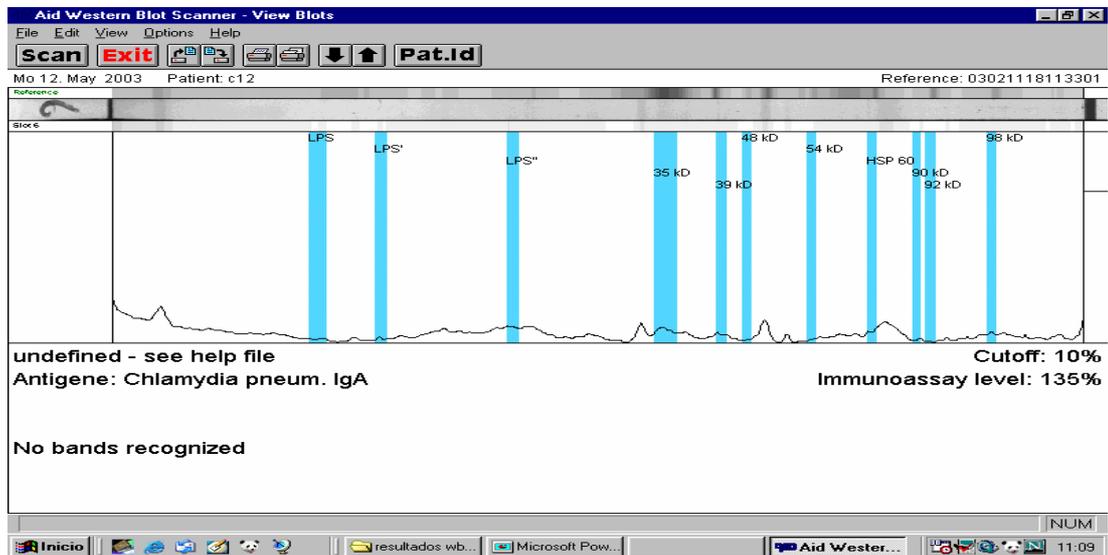
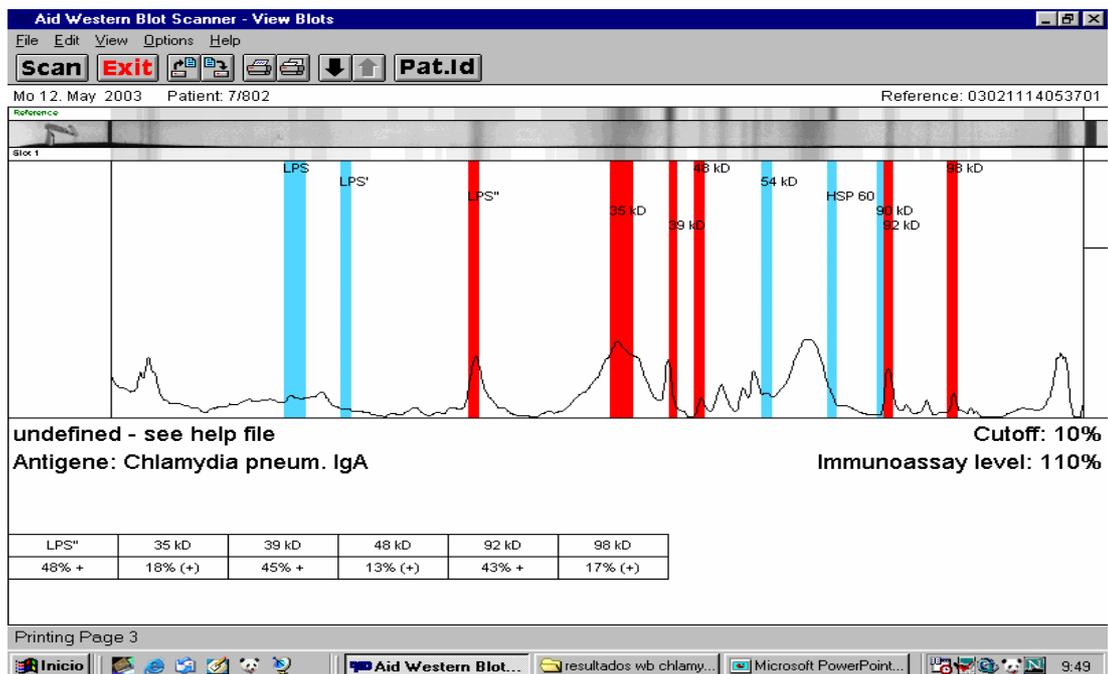


Figura 32: Resultado positivo de Western-blot comercial para IgG

## 4. Resultados



**Figura 33:** Resultado negativo de Western-blot comercial para IgA



**Figura 34:** Resultado positivo de Western-blot comercial para IgA

## *Chlamydophila pneumoniae*

---

En la tabla 20 se reflejan los resultados, agrupados, obtenidos en la investigación de los anticuerpos mediante Western-blot comercial de IgG, en los casos y controles, y su significación estadística. Destacó la presencia significativa de anticuerpos frente a las proteínas de 39 kDa (MOMP), 54 kDa y el LPS.

<b>PRUEBA</b>	<b>CASOS</b>	<b>CONTROL</b>	<b>P</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>
<i>LPS</i>	22,1%	24%	0,8	0,9	0,4-2,1
<i>LPS'</i>	<b>16,2%</b>	<b>4%</b>	<b>0,04</b>	<b>4,6</b>	<b>0,9-21,9</b>
<i>LPS''</i>	23,5%	14%	0,2	1,9	0,7-5
<i>35 kDa</i>	89,7%	92%	0,7	0,7	0,2-2,7
<i>39 kDa</i>	<b>25%</b>	<b>4%</b>	<b>0,002</b>	<b>8</b>	<b>1,7-36,5</b>
<i>48 kDa</i>	38,2%	36%	0,8	1,1	0,5-2,3
<i>54 kDa</i>	<b>30,9%</b>	<b>8%</b>	<b>0,003</b>	<b>5,1</b>	<b>1,6-16,1</b>
<i>Hsp 60 kDa</i>	52,9%	40%	0,2	1,7	0,8-3,5
<i>90 kDa</i>	8,8%	4%	0,3	2,3	0,4-12
<i>92 kDa</i>	48,5%	48%	0,9	1	0,5-2,1
<i>98 kDa</i>	29,4%	20%	0,2	1,7	0,7-3,9

**Tabla 20:** Resultados obtenidos mediante Western- blot comercial de IgG

## 4. Resultados

En la tabla 21 se reflejan los resultados, agrupados, obtenidos en la investigación de los anticuerpos mediante Western-blot comercial de IgA, en los casos y controles, y su significación estadística. Destacó la presencia significativa de los anticuerpos frente a las proteínas Hsp 60 kDa y de 92 kDa. No se detectaron anticuerpos frente a la proteína de 90 kDa.

<b>PRUEBA</b>	<b>CASOS</b>	<b>CONTROL</b>	<b>P</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>
<i>LPS</i>	4,4%	4%	0,9	1,1	0,2-6,9
<i>LPS'</i>	1,5%	0%	0,4	0,9	0,9-1
<i>LPS''</i>	8,8%	0%	0,03	0,9	0,8-0,9
<i>35 kDa</i>	39,7%	24%	0,07	2,1	0,9-4,7
<i>39 kDa</i>	11,8%	12%	0,9	0,9	0,3-3
<i>48 kDa</i>	11,8%	8%	0,5	1,5	0,4-5,5
<i>54 kDa</i>	11,8%	16%	0,5	0,7	0,2-2,1
<i>Hsp 60 kDa</i>	<b>29,4%</b>	<b>12%</b>	<b>0,02</b>	<b>3</b>	<b>1,1-8,3</b>
<i>90 kDa</i>	0%	0%	-	-	-
<i>92 kDa</i>	<b>16,2%</b>	<b>4%</b>	<b>0,04</b>	<b>4,6</b>	<b>1-21,9</b>
<i>98 kDa</i>	14,7%	8%	0,3	2	0,6-6,7

**Tabla 21:** Resultados obtenidos mediante Western- blot de IgA

## *Chlamydomypha pneumoniae*

En la tabla 22 se indica el grado de relación que existe entre los anticuerpos detectados mediante las pruebas serológicas de MIF, ELISA y Western-blot. La prueba de MIF IgG se relacionó con la IgG frente a las proteínas de 39 y 54 kDa; el ELISA IgG anti-CE se relacionó con las proteínas de 35 y 39 kDa.

<i>WB</i>	<b>MIF IgG</b>			<b>ELISA IgG</b>			<b>ELISA IgA</b>		
	$\chi^2$	Pearson	Kappa	$\chi^2$	Pearson	Kappa	$\chi^2$	Pearson	Kappa
<b>35 Kda</b>	0,5	-0,1	-0,04	<b>0,02</b>	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>	0,7	-0,3	-0,29
<b>39 kDa</b>	<b>0,02</b>	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>	<b>0,02</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	0,76	0,03	0,02
<b>48 kDa</b>	0,7	0,04	0,04	0,9	0,01	0,01	0,68	-0,04	-0,03
<b>54 kDa</b>	<b>0,04</b>	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>	0,9	0,1	0,1	0,45	-0,07	-0,07
<b>Hsp 60 kDa</b>	0,6	-0,5	-0,5	0,2	0,1	0,1	0,95	-0,005	-0,005
<b>90 kDa</b>	0,8	-0,2	-0,01	0,5	-0,06	-0,03	-	-	-
<b>92 kDa</b>	0,7	0,4	0,4	0,5	0,06	0,07	0,62	-0,04	-0,04
<b>98 kDa</b>	0,5	0,7	0,6	0,6	0,05	0,04	0,23	0,1	0,1
<b>LPS</b>				0,6	0,05	0,05	0,17	-0,1	-0,1
<b>LPS'</b>				0,5	-0,06	-0,05	0,54	-0,05	-0,02
<b>LPS''</b>				0,3	0,1	0,09	0,58	-0,05	-0,05

**Tabla 22:** Relación entre las pruebas serológicas de ELISA, MIF y Western-blot comercial

La relación entre la presencia de ADN en las biopsias y la IgG detectada en el Western-blot comercial se refleja en la tabla 23. Quiero destacar que se encontró, en el grupo de casos, una presencia significativa de IgG anti-39 kDa que se relacionaron con las pruebas de MIF y ELISA, y la presencia de ADN. Así como una presencia significativa de IgA anti-LPS y anti-92 kDa en el Western-blot, que se relacionaron con la presencia de ADN (tabla 24).

		$\chi^2$	PEARSON
<b>Western-blot comercial IgG</b>	<i>LPS</i>	0,7	-0,03
	<i>LPS'</i>	0,2	0,1
	<i>LPS''</i>	0,4	0,1
	<i>35 kDa</i>	0,2	-0,1
	<i>39 kDa</i>	<b>0,01</b>	<b>0,2</b>
	<i>48 kDa</i>	<b>0,03</b>	<b>0,2</b>
	<i>54 kDa</i>	<b>0,0001</b>	<b>0,3</b>
	<i>Hsp 60 kDa</i>	0,8	-0,02
	<i>90 kDa</i>	0,7	-0,03
	<i>92 kDa</i>	0,9	-0,004
	<i>98 kDa</i>	0,4	0,1

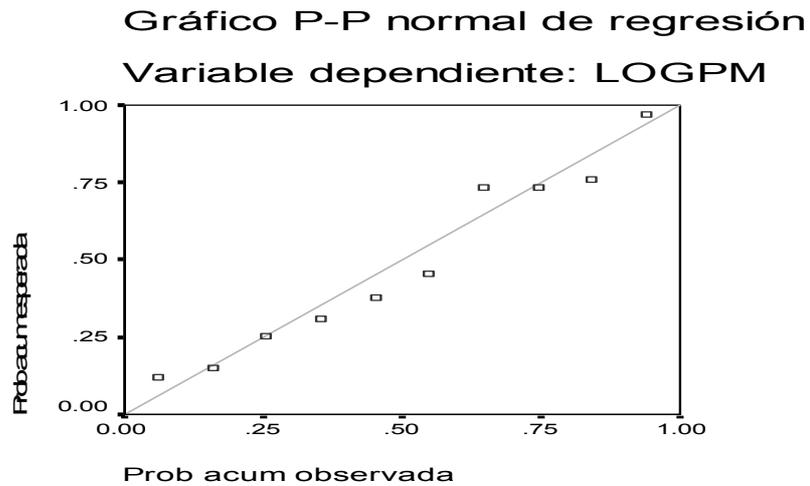
**Tabla 23:** Relación entre resultados del Western-blot anti- IgG y la presencia de ADN

		$\chi^2$	PEARSON
<b>Western-blot comercial IgA</b>	<i>LPS</i>	0,8	-0,02
	<i>LPS'</i>	0,4	-0,1
	<i>LPS''</i>	<b>0,04</b>	<b>0,2</b>
	<i>35 kDa</i>	0,9	-0,01
	<i>39 kDa</i>	0,5	-0,6
	<i>48 kDa</i>	0,7	0,04
	<i>54 kDa</i>	0,6	-0,1
	<i>Hsp 60 kDa</i>	0,1	0,1
	<i>90 kDa</i>	-	-
	<i>92 kDa</i>	<b>0,01</b>	<b>0,2</b>
	<i>98 kDa</i>	0,9	-0,01

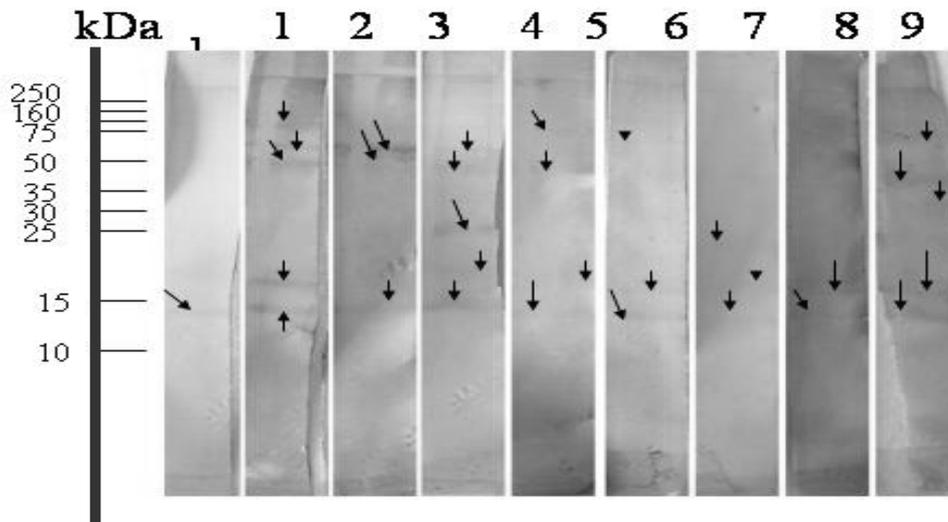
**Tabla 24:** Relación entre resultados del Western-blot anti- IgA y la presencia de ADN

Antes de pasar a exponer los resultados obtenidos en el Western-blot “in house” quiero recordar que, debido al agotamiento de las muestras, hubo 12 pérdidas entre los casos y 2 entre los controles. En las figuras 35a a 44a se reflejan las rectas

patrón que se han generado en la evaluación de los desplazamientos de los marcadores de peso molecular en el Western-blot correspondiente, y en las figuras 35b a 44b se reflejan las bandas detectadas para la IgG e IgA en Western-blot. Se obtuvieron un total de 57 bandas proteicas diferentes, de IgG y /o IgA. Los patrones de los sueros fueron semejantes cuando se repitieron los ensayos.



**Figura 35a:** Recta patrón de Western-blot de IgG



**Figura 35b:** Bandas proteicas detectadas en el Western-blot de IgG

Gráfico P-P normal de regresión  
Variable dependiente: LOGPM

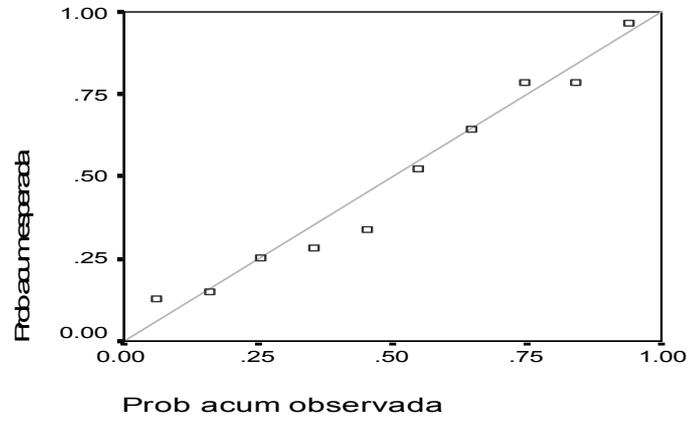


Figura 36a: Recta patrón de Western-blot de IgA

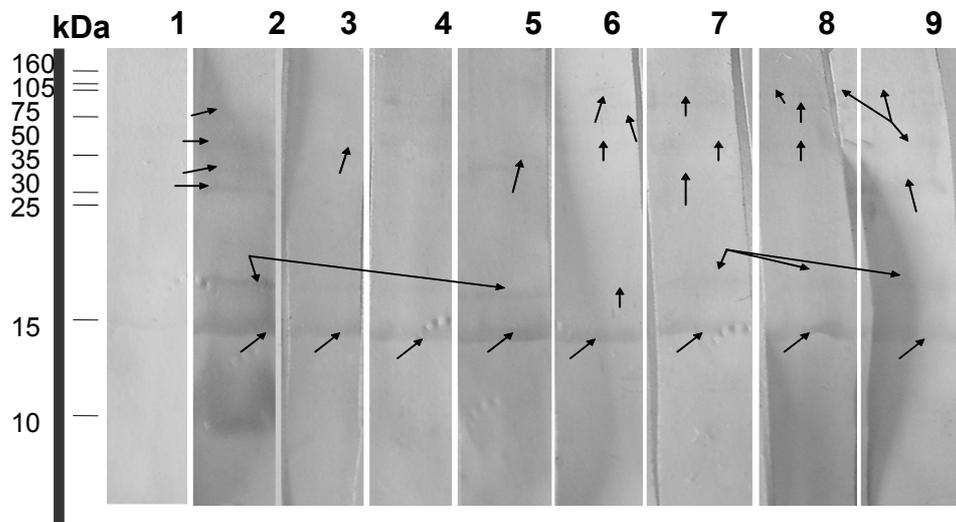


Figura 36b: Bandas proteicas detectadas en el Western-blot de IgA

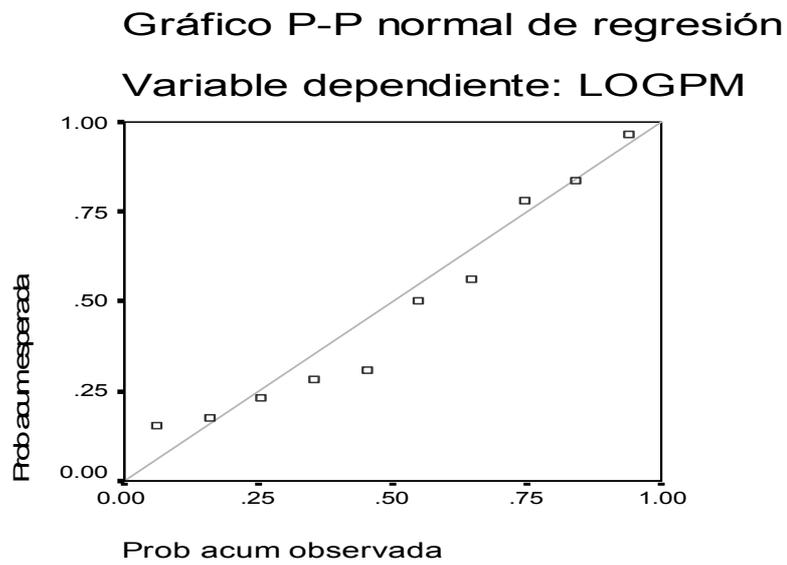


Figura 37a: Recta patrón de Western-blot de IgG

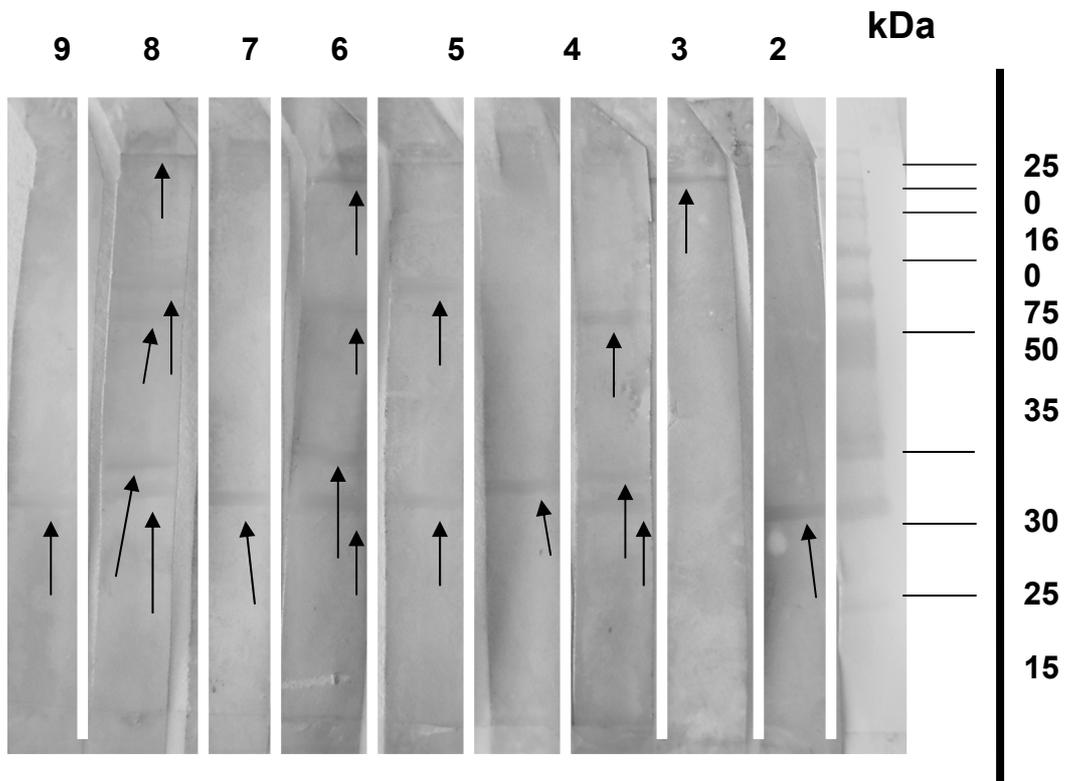


Figura 37b: Bandas proteicas detectadas en el Western-blot de IgG

Gráfico P-P normal de regresión

Variable dependiente: LOGPM

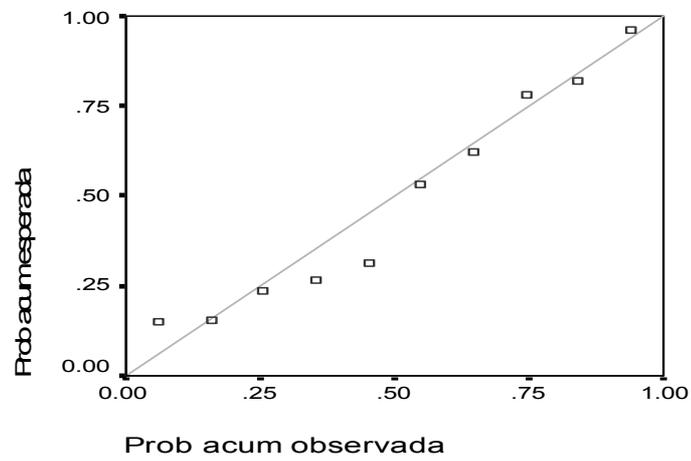


Figura 38a: Recta patrón de Western-blot de IgA

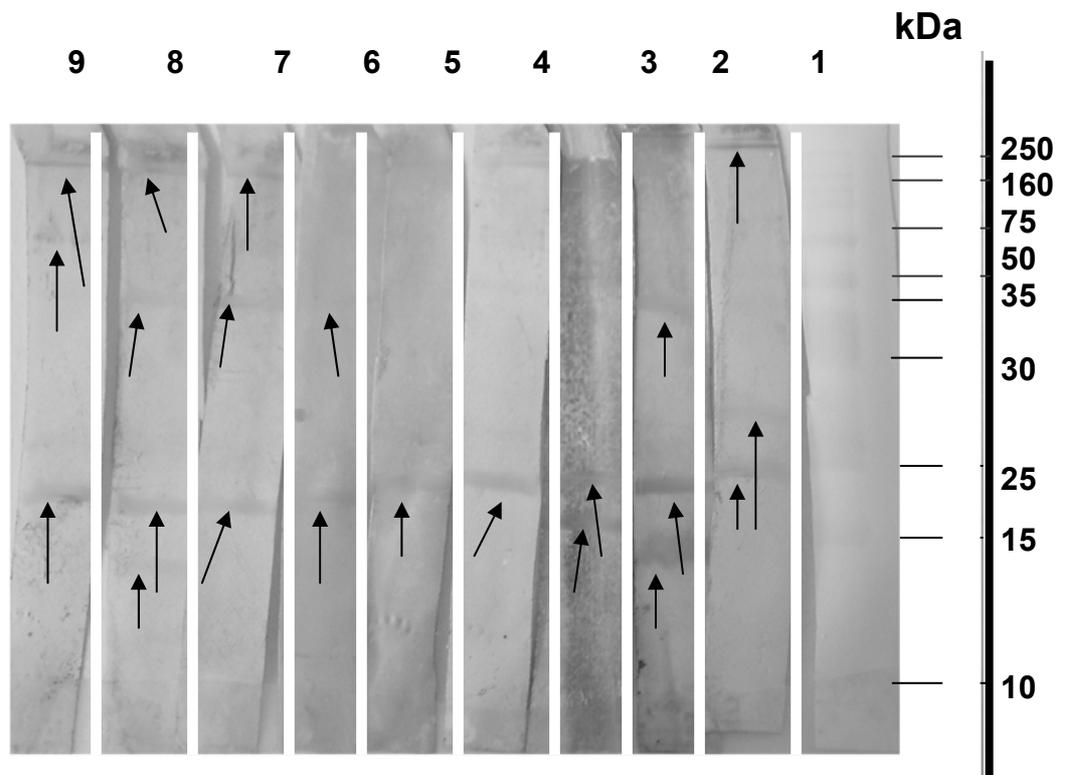
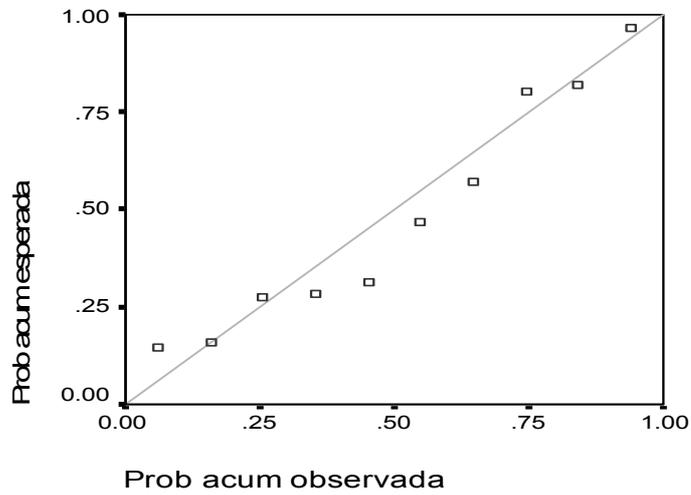


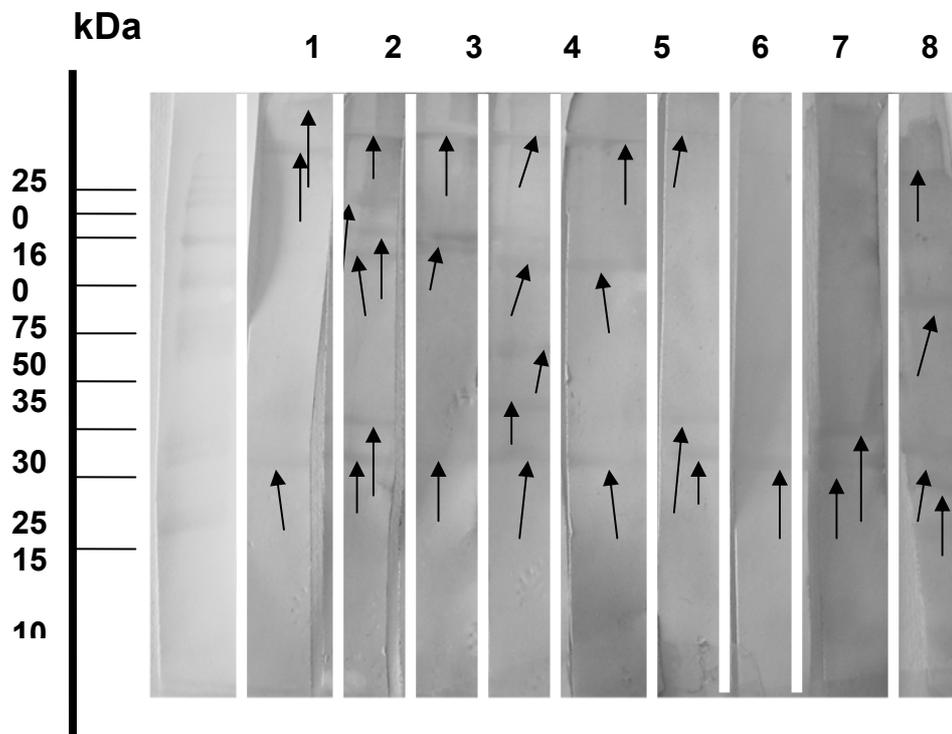
Figura 38b: Bandas proteicas detectadas en el Western-blot de IgA

Gráfico P-P normal de regresión

Variable dependiente: LOGPM



**Figura 39a** Recta patrón de Western-blot de IgG



**Figura 39b:** Bandas proteicas detectadas en el Western-blot de IgG

Gráfico P-P normal de regresión

Variable dependiente: LOGPM

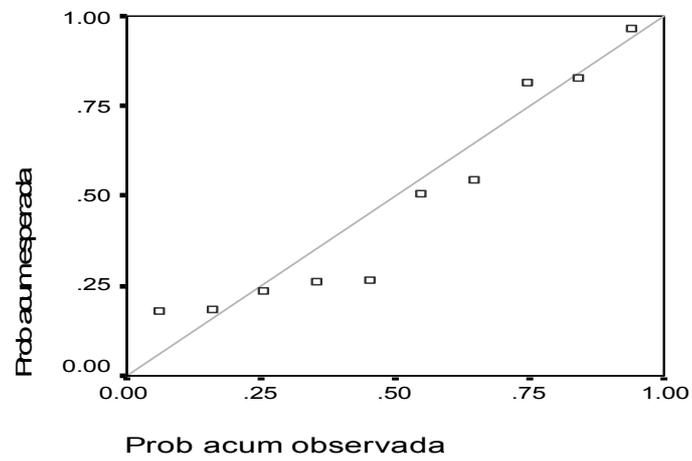


Figura 40a: Recta patrón de Western-blot de IgA

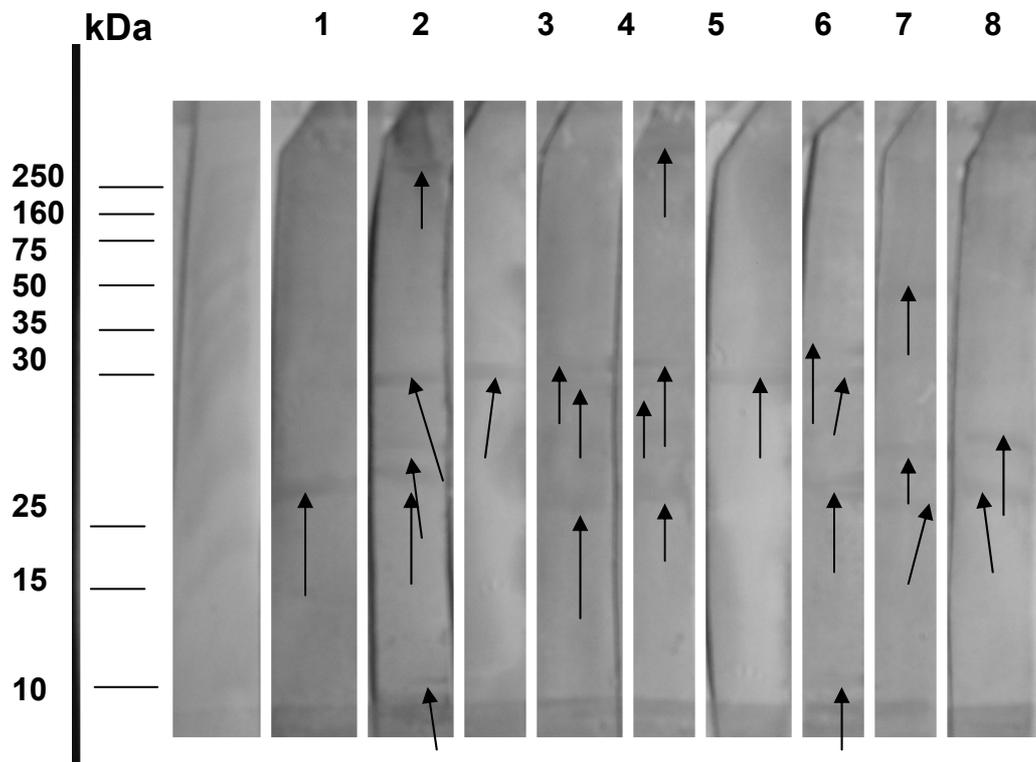


Figura 40b: Bandas proteicas detectadas en el Western-blot de IgA

Gráfico P-P normal de regresión

Variable dependiente: LOGPM

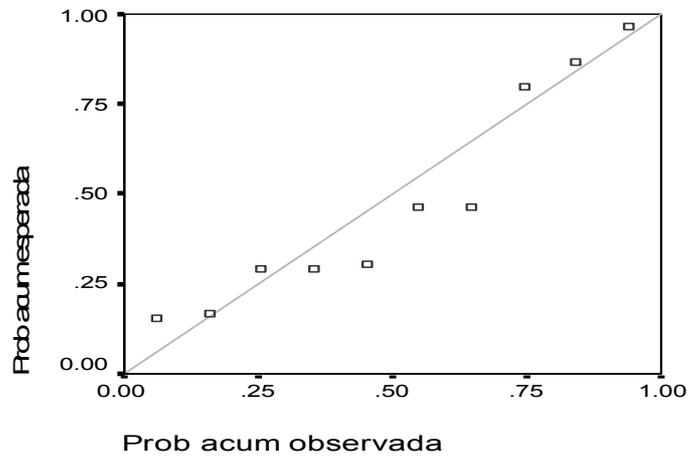


Figura 41a: Recta patrón de Western-blot de IgG

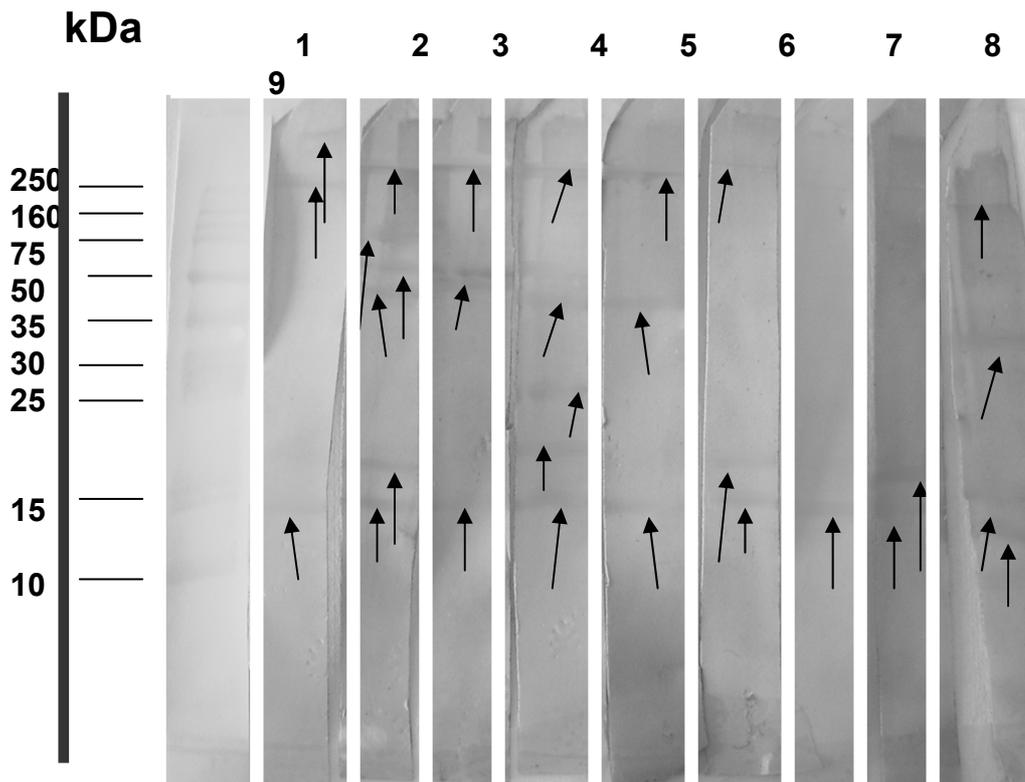
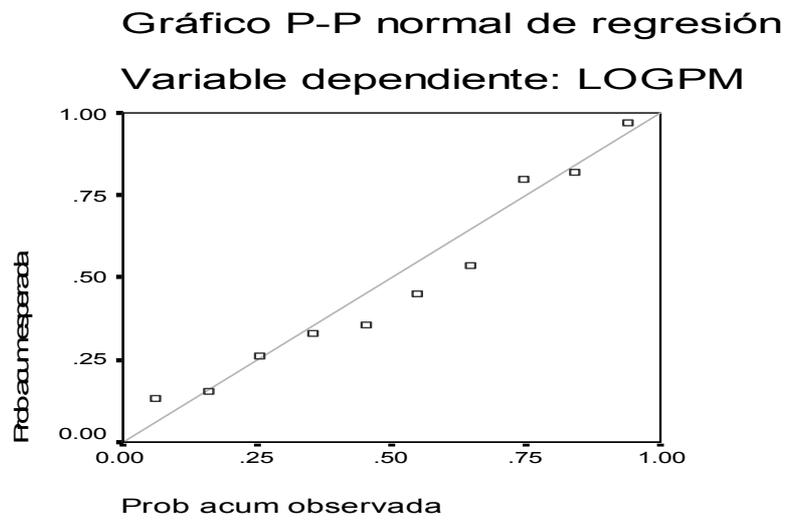
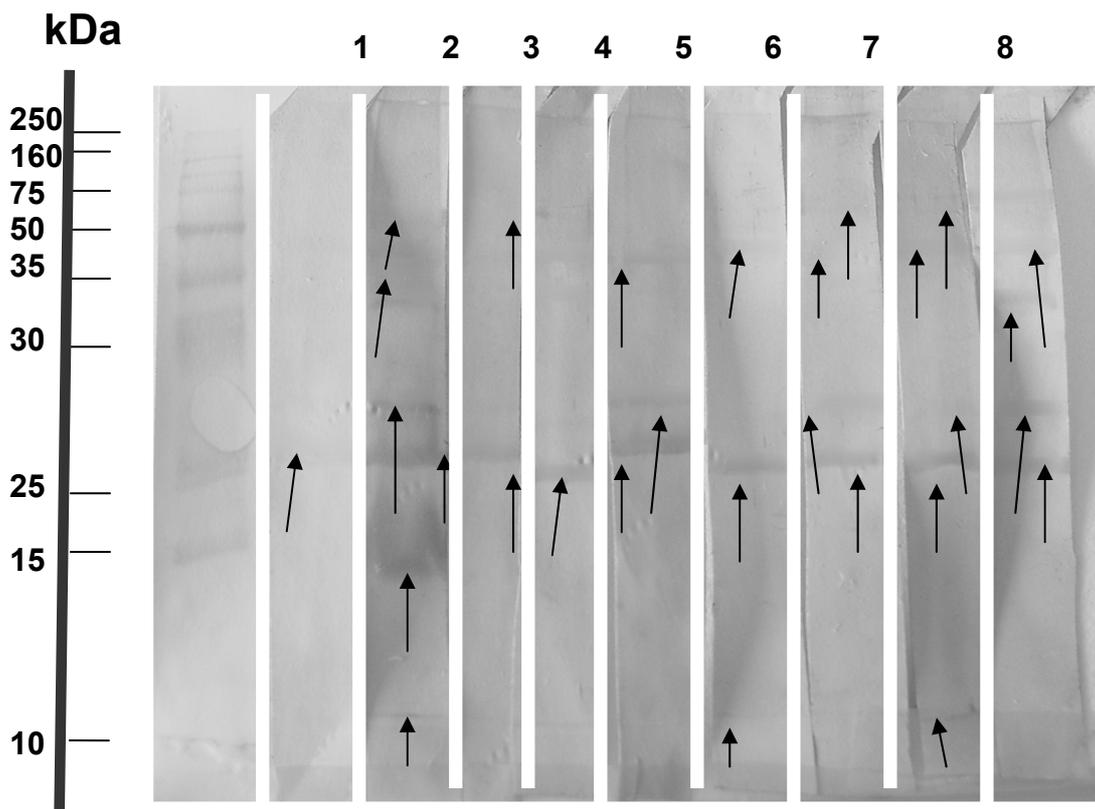


Figura 41b: Bandas proteicas detectadas en el Western-blot de IgG



**Figura 42a:** Recta patrón de Western-blot de IgA



**Figura 42b:** Bandas proteicas detectadas en el Western-blot de IgA

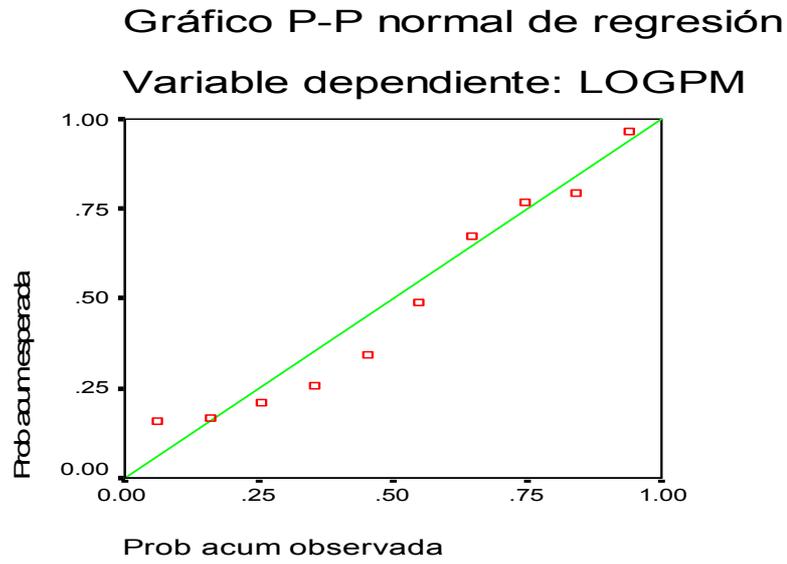


Figura 43a: Recta patrón de Western-blot de IgG

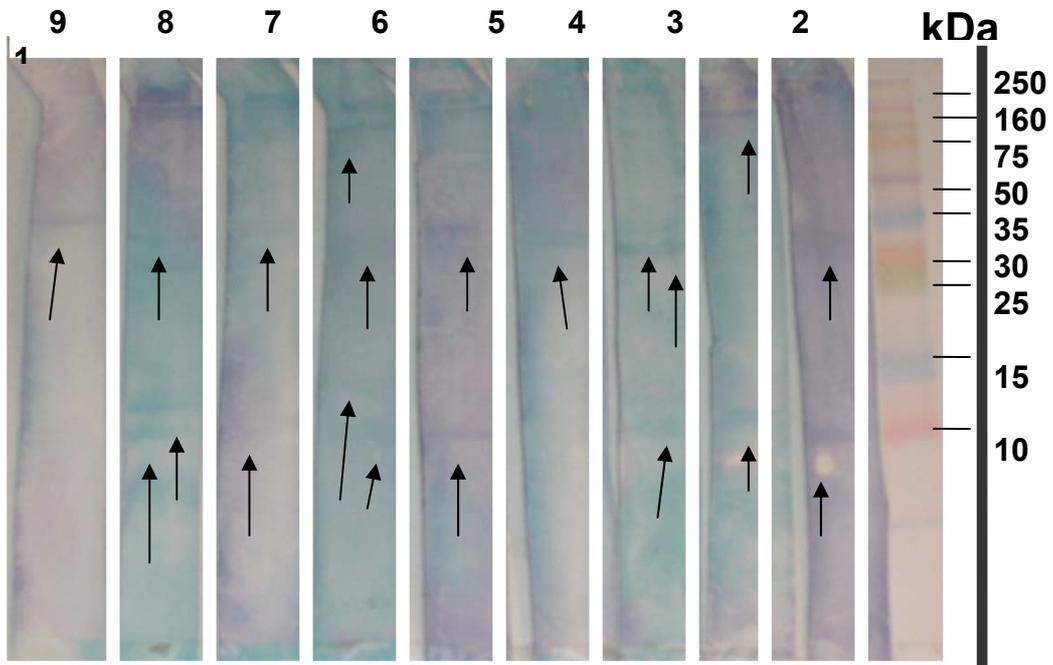
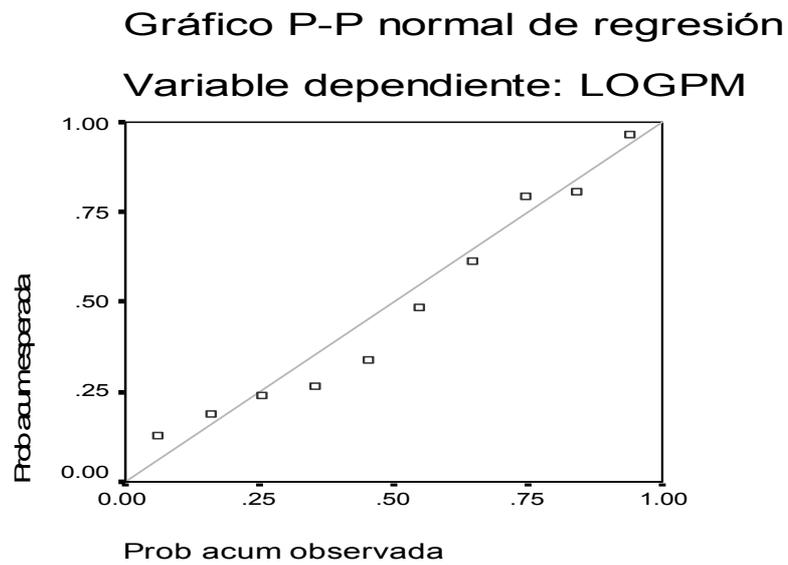
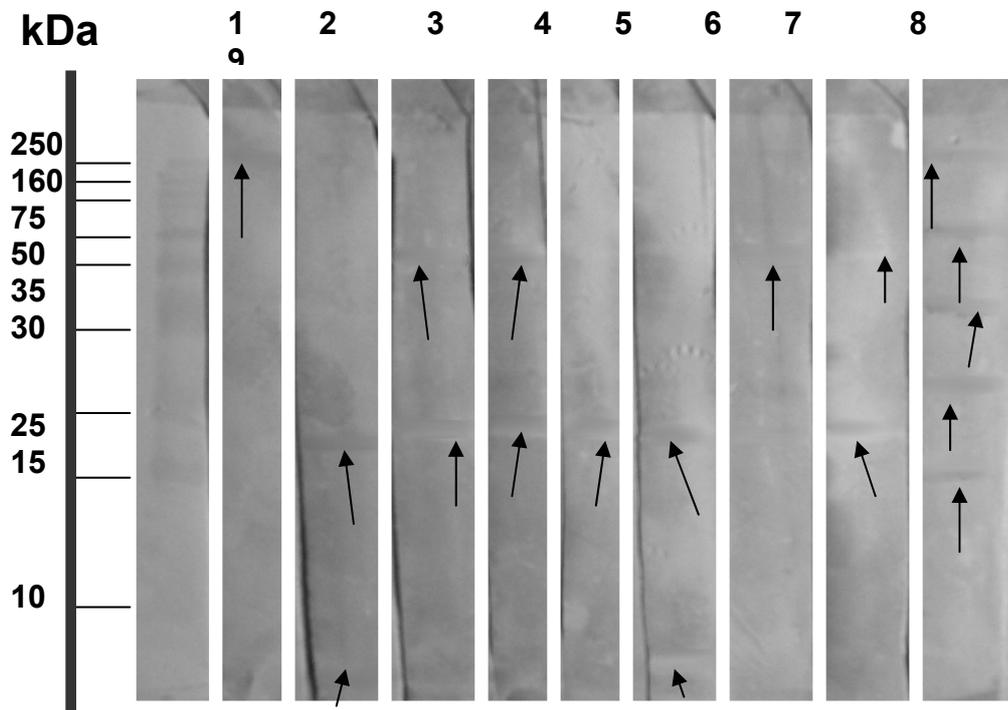


Figura 43b: Bandas proteicas detectadas en el Western-blot de IgG



**Figura 44a:** Recta patrón de Western-blot de IgA



**Figura 44b:** Bandas proteicas detectadas en el Western-blot de IgA

Todos los sueros mostraron la presencia de alguna banda de IgG y/o IgA, aunque el número presente en cada suero fue reducido. Tampoco se apreció un patrón específico dentro del grupo de casos o controles. Los resultados de las bandas de IgG e IgA, en el mismo suero, no fueron semejantes.

En las tablas 25, 26 y 27 se indican, para cada banda, la frecuencia de presentación, en casos y controles, con su significación estadística, y la *OR* calculada, cuando hubo diferencias. Además, se muestra, si, para cada banda, la presencia asociada de ADN fue significativa. Así destacó el desarrollo significativo de las bandas de: 128,8 y 9,2 kDa para la IgG, en los casos, que se asoció con la coexistencia de ADN; las bandas de IgG de 70,8; 58,9; 47,9; 47,5; 18,4; 12,1; 10,6; 8,1 y 7,6 kDa, en los casos; y la existencia de ADN cuando se observaron las bandas de IgG de 54,6 y 1,1 kDa, y de IgA, con las bandas de 79,4; 50,1 y 18,4 kDa. En resumen, se obtuvo en los casos una presencia significativa de bandas de IgG; y el ADN de la bacteria estuvo presente, de forma significativa, cuando estuvieron presentes algunas bandas de IgG e IgA. En concreto, la presencia de las bandas de IgG de 128,8 y 9,2 kDa se asoció, de forma significativa, al ADN de la bacteria y la existencia de EAPO.

kDa	POSITIVO (%)			
	IgG		IgA	
	Casos/Controles/p/OR	DNA p/Pearson/Kappa	Casos/Controles/p	DNA p/Pearson/Kappa
<b>158,5</b>	3,6 / 0 / 0,2	0,2	0 / 0	
<b>147,2</b>	5,4 / 0 / 0,1	0,6	0 / 0	
<b>138</b>	7,1 / 0 / 0,06	0,2	0 / 0	
<b>136,4</b>	3,6 / 0 / 0,2	0,3	0 / 0	
<b>128,8</b>	<b>17,9 / 0 / 0,001 / 2 (1,7-2,5)</b>	<b>0,01 / 0,2 / 0,2</b>	0 / 4,2 / 0,2	0,5
<b>121,9</b>	1,8 / 0 / 0,3	0,4	0 / 0	
<b>114,8</b>	1,8 / 0 / 0,3	0,6	0 / 0	
<b>109,6</b>	3,6 / 0 / 0,2	0,3	0 / 0	
<b>108,1</b>	1,8 / 0 / 0,3	0,4	0 / 0	
<b>95,5</b>	1,8 / 0 / 0,3	0,6	0 / 0	
<b>86,1</b>	1,8 / 0 / 0,3	0,4	0 / 0	
<b>88,7</b>	1,8 / 0 / 0,3	0,6	0 / 0	
<b>85,1</b>	1,8 / 0 / 0,3	0,6	0 / 0	

**Tabla 25:** Resultados obtenidos mediante Western-blot “in house”

*Chlamydophila pneumoniae*

kDa	POSITIVO (%)			
	IgG		IgA	
	Casos/Controles/p/OR	DNA p/Pearson/Kappa	Casos/Controles/p	DNA p/Pearson/Kappa
79,4	3,6 / 4,2 / 0,6	0,5	7,1 / 0 / 0,08	<b>0,03/0,2/0,1</b>
70,8	<b>8,9 / 0 / 0,04 / 1,9 (1,6-2,3)</b>	0,1	3,6 / 0 / 0,2	0,6
67,6	1,8 / 4,2 / 0,4	0,6	0 / 0	
66,8	1,8 / 0 / 0,3	0,4	0 / 0	
64,6	1,8 / 4,2 / 0,4	0,6	7,1 / 0 / 0,08	0,2
58,9	<b>8,9 / 0 / 0,04 / 1,9 (1,6-2,3)</b>	0,3	1,8 / 0 / 0,3	0,4
57,5	1,8 / 0 / 0,3	0,4	0 / 0	
54,6	7,1 / 0 / 0,06	<b>0,02 / 0,2 / 0,1</b>	0 / 0	
50,6	3,6 / 0 / 0,2	0,6	1,8 / 0 / 0,3	0,6
50,1	1,8 / 0 / 0,3	0,4	1,8 / 0 / 0,3	<b>0,04/0,2/0,8</b>
47,9	<b>14,3 / 0 / 0,006 / 2(1,6-2,4)</b>	0,2	0 / 0	
47,5	<b>8,9 / 0 / 0,04 / 1,9 (1,6-2,3)</b>	0,1	0 / 0	
42,4	1,8 / 0 / 0,3	0,4	0 / 0	
41,7	5,4 / 0 / 0,1	0,4	0 / 0	
33,6	1,8 / 0 / 0,3	0,6	0 / 0	
23,9	1,8 / 4,2 / 0,4	0,2	0 / 0	
20,9	1,8 / 0 / 0,3	0,4	0 / 0	
18,4	<b>14,3 / 0 / 0,006 / 2(1,6-2,4)</b>	0,2	5,4 / 0 / 0,1	<b>0,04/0,2/0,1</b>
17,3	5,4 / 0 / 0,1	0,4	0 / 0	
15,1	5,4 / 0 / 0,1	0,4	0 / 0	
14,5	3,6 / 0 / 0,2	0,2	0 / 0	
14,4	1,8 / 0 / 0,3	0,6	0 / 0	
14,3	1,8 / 8,3 / 0,1	0,3	0 / 0	
12,3	5,4 / 0 / 0,1	0,4	1,8 / 0 / 0,3	0,6

**Tabla 26:** Resultados obtenidos mediante Western-blot “in house”

## 4. Resultados

kDa	POSITIVO (%)			
	IgG		IgA	
	Cases/Controls/p/OR	DNA p/Pearson/Kappa	Cases/Controls/p	DNA p/Pearson/Kappa
<b>12,1</b>	<b>10,7 / 0 / 0,02 / 1,9(1,6-2,4)</b>	0,5	0 / 0	
<b>12</b>	5,4 / 4,2 / 0,6	0,7	3,6 / 4,2 / 0,6	0,4
<b>11,8</b>	1,8 / 0 / 0,3	0,4	0 / 0	
<b>11</b>	3,6 / 0 / 0,5	0,6	0 / 0	
<b>10,7</b>	1,8 / 0 / 0,3	0,6	0 / 0	
<b>10,6</b>	<b>8,9/0/0,04/1,91 (1,6-2,35)</b>	0,1	0 / 0	
<b>9,8</b>	12,5 / 20,8 / 0,2	0,4	16,1 / 0	0,3
<b>9,2</b>	<b>14,3 / 0 / 0,006 / 2(1,6-2,4)</b>	<b>0,04 / 0,2 / 0,1</b>	1,8 / 0 / 0,3	0,6
<b>8,1</b>	<b>10,7 / 0 / 0,02 / 1,9(1,6-2,4)</b>	0,7	0 / 0	
<b>7,6</b>	<b>14,3 / 0 / 0,006 / 2(1,6-2,4)</b>	0,2	0 / 0	
<b>7</b>	3,6 / 4,2 / 0,6	0,4	0 / 0	
<b>6,6</b>	1,8 / 0 / 0,3	0,6	0 / 0	
<b>6</b>	1,8 / 0 / 0,3	0,6	0 / 0	
<b>5,9</b>	1,8 / 0 / 0,3	0,6	3,6 / 0 / 0,2	0,3
<b>4,8</b>	1,8 / 0 / 0,3	0,6	0 / 0	
<b>2,4</b>	1,8 / 0 / 0,3	0,6	1,8 / 4,2 / 0,4	0,2
<b>2,2</b>	1,8 / 0 / 0,3	0,4	0 / 0	
<b>2,1</b>	3,6 / 0 / 0,2	0,6	0 / 0	
<b>1,7</b>	1,8 / 0 / 0,3	0,6	0 / 0	
<b>1,1</b>	7,1 / 0 / 0,06	<b>0,02/0,2/0,1</b>	0 / 0	

**Tabla 27:** Resultados obtenidos mediante Western-blot “in house”



## **5. DISCUSSION**



Hasta la fecha se han publicado una serie de estudios que analizan la relación entre la EAPO y la infección por *C. pneumoniae* (tabla 28). En algunos no se realizó un ajuste adecuado de las poblaciones (ya sea porque no se hizo para ninguna variable, o bien, porque sólo se realizó para algunas); en otros, algo novedoso, el estudio se realizó tanto sobre arterias con lesión, como sanas, en el mismo sujeto. Pero en ninguno de los trabajos se han empleado simultáneamente métodos directos e indirectos para el análisis de la relación, salvo en el trabajo de Linares y cols. (2001), sobre arterias carótidas, y en el estudio de Vécsei y cols. (2002), sobre diferentes arterias. En este sentido nuestro trabajo resultó novedoso ya que se emplearon poblaciones comparables que se sometieron simultáneamente a estudio mediante pruebas directas e indirectas.

ESTUDIOS	LOCALIZACIÓN DE LA ENFERMEDAD	AJUSTE	CASOS/CONTROL	MÉTODO
	CASOS / CONTROLES			
<i>Alakärppä y cols. (1999)</i>	Aorta AT / Sana	No	8 / 3	Directa
<i>Al-Amro y cols. (2001)</i>	Arterias AT / Sana	No	43 / 28	Directa
<i>Berger y cols. (2000)</i>	Arterias AT / Sana	No	60 / 51	Directa
<i>Chiu y cols. (1997)</i>	Carótida / Arterias	No	76 / 20	Directa
<i>Cook y cols. (1998)</i>	ICTUS / No ICTUS	No	176 / 1518	Indirecta
<i>Elkind y cols. (2000)</i>	ICTUS / ICTUS	No	89 / 89	Indirecta
<i>Farsak y cols. (2000)</i>	Carótida + Aorta AT / Sana	Interno	36 / 39	Directa
<i>Freidank y cols. (2002)</i>	Carótida / Sujetos sanos + Otras enfermedades	Sí	60 / 109	Directa
<i>Gil-Madre y cols. (2002)</i>	ICTUS / No ICTUS	Sí	91 / 112	Indirecta
<i>Glader y cols. (1999)</i>	ICTUS / No ICTUS	Sí	97 / 197	Indirecta
<i>Goo y cols. (2000)</i>	Aneurisma, Aorta AT / Sana	No	5 / 2	Directa
<i>Gutiérrez y cols. (2001b)</i>	Arterias AT / Sanas	Sí	85 / 50	Directa
<i>Gutiérrez y cols. (2001a)</i>	Arterias AT / Sanas	No	66 / 50	Indirecta
<i>Juvonen y cols. (1997)</i>	Aneurisma / Aorta Sana	Sí	12 / 9	Directa
<i>Kalayoglu y cols. (2003)</i>	Arterias AT / Sanas	No	25 / 18	Indirecta

**Tabla 28:** Estudios previos sobre la enfermedad arterial periférica oclusiva.

*Chlamydophila pneumoniae*

ESTUDIOS	LOCALIZACIÓN DE LA ENFERMEDAD	AJUSTE	CASOS/ CONTROL	MÉTODO
	CASOS / CONTROLES			
<i>Kol y cols. (1998)</i>	Carótida AT / Sana	No	19 / 7	Directa
<i>Kuo y cols. (1993a)</i>	Aorta AT / Sana	Sí	21 / 4	Directa
<i>LaBiche y cols. (2001)</i>	Carótida AT / Sana	No	37 / 57	Directa/ Indirecta
<i>Lehto y cols (2002)</i>	Arterias AT / Sanas	No	215 / 1158	Indirecta
<i>Lin y cols. (2003)</i>	Arterias AT / Sanas	No	200 / 24	Directa
<i>Linares y cols. (2001)</i>	<b>Carótida AT / Sana</b>	<b>Sí</b>	<b>26 / 50</b>	<b>Directa/ Indirecta</b>
<i>Maass y cols. (1998)</i>	Arterias AT / Sanas	No	92 / 10	Directa
<i>Maeda y cols. (2003)</i>	Carótida AT / Sana	Sí	197 / 2439	Indirecta
<i>Melnick y cols. (1993)</i>	Carótida AT / Sana	Sí	326 / 326	Indirecta
<i>Müller y cols. (2003)</i>	ICTUS / NO ICTUS	No	193 / 368	Directa
<i>Neureiter y cols. (2003)</i>	Carótida AT / Sana	Sí	20 / 40	Directa
<i>Ong y cols. (1996 )</i>	Arterias AT / Sanas	No	32 / 6	Directa
<i>Ong y cols. (2001)</i>	Carótida AT / Sana	Interno	41 / 41	Directa
<i>Ouchi y cols. (2000)</i>	Arterias AT / Sanas	No	30 / 110	Directa
<i>Ramos y cols. (1999)</i>	Aorta AT / Sana	Interno	147 / 98	Directa
<i>Rassu y cols. (2001)</i>	Arterias AT / Sanas	Interno	72 / 13	Directa
<i>Rose y cols. (2002)</i>	Aorta AT / Sana	No	58 / 2	Directa
<i>Sessa y cols. (2003)</i>	Carótida AT / Sana	No	18 / 33	Directa/ Indirecta
<i>Shi y cols. (2002)</i>	Aorta AT / Sana	No	10 / 23	Directa
<i>Tanne y cols. (2003)</i>	ICTUS / NO ICTUS	Sí	134 / 134	Indirecta
<i>Tarnacka y cols. (2002)</i>	ICTUS / NO ICTUS	No	44 / 115	Directa
<i>Taylor-Robinson y cols.(2002)</i>	Arterias AT / Sanas	Interno	24 / 27	Directa
<i>Van der Ven y cols. (2002)</i>	Arterias AT / Sanas	No	67 / 29	Indirecta
<i>Vécsei y cols. (2002a)</i>	Arterias AT / Sanas	Sí	14 / 14	Indirecta
<i>Vécsei y cols. (2002b)</i>	<b>Arterias AT / Sanas</b>	<b>Sí</b>	<b>14 / 14</b>	<b>Directa/ Indirecta</b>
<i>Virok y cols. (2001)</i>	ACM / ACM	No	15 / 4	Directa
<i>Wimmer y cols. (1996)</i>	ICTUS / NO ICTUS	Sí	58 / 52	Indirecta
<i>Wolf y cols. (2003)</i>	Arterias AT / Sanas	Sí	106 / 116	Indirecta

**Tabla 28:** Estudios previos sobre la enfermedad arterial periférica oclusiva.

En relación al ADN de Cp, éste se detectó en el 66,2% de los casos y en el 12% de los controles. Estos resultados se encuentran entre los más altos obtenidos en las diferentes series, para los casos, mediante el empleo de PCR anidada (tabla 29).

ESTUDIOS gen/sensibilidad	CASOS	CONTROLES	ESTADÍSTICA	
	% positivos	% positivos	OR	IC 95%
<i>Freidank y cols. (2002): Gen pst1 / 0.01</i>	16,7	0	21,0	1,2-368,0
<i>Gutiérrez y cols. (2001b): Gen pst1 / ND</i>	56,5	12	9,5	3,6-24,7
<i>LaBiche y cols. (2001): Gen pst1 / ND</i>	13,5	15,8	0,8	0,2-2,7
<i>Linares y cols. (2001): Gen pst1 / ND</i>	69,2	12	16,5	5,0-54,3
<i>Maass y cols. (1998): Gen pst / ND</i>	15,2	0	3,8	0,2-69,9
<i>Ong y cols.(1996): Gen ompA / 10</i>	42,8	50	1,0	0,0-51,6
<i>Ong y cols. (2001 ): Gen ompA / 0.001</i>	0	0	0,7	0,1-3,5
<i>Rassu y cols. (2001): Gen ompA / ND</i>	76,4	53,8	2,7	0,8-9,3
<i>Sessa y cols. (2003): Gen.pst1 / ND</i>	44,4	30,3	1,8	0,5-6,0
<i>Shi y cols. (2002): Cebadores CP1- CP2 y CPC- CPD / ND</i>	10	0	7,4	0,2-198,8
<i>Taylor-Robinson y cols.(2002): Gen ompA / 10</i>	62,5	0	89,7	4,8-1649,2
<i>Virok y cols.(2001): Gen ompA / ND</i>	33,3	0	4,7	0,2-104,5
<i>Nosotros: Gen.pst1 / ND</i>	<b>66,2</b>	<b>12</b>	<b>15,3</b>	<b>5,7-41,4</b>

ND: no determinado.

**Tabla 29:** Estudios en los que se refleja el gen y la sensibilidad para detectar el ADN mediante PCR anidada

## *Chlamydomphila pneumoniae*

Respecto a la seroprevalencia de la infección, destacó, en los casos, un mayor número de muestras con IgG anti-CE (mediante ELISA y MIF), con una *OR* elevada para ambos. No ocurrió así para la IgG anti-LPS y la IgA. Mediante MIF, estos valores se incluyen dentro del rango encontrado en otras series (tabla 30) para los casos, siendo más bajos para los controles, lo que hizo que nuestra *OR* fuera elevada.

ESTUDIOS título/antígeno	CASOS	CONTROLES	ESTADÍSTICA	
	% positivos	% positivos	<i>OR</i>	IC 95%
<i>Elkind y cols. (2000):</i> <i>16 / AR39</i>	80,9	83,1	0,8	0,4-1,8
<i>Glader y cols. (1999):</i> <i>32 / IOL207</i>	79,4	86,3	0,6	0,3-1,1
<i>LaBiche y cols. (2001):</i> <i>16 / AR39</i>	83,3	76,4	1,5	0,5- 4,5
<i>Linares y cols. (2001):</i> <i>32 / TW183</i>	69,2	24	7,1	2,4-20,4
<i>Melnick y cols. (1993):</i> <i>32 / AR39</i>	47,5	40,2	1,3	0,9-1,8
<i>Sessa y cols. (2003)</i> <i>32 / ND</i>	94,4	60,6	11,0	1,3-93,3
<i>Wimmer y cols.(1996):</i> <i>32 / IOL207 Parola,</i> <i>Kajaani 6</i>	74,1	76,9	0,8	0,3-2,0
<i>Nosotros.</i> <i>32/TW183</i>	<b>76,5</b>	<b>24</b>	<b>10,3</b>	<b>4,4-24,3</b>

**Tabla 30:** Estudios que detectan títulos bajos de IgG mediante MIF

Empleando la prueba de ELISA con CE, destacaron, por la elevada *OR*, los estudios de Linares y cols. (2001) y Gutiérrez y cols.(2001a), con unas *OR* de 17,5 y 7,9; respectivamente (tabla 31). En nuestro estudio el valor de *OR* fue de 14,6.

ESTUDIOS antígeno/fabricante	CASOS	CONTROLES	ESTADÍSTICA	
	% positivos	% positivos	<i>OR</i>	IC 95%
<i>Gutiérrez y cols. (2001a): CE/ Vircell</i>	80,3	34	7,9	3,4-18,3
<i>Gutiérrez y cols. (2001a): LPS/ Medac</i>	24,2	20	1,2	0,5-3,1
<i>Kalayoglu y cols (2003): CE/ en casa</i>	28	11,1	3,1	0,5-17,2
<i>Linares y cols. (2001): CE/ Vircell</i>	76,9	16	17,5	5,3-57,2
<i>Maeda y cols. (2003): C E/ Hitazyme</i>	48,2 (197)	53,5 (2439)	0,8	0,6-1,0
<i>Tanne y cols. (2003) : CE/ Savyon</i>	85,8	82,1	1,3	0,6-2,5
<i>van der Ven y cols. (2002): Proteínas / Labsystems</i>	89,5	69	3,8	1,2-11,7
<i>Vécsei y cols. (2002a): Proteínas/ Labsystems</i>	78,6	85,7	1,6	0,2-11,7
<i>Vécsei y cols. (2002a): LPS/ Medac</i>	85,7	78,6	0,7	0,1-3,3
<i>Vécsei y cols. (2002b): Proteínas/ Labsystems</i>	79	50	1,0	0,1-6,0
<i>Vécsei y cols. (2002b): LPS/ Medac</i>	78,6	78,6	0,6	0,0-4,3
<i>Wolf y cols. (2003) : CE/ Savyon</i>	66	54,3	1,6	0,9-2,8
<b><i>Nosotros. CE/ Vircell</i></b>	<b>73,5%</b>	<b>16%</b>	<b>14,6</b>	<b>5,7-36,9</b>

**Tabla 31:** Estudios que detectan IgG mediante ELISA

La comparación entre las pruebas para detectar IgG anti-CE, mediante MIF y ELISA, y el ADN de la bacteria, puso de manifiesto un grado de relación bajo aunque estadísticamente significativo. En este sentido 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 (Sessa y cols., 2001; Mazzoli y cols., 1998, ambos en enfermos coronarios).

### **5.1. Estudio mediante Western-blot comercial**

*Chlamydia pneumoniae* presenta algunas proteínas comunes con los miembros de la familia *Chlamydiaceae*, y otras específicas de especie que intervienen en procesos inmunógenos propios (Montigiani y cols., 2002; Vandahl y cols., 2001a). Así, se considera que la mayoría de los adultos tienen evidencia serológica de infecciones previas, aunque con títulos bajos de anticuerpos (Mandell y cols., 2004).

Desafortunadamente, se sabe poco sobre las proteínas inmunogénicas de Cp. Especialmente es controvertido el papel inmunogénico de la MOMP (con un peso molecular entre 39 y 40 kDa) (Essig y cols., 1999). Constituye el 60% de las proteínas de la membrana externa, y es común a todos los miembros de la familia *Chlamydiaceae*, aunque presenta diferencias estructurales en cada una de las especies (Stephens y cols., 2001). Además, en el caso de Cp, parece no estar expuesta en la superficie del cuerpo elemental (Biendo y cols., 1996), o podría estar oculta entre las proteínas polimórficas de la membrana externa (Persson y cols., 1998), todo ello hace que sea difícilmente reconocida por el sistema inmunológico y que no sea inmunodominante. En principio, la respuesta que genera la proteína MOMP no parece tener un importante papel en la patogénesis de la enfermedad causada por Cp. Sin embargo, un estudio en sujetos con enfermedad coronaria, empleando un ELISA con antígeno MOMP recombinante mostró una presencia significativa de IgA anti-MOMP, pero no de IgG (Kido y cols., 2001). Si bien nuestro grupo de casos es diferente al anterior, encontramos una presencia significativa de IgG anti-MOMP en

el Western-blot comercial, que se relacionó con las pruebas de MIF y ELISA y la presencia de ADN de Cp en la placa de ateroma. Esto no ocurrió con la IgA. Un resultado similar al nuestro, empleando un Western-blot no comercial en sueros de enfermos coronarios, fue obtenido por Maass y cols. (1997).

La proteína de 54 kDa está en la superficie del CE (Montigiani y cols., 2002; Vandahl y cols., 2001), por lo que podría ser una herramienta útil en el diagnóstico serológico (Campbell y cols., 2001) y en el desarrollo de vacunas (Wiedmann-Al-Ahmad y cols., 1997; Mygind y cols., 1998). Además, podría tener un papel importante en la patogénesis de la infección, ya que actuaría como adhesina. En nuestro estudio se encontró, en el grupo de casos, una presencia significativa de IgG anti-54 kDa en el Western-blot comercial, que se relacionó con la prueba de MIF y la presencia de ADN. Esto no ocurrió con la IgA. Un resultado similar al nuestro fue obtenido por Maass y cols. (1997).

El LPS es una molécula presente en todos los miembros de la familia *Chlamydiaceae*, en los cuerpos de inclusión, la membrana de las células infectadas y en la porción proximal de células próximas no infectadas (Campbell y cols., 2004).

Si bien, la estructura de este LPS coincide, en parte, con el de otras bacterias Gram-negativas, se han encontrado algunas diferencias en:

- 1) la heterogeneidad de la composición de los ácidos grasos de la familia *Chlamydiaceae*.
- 2) el KDO, que también posee un antígeno específico de género con enlaces  $\alpha$ -2-8 (Belunis y cols., 1992).

El LPS de *C. pneumoniae* es capaz de unirse a los receptores CD14 y activar a los monocitos. Esta activación celular podría justificar los mecanismos moleculares de infección que participan en la aterogénesis y otros desórdenes inflamatorios. Estos hallazgos proporcionan una potencial explicación sobre el papel de la infección por

*C. pneumoniae* en la enfermedad cardiovascular (Eng y cols., 2003).

Los anticuerpos frente al LPS se forman precozmente en la infección por clamidia, pero sus niveles disminuyen antes que otros antígenos. La detección de estos anticuerpos no parece ser útil para la determinación de la seroprevalencia de clamidia en la población. Usualmente los títulos de la IgG anti-LPS tienden a disminuir después de los 3 años, y la presencia persistente de IgG podría ser un marcador de infección crónica debido a una exposición continua al sistema inmunológico del hospedador de *C. pneumoniae*, que debería provocar una estimulación repetitiva de IgG anti-LPS, así como altos títulos de IgG frente a otros antígenos de la bacteria (Hermann y cols., 2002). En este estudio se encontró, en el grupo de casos, una presencia significativa de IgG e IgA anti-LPS en el Western-blot comercial, que no se relacionó con la detección de anticuerpos anti-LPS mediante ELISA y la presencia de ADN. Es posible que las diferencias químicas entre los antígenos del Western-blot y el ELISA expliquen esta falta de relación. Finalmente, la detección de anticuerpos anti-LPS mediante el Western-blot comercial puede tener un mayor riesgo de reacciones serológicas cruzadas, no sólo con otras especies de clamidia, sino también con otros géneros de bacterias (Ossewarde y cols., 2001), aunque las características de la población estudiada, en principio, excluyen éstas.

Los anticuerpos frente a Hsp 60 no son específicos, pero son importantes en el reconocimiento de los estados crónicos. Clamidia produce grandes cantidades de Hsp 60, localizada en el citoplasma e intercalada en la membrana externa, y se ha encontrado co-localizada en las placas arterioscleróticas humanas y en el suero de sujetos infectados de forma crónica. Hsp 60 de *C. pneumoniae* induce la expresión de citoquinas y adhesinas, citotoxicidad en el endotelio vascular, síntesis de anticuerpos, que reaccionan con la endógena humana, y la liberación de metaloproteinasas que degradarían el colágeno. También interactúa mediante mimetismo molecular con la  $\alpha$ -miosina (Saikku y cols., 2000; Stephens y cols., 2003). Finalmente, existen datos que relacionan el LPS y la Hsp 60 con los procesos aterogénicos, debidos a las

interacciones de las lipoproteínas con el sistema mononuclear fagocítico; y la acumulación de las lipoproteínas y su oxidación en éstos (Kalayoglu y cols., 2000). En este estudio se encontró, en el grupo de casos, una presencia significativa de IgA anti-Hsp 60 kDa, a diferencia de la IgG encontrada por Maass y cols. (1997). Es lógico que su presencia no se relacione con los resultados del ELISA y MIF, tal y como se obtuvo, ya que el antígeno Hsp 60 kDa forma parte de la fracción sarcosil soluble de los CE. Se desconoce por qué no se relacionó con la presencia de ADN de Cp en la placa de ateroma.

Los anticuerpos anti-92 kDa detectados están dirigidos frente a una proteína descrita, una proteasa con actividad ATP-dependiente que degrada los plegamientos y anormalidades de las proteínas dentro de las células ([www.stdgen.lanl.gov/](http://www.stdgen.lanl.gov/)). Aunque también podrían reflejar la presencia de una gelatinasa liberada por los macrófagos ante el estímulo de Cp. Así se ha demostrado la capacidad de las proteínas Omp2, MOMP, y Hsp 60 kDa para inducir la gelatinasa de 92-kDa mediante monocitos (Vehmaan-Kreula y cols., 2001). En este estudio se encontró, en el grupo de casos, una presencia significativa de IgA anti-92 kDa, no referida por Maass y cols. (1997), que no se relacionó con la presencia de ADN de Cp en la placa de ateroma.

Globalmente, los resultados obtenidos invitan a reflexionar sobre ¿por qué entre las bandas presentes de manera significativa sólo los anticuerpos anti-MOMP y anti-54 kDa se asociaron a la presencia de ADN? Ésto se podría deber a que, en el grupo de casos, reflejen una fase inicial con presencia de ADN e IgG específica. Posteriormente, aún en ausencia de la bacteria, podría existir una enfermedad inmunomediada con presencia de IgA anti-Hsp 60 kDa.

## 5.2. Estudio mediante Western-blot “in house”

La utilización de la prueba de Western-blot “in house” ha permitido la obtención de un gran número de bandas diferentes. En la tabla 32 se relacionan las bandas obtenidas en los casos, de forma significativa, y las descritas en los estudios de Vandahl y cols. (2001), Montigiani y cols. (2002) y la base de datos de Los Alamos National Laboratory (<http://www.stdgen.lanl.gov>). Debido a que no se han utilizado anticuerpos monoclonales no podemos saber con exactitud la naturaleza de la proteína detectada, aunque sí se puede hacer un estudio comparativo con las obtenidas en otros estudios (tabla 32).

PESO MOLECULAR OBSERVADO (kDa)			
Nosotros	Vandahl	Montigiani	Los Alamos National Laboratory
128,8	Más cercana: 114,2 (Pmp20)	Más cercana: 142,9 (Pmp 6)	Más cercana: 127,3 (Proteína clamidia específica)
70,8	Más cercana: 67,8 (Omp2) o 71,3 (DnaK)	Más cercana: 71,3 (Dnak)	Más cercana: 70,8 (fosfatasa) o 70,9 (transcetolasa B)
58,9	Más cercana: 58,8 (Omp) o 56,9 (Hsp 60) o 60,3 (OmcB)	Más cercana: 58,6 (Omp) o 57,3 (Omc B)	Más cercana: 58,7 (Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa) o 58,2 (Hsp 60)
47,9/47,5	Más cercanas: 47,8 (proteasas) o 47,1 (Pmp 21)	Descrita: 47,9 (Hipotética proteína clamidia específica)	Descrita: 47,9 (proteína clamidia específica)
18,4	Más cercana: 18,9 (Hipotética proteína)	Más cercana: 17,9 (hipotética proteína) o 17,3 (Omp H)	Más cercana: 18,3 (proteína clamidia específica)
12,1	Más cercana: 12,3 (Riboflavina Sintasa) o 12,9/11,4 (hipotética proteína)	No describe.	Descrita: 12,1 (proteína <i>Chlamydia pneumoniae</i> específica)
10,6	Más cercana: 10,2 (Tioredoxina) o 10,9 (hipotética proteína)	No describe.	Descrita: 10,6 (proteína de translocación YOPS)
9,2	Más cercana: 9,1 (Pmp8) o 9,4 (proteína clamidia específica)	Descrita: 9,2 (Omc A)	Descrita: 9,2 (Omc A)
8,1	No describe.	Descrita: 8,1 (Omc A)	Descrita: 8,1 (proteína clamidia específica)
7,6	No describe.	Descrita: 7,6 (Omc A)	Descrita: 7,6 (proteína clamidia específica)

**Tabla 32:** Relación de proteínas obtenidas por nosotros y los estudios de Vandahl y cols. (2001), Montigiani y cols. (2002) y Los Alamos National Laboratory

Las proteínas, en general, y las proteínas de la membrana externa (OMPs) de los patógenos microbianos, en particular, tienen un importante papel en la unión a la envuelta de la célula hospedadora, y pueden ser importantes en inmunoterapia.

Antes de la reciente secuenciación del genoma de Cp (1999), y debido a la dificultad de cultivar grandes cantidades de clamidia, adecuada para la separación bioquímica, se ha conocido poco sobre la composición proteica de la membrana externa. Las OMPs analizadas, por nosotros y otros autores, están envueltas en diferentes procesos como la adquisición de nutrientes específicos y metabolitos, adhesión o invasión de células y tejidos del hospedador, y el sistema III de secreción conduce a la liberación de enzimas, que modulan la respuesta del hospedador a la infección, y la evasión del sistema inmunológico mediante la variación antigénica (Stephens y Lammel, 2001).

Comparando nuestros resultados con estudios recientes de análisis de proteínas y una base de datos del genoma de Cp, se encontró que la proteína de 128,8 kDa podría tratarse de una proteína específica del género clamidia que es inmunogénica; o bien una proteína polimórfica de membrana externa. La Pmp 6 es una proteína enclavada, por lo que, posiblemente, tiene un papel en la entrada al hospedador (transportador tipo V) (Grimwood y cols., 1999; Henderson y cols., 2001; Birkelund y cols., 2002; Vandahl y cols., 2002b) o la Pmp 20, que en adición a la Pmp 21 y las proteínas de shock térmico contribuyen a la activación de NF- $\kappa$ B en células endoteliales (Ngeh y cols., 2002; Dechend y cols., 1999; Krull y cols., 1999; Bianchi y cols., 1997; Summersgill y cols., 2000). *C. pneumoniae* podría, *in vivo*, mediante interacciones de sus Pmps con el endotelio, contribuir a un daño vascular durante el desarrollo y progresión de las lesiones arterioscleróticas, ya que las Pmp interactúan con las células endoteliales *in vitro*, a través del factor nuclear, y aumenta la expresión de IL-6 y la proteína 1-quimiotáctica de los monocitos (Niessner y cols., 2003).

## *Chlamydophila pneumoniae*

---

La proteína de 70,8 kDa podría ser una fosfatasa o transcetolasa implicada en diferentes rutas metabólicas. Comparando con otros estudios, parece tratarse de la Dnak, una chaperona que se expone en la superficie de Clamidia y es muy inmunogénica en la infecciones (Montigiani y cols., 2002).

La proteína de 58,9 kDa podría tratarse, bien de una enzima metabólica (G6PDH); bien de la Omc B, cuya porción expuesta en la superficie es muy escasa o inexistente, lo que hace pensar que no se encuentra en la superficie, aunque es muy inmonogénica y recientemente se ha demostrado que los glucosaminoglicanos pueden unirse a esta proteína; de la Hsp 60 kDa, que se relaciona con la arteriosclerosis por inducir un ataque a la pared endotelial mediante una reacción de hipersensibilidad retardada propia de las infecciones crónicas (Taylor y cols., 1990; Fong y cols., 2002; Mayr y cols., 1999); o, finalmente, de una proteína de membrana externa diferente a las anteriores.

La proteína de 47,9 kDa podría tratarse de una proteína específica del género clamidia. una serin-proteasa o bien la Pmp 21, que está implicada en el daño vascular junto con otras (Niessner y cols., 2003).

La proteína de 18,4 kDa podría ser una proteína que se fija a la lectina (Swanson y cols., 1996), la Omp H, una proteína de membrana externa, o una histona nuclear (Swanson y cols., 1996).

La proteína de 12,1 kDa podría ser una riboflavina, proteínas hipotéticas de clamidia o *C. pneumoniae* específica, que están implicadas en el tropismo tisular y expuestas en la superficie. Estas proteínas son inmunogénicas y posibles candidatas a ser empleados en vacunas, ya que contienen estructuras comunes que se repiten (Montigiani y cols., 2002).

La proteína de 10,6 kDa podría ser la tioredoxina, una hipotética proteína de

clamidia o bien una proteína de translocación del sistema de secreción tipo III. Esta proteína de translocación es posible que tenga un papel en las proyecciones de la superficie de clamidia, usualmente 18, que se encuentran en el citoplasma y salen hacia la superficie para penetrar en el endosoma celular, permitiendo obtener nutrientes del citoplasma del hospedador (<http://www.stdgen.lanl.gov>.)

La proteína de 9,2 kDa podría tratarse de una proteína clamidia específica, una proteína polimórfica de membrana externa, como la inmunógena Pmp8 de la superficie; o bien podría tratarse de la Omc A, cuyo peso molecular se encuentra en el intervalo de 9,4 a 7,2 kDa, adhesina asociada a la diferenciación del CR al CE y necesaria para la integridad de la membrana externa del CE (Montigiani y cols., 2002) donde se unen los glucosaminoglicanos.

Las proteínas de 8,1 y 7,6 kDa podrían ser la OmcA o proteínas clamidia específicas.

Es lógico que en nuestra prueba no se detecte LPS debido a que no se empleó fenol en la extracción, se hirvió el extracto bacteriano mas de 5 min, y, finalmente, nuestro método, SDS-page, es un método óptimo de separación de proteínas y no del LPS.

Por tanto, en nuestro Western-blot “in house” se obtuvieron diferentes bandas proteicas de Cp, en casos respecto a controles. Vistos los resultados se plantea la pregunta ¿por qué sólo algunos anticuerpos se asociaron a la presencia de ADN, detectándose de manera significativa en los casos? Es posible que ellos reflejen una fase inicial de la aterogénesis, con presencia de ADN. Posteriormente, aún en ausencia de la bacteria, una mediación inmune puede desarrollar la enfermedad.



## **6. CONCLUSIONES**



## 6. Conclusiones

---

1.- Se ha conseguido desarrollar una prueba Western-blot para detectar los anticuerpos frente a *Chlamydomphila pneumoniae*, que se ha aplicado en muestras de suero de sujetos con enfermedad arterial periférica oclusiva.

2.- Los sujetos estudiados, pertenecientes a los casos y controles, han sido comparables, dado que se controló, en el diseño, la variabilidad de los factores edad, sexo, tabaquismo y obesidad. El único factor que influyó en los resultados fue el hecho de pertenecer al grupo de casos o de controles.

3.- Mediante una prueba de PCR anidada para detectar ADN de *Chlamydomphila pneumoniae* en las biopsias, este estuvo más presente, de forma significativa, en los casos.

4.- Mediante MIF y ELISA la IgG anti-cuerpo elemental fue más prevalente en los casos y cuando se detectó el ADN. No ocurrió lo mismo con la IgG anti-lipopolisacárido y la IgA anti-clamidia. Esto se pudiera deber a que el LPS no fuera un buen antígeno para rescatar los anticuerpos en las reinfecciones o reactivaciones y a que la IgA no se una correctamente a los antígenos usados en los equipos de ELISA.

5.- Empleando un Western-blot comercial se encontró, en los casos, una presencia significativa de IgG anti-39 kDa y anti-54 kDa, que se relacionaron con los resultados obtenidos mediante MIF y el ADN de *Chlamydomphila pneumoniae*; así como de IgA anti-LPS, anti-92 kDa y anti-Hsp 60 kDa. Esta última no se relacionó con la presencia de ADN de la bacteria. Pudiera ser que los anticuerpos, en los casos, reflejen una fase inicial de la infección en la pared arterial con presencia de ADN e IgG específica. Posteriormente, aún en ausencia de la bacteria, podría existir una enfermedad inmunomediada con presencia de IgA anti-Hsp 60 kDa.

6.- Cuando se utilizó la prueba de Western-blot desarrollada “in house” se observó la presencia de bandas de IgG e IgA frente a antígenos de diferentes pesos moleculares, destacando, en los casos, las bandas de IgG de 70,8; 58,9; 47,9; 47,5; 18,4; 12,1; 10,6; 8,1 y 7,6 kDa; y la co-existencia de ADN cuando estuvieron presentes las bandas de IgG de 54,6 y 1,1 kDa y de IgA de 79,4; 50,1 y 18,4 kDa.

7.- En la prueba de Western-blot “in house” también destacaron las bandas de IgG frente a los antígenos de 128,8 y 9,2 kDa porque co-existieron, de forma significativa, con el ADN de la bacteria en las biopsias y la presencia de enfermedad arterial periférica. Es posible que esta IgG refleje una fase inicial de la aterogénesis, con presencia del ADN. Posteriormente, aún en ausencia de la bacteria, se puede desarrollar la enfermedad de manera inmunomediada.

8.- La contribución más importante de este estudio deriva del análisis simultáneo de diferentes pruebas que evalúan la relación entre la infección por *Chlamydophila pneumoniae* y la enfermedad vascular periférica. Pensamos que los resultados obtenidos derivan de su reconocimiento por el sistema inmunológico, durante su probable transporte por los monocitos, y la detección de la bacteria a través de su ADN. Basándose en esto, se podría concluir que, de manera significativa, esta infección está relacionada con esta enfermedad.

9.- No se puede deducir de nuestro estudio una relación causal directa entre la infección crónica y la enfermedad arterial periférica oclusiva, pero sí están justificadas nuevas investigaciones, en animales susceptibles, dirigidas a la recuperación de la bacteria, la reproducción de la enfermedad y la prevención o el tratamiento con antibióticos.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**



**ALAKÄRPPÄ H**, Surcel HM, Laitinen K y cols. 1999. Detection of *Chlamydia pneumoniae* by colorimetric in situ hybridization. *APMIS*. 107: 451-4.

**AL-AMRO AA**, al-Jafari AA, al-Fagih MR y cols. 2001. Frequency of occurrence of cytomegalovirus and *Chlamydia pneumoniae* in lymphocytes of atherosclerotic patients. *Cent Eur J Public Health*. 9: 106-8.

**ALDOUS MB**, Grayston JT, Wang SP y cols. 1992. Seroepidemiology of *Chlamydia pneumoniae* TWAR infection in Seattle families, 1966–1979. *J Infect Dis*. 166: 646-9.

**ACAS Executive Committee.** 1995. Endarterectomy for asymptomatic carotid artery stenosis. *JAMA*. 273: 1421-8.

**AUGENBRAUN MH**, Roblin PM, Chirgwin K y cols. 1991. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from the lungs of patients infected with the human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol*. 29: 401-2.

**BANNANTINE JP**, Griffiths RS, Viratyosin W y cols. 2000. A secondary structure motif predictive of protein localization to the chlamydial inclusion membrane. *Cell Microbiol*. 2: 35-47.

**BARBOUR AG**, Amano K, Hackstadt T y cols. 1982. *Chlamydia trachomatis* has penicillin-binding proteins but not detectable muramic acid. *J Bacteriol*. 15: 420-8.

**BAVOIL P**, Ohlin A y Schachter J. 1984. Role of disulfide bonding in outer membrane structure and permeability in *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun*. 44: 479-85.

**BEATTY WL**, Belanger TA, Desai AA y cols. 1994. Tryptophan depletion as a mechanism of gamma interferon-mediated chlamydial persistence. *Infect Immun.* 62: 3705-11.

**BEATY CD**, Grayston JT, Wang SP y cols. 1991. *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR, infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis.* 144: 1408-10.

**BELL TA**, Kuo CC, Wang SP y cols. 1989. Experimental infection of baboons (*Papio cynocephalus anubis*) with *Chlamydia pneumoniae* strain 'TWAR. *J Infect.* 19: 47-9.

**BELUNIS CJ**, Clementz T, Carty SM y cols. 1995. Inhibition of lipopolysaccharide biosynthesis and cell growth following inactivation of the *kdtA* gene in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 270: 27646-52.

**BELUNIS CJ**, Mdluli KE, Raetz CR y cols. 1992. A novel 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase from *Chlamydia trachomatis* required for expression of the genus-specific epitope. *J Biol Chem.* 267: 18702-7.

**BERGER M**, Schroder B, Daeschlein G y cols. 2000. *Chlamydia pneumoniae* DNA in non-coronary atherosclerotic plaques and circulating leukocytes. *J Lab Clin Med.* 136: 194-200.

**BIANCHI A**, Dosquet C, Henry S y cols. 1997. *Chlamydia trachomatis* growth stimulates interleukin 8 production by human monocytic U-937 cells. *Infect Immun.* 65: 2434-6.

**BIENDO M**, Eb F, Lefebvre F y cols. 1996. Limits of the immunofluorescence test and advantages of immunoblotting in the diagnosis of chlamydiosis. *Clin Diagn*

*Lab Immunol.* 3: 706-9.

**BIRKELUND S**, Christiansen G, Vandahl BB y cols. 2002. Are the Pmp proteins parallel beta-helices?. *10th Symposium on Human Chlamydial Infections.* 551-4.

**BIRKELUND S**, Lundemose AG y Christiansen G. 1988. Chemical cross-linking of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun.* 56: 654-9.

**BIRKELUND S**, Lundemose AG y Christiansen G. 1989. Immunoelectron microscopy of lipopolysaccharide in *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun.* 57: 3250-3.

**BLACK CM**, Bullard JC, Staton GW y cols. 1992. Seroprevalence of *Chlamydia pneumoniae* antibodies in patients with pulmonary sarcoidosis in North Central Georgia, p. 175. En Mårdh PA, La Placa M y Ward ME. (eds.) *Proceedings of the European Society for Chlamydial Research.* Almquist & Wiksell International, Estocolmo, Suecia.

**BOMAN J**, Soderberg S, Forsberg J y cols. 1988. High prevalence of *Chlamydia pneumoniae* DNA in peripheral blood mononuclear cells in patients with cardiovascular disease and in middle-aged blood donors. *J Infect Dis.* 178: 274-7.

**BRADÉ L**, Schramek S, Schade U y cols. 1986. Chemical, biological, and immuno chemical properties of the *Chlamydia psittaci* lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 54: 568-74.

**BRAUN J**, Laitko S, Treharne J y cols. 1994. *Chlamydia pneumoniae*; a new causative agent of reactive arthritis and undifferentiated oligoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 53: 100-5.

CAMPBELL LA y Kuo CC. 2004. *Chlamydia pneumoniae*--an infectious risk factor for atherosclerosis?. *Nat Rev Microbiol.* 2: 23-32.

CAMPBELL LA, Melgosa MP, Hamilton DJ y cols. 1992. Detection of *Chlamydia pneumoniae* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 30: 434-9.

CAMPBELL LA, O'Brien ER, Cappuccio AL y cols. 1995. Detection of *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) in human coronary atherectomy tissues. *J Infect Dis.* 172: 585-8.

CAMPBELL LA, Roberts S, Inoue S y cols. 2001. Evaluation of *Chlamydia pneumoniae* 43- and 53-kilodalton recombinant proteins for serodiagnosis by western blot. *Clin Diag Lab Immunol.* 8: 1231-3.

CAMPBELL S, Richmond SJ, Yates PS y cols. 1994. Lipopolysaccharide in cells infected by *Chlamydia trachomatis*. *Microbiology.* 140: 1995-02.

CARLIN JM y Weller JB. 1995. Potentiation of interferon-mediated inhibition of *Chlamydia* infection by interleukin-1 in human macrophage cultures. *Infect Immun.* 63: 1870-5.

CASSELL GL, Grayston JT y Azithromycin Respiratory Infection Study (ARIS) Investigators. 1994. In vitro and clinical activity of azithromycin against *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae*. En: *Second International Conference on the Macrolides, Azalides, and Streptogramins*. Venecia, Italia.

CEVENINI R, Donati M, Brocchi E y cols. 1991. Partial characterization of an 89-kDa highly immunoreactive protein from *Chlamydia psittaci* A/22 causing ovine abortion. *FEMS Microbiol Lett.* 65: 111-5.

**CHIU B**, Viira E, Tucker W y cols. 1997. *Chlamydia pneumoniae*, cytomegalovirus, and herpes simplex virus in atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation*. 96: 2144-8.

**CHRISTIANSEN G**, Ostergaard L y Birkelund S. 1997. Molecular biology of the *Chlamydia pneumoniae* surface. *Scand J Infect Dis Suppl*. 104: 5-10.

**CLES LD** y Stamm WE. 1990. Use of HL cells for improved isolation and passage of *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 28: 938-40.

**COOK PJ**, Honeybourne D, Lip GY y cols. 1998. *Chlamydia pneumoniae* antibody titers are significantly associated with acute stroke and transient cerebral ischemia: the West Birmingham Stroke Project. *Stroke*. 29: 404-10.

**COSENTINI R**, Blasi F, Rossi S y cols. 1994. *Chlamydia pneumoniae* and severe community-acquired pneumonia, p. 453-6. En Orfila J, Byrne I, Cherneskey A, Grayston JT, Jones P, Ridgway GL, Saikku P, Schachter J, Stamm WE y Stephens RS. (eds.) *Chlamydial infections*. Societa Editrice Esculapio. Bolonia, Italia.

**COX RL**, Kuo CC, Grayston JT y cols. 1988. Deoxyribonucleic acid relatedness of *Chlamydia* sp. strain TWAR to *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia psittaci*. *Int J Syst Bacteriol*. 38: 265-8.

**DECHEND R**, Maass M, Gieffers J y cols. 1999. *Chlamydia pneumoniae* infection of vascular smooth muscle and endothelial cells activates NF-kappaB and induces tissue factor and PAI-1 expression: a potential link to accelerated arteriosclerosis. *Circulation*. 100: 1369-73.

**DWYER RS**, Treharne JD, Jones BR y cols. 1972. Chlamydial infection. Results of micro-immunofluorescence test for detection of typespecific antibody in certain chlamydial infections. *Br J Vener Dis.* 48: 452-9.

**EKMAN MR**, Grayston JT, Visakorpi R y cols. 1993a. An epidemic of infections due to *Chlamydia pneumoniae* in military conscripts. *Clin Infect Dis.* 17: 420-5.

**EKMAN MR**, Rasmussen SJ, Timms P y cols. 1993b. Polymerase chain reaction and indirect immunofluorescence for detection of *Chlamydia pneumoniae* in clinical samples, abstr. C-313, p. 501. En: *Abstracts of the 93rd General Meeting of the American Society for Microbiology.* Washington, EEUU.

**ELKIND MS**, Lin IF, Grayston JT y cols. 2000. *Chlamydia pneumoniae* and the risk of first ischemic stroke: The Northern Manhattan Stroke Study. *Stroke.* 31: 1521-5.

**ENG HL**, Chen CH, Kuo CH y cols. 2003. Association of CD14 promoter gene polymorphism and *Chlamydia pneumoniae* infection. *J Infect Dis.* 188: 90-7.

**ESSIG A**, Simnacher U, Milorad S y cols. 1999. Analysis of the humoral immune response to *Chlamydia pneumoniae* by immunoblotting and immunoprecipitation. *Clin Diagnost Lab Immunol.* 6: 819-25.

**EVERETT KD**, Bush RM, y Andersen AA. 1999. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol.* 49: 415-40.

**EVERETT KD**, Desiderio DM y Hatch TP. 1994. Characterization of lipoprotein EnvA in *Chlamydia psittaci* 6BC. *J Bacteriol.* 176: 6082-7.

**EVERETT KD** y Hatch TP. 1995. Architecture of the cell envelope of *Chlamydia psittaci* 6BC. *J Bacteriol.* 177: 877-82.

**FALSEY AR** y Walsh EE. 1993. Transmission of *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis.* 168: 493-6.

**FAN J** y Stephens RS. 1997. Antigen conformation dependence of *Chlamydia trachomatis* infectivity neutralization. *J Infect Dis.* 176: 713-21.

**FARSAK B**, Yildirim A, Akyon Y y cols. 2000. Detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori* DNA in human atherosclerotic plaques by PCR. *J Clin Microbiol.* 38: 4408-11.

**FONG IW**, Chiu B, Viira E y cols. 1997. Rabbit model for *Chlamydia pneumoniae* infection. *J Clin Microbiol.* 35: 48-52.

**FONG IW**, Chiu B, Viira E y cols. 2002. Chlamydial heat-shock protein-60 antibody and correlation with *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic plaques. *J Infect Dis.* 186: 1469-73.

**FONTAN PA**, Pancholi V, Nociari MM y cols. 2000. Antibodies to streptococcal surface enolase react with human alpha-enolase: implications in poststreptococcal sequelae. *J Infect Dis.* 182: 1712-21.

**FORSEY T**, Darougar S y Treharne JD. 1986. Prevalence in human beings of antibodies to *Chlamydia* IOL-207, an atypical strain of *Chlamydia*. *J Infect.* 12: 145-

52.

**FOWKES FG**, Housley E, Riemersma RA y cols. 1992. Smoking, lipids, glucose intolerance, and blood pressure as risk factors for peripheral atherosclerosis compared with ischemic heart disease in the Edinburgh Artery Study. *Am J Epidemiol.* 135: 331-40.

**FREIDANK HM**, Lux A, Dern P y cols. 2002. *Chlamydia pneumoniae* DNA in peripheral venous blood samples from patients with carotid artery stenosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 21: 60-2.

**FRISHMAN WH.** 1998. Biologic markers as predictors of cardiovascular disease. *Am J Med.* 104: 18-27.

**GAYDOS CA**, Eiden JJ, Oldach D y cols. 1994a. Diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* in patients with community acquired pneumonia by polymerase chain reaction enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis.* 19: 157-60.

**GAYDOS CA**, Fowler CL, Gill VJ y cols. 1993. Detection of *Chlamydia pneumoniae* by polymerase chain reaction-enzyme immunoassay in an immunocompromised population. *Clin Infect Dis.* 17: 718-23.

**GAYDOS CA**, Quinn TC y Eiden JJ. 1992. Identification of *Chlamydia pneumoniae* by DNA amplification of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol.* 30: 796-800.

**GAYDOS CA**, Roblin PM, Hammerschlag MR y cols. 1994b. Diagnostic utility of PCR enzyme immunoassay, culture, and serology for detection of *Chlamydia pneumoniae* in symptomatic and asymptomatic patients. *J Clin Microbiol.* 32: 903-5.

**GIL-MADRE J**, Garcia JL, Gonzalez RC y cols. 2002. Association between seropositivity to *Chlamydia pneumoniae* and acute ischaemic stroke. *Eur J Neurol.* 9: 303-6.

**GLADER C**, Stegmayr B, Boman J y cols. 1999. *Chlamydia pneumoniae* antibodies and high lipoprotein(a) levels do not predict ischemic cerebral infarctions. Results from Case-Control study in Northern Sweden. *Stroke.* 30: 2013-8.

**GOO Y**, Moon H, Myung J y cols. 2000. Serologic and Histopatologic study of *Chlamydia pneumoniae* infection in atherosclerosis induced by *Chlamydia pneumoniae*. *Yonsei Med J.* 41: 319-27.

**GOULD K.** 1998. New concepts and paradigms in cardiovascular medicine: the non invasive management of coronary artery disease. *Am J Med.* 104: 2-17.

**GRAYSTON JT.** 1992. Infections caused by *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. *Clin Infect Dis.* 15: 757-63.

**GRAYSTON JT.** 1994. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) infections in children. *J Pediatr Infect Dis.* 13: 675-85.

**GRAYSTON JT**, Aldous MB, Easton A y cols. 1993. Evidence that *Chlamydia pneumoniae* causes pneumonia and bronchitis. *J Infect Dis.* 168: 1231-5.

**GRAYSTON JT**, Kuo CC, Coulson AS y cols. 1995. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) in atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation.*92: 3397-400.

**GRAYSTON JT**, Kuo CC, Wang SP y cols. 1986. A new *Chlamydia psittaci* strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infection. *N Engl J Med.* 315: 161-8.

**GRIMWOOD J**, Olinger L y Stephens RS. 2001. Expression of *Chlamydia pneumoniae* polymorphic membrane protein family genes. *Infect Immun.* 69: 2383-9.

**GRIMWOOD J** y Stephens RS. 1999. Computational analysis of the polymorphic membrane protein superfamily of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*. *Microb Comp Genomics.* 4: 187-201.

**GUTIÉRREZ J**, Linares J, Fernández F y cols. 2001a. Presencia de anticuerpos anti-*Chlamydia pneumoniae* en procesos vasculares periféricos y neurológicos. *Rev Neurol.* 32: 501-5.

**GUTIÉRREZ J**, Linares J, López C y cols. 2001b. *Chlamydia pneumoniae* DNA in the arterial wall of patients with peripheral vascular disease. *Infection.* 29: 196-200.

**GUTIÉRREZ J**, Luna JD, Linares J y cols. 2005. Relationship between peripheral arterial occlusive disease (PAOD) and chronic *Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae* infection: a meta-analysis. *Thromb Haemost.* 93: DOI 10.1160 / TH04-12-0782.

**HAHN DL**, Dodge RW y Golubjatnikov R. 1991. Association of *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR) infection with wheezing, asthmatic bronchitis, and adult-onset asthma. *JAMA.* 266: 225-30.

**HAILD S**, Ivarsson S, Bjerre I, Persson K. 1992. Guillain-Barre syndrome after *Chlamydia pneumoniae* infection. *N Engl J Med.* 326: 576-7.

**HAILD S**, Sveger T y Persson K. 1994. Longitudinal pattern of antibodies to *Chlamydia pneumoniae* in children, p. 189-92. En: Orfila J, Byrne GL, Cherneskey

A, Grayston JT, Jones JP, Ridgway GL, Saikku P, Schachter J, Stamm WE y Stephens RS. (eds.) *Chlamydial infections*. Societa Editrice Esculapio. Bolonia, Italia.

**HAMMERSCHLAG MR**, Chirgwin K, Roblin PM y cols. 1992a. Persistent infection with *Chlamydia pneumoniae* following acute respiratory illness. *Clin Infect Dis*. 14: 178-82.

**HAMMERSCHLAG MR**, Hyman CL y Roblin PM. 1992b. In vitro activities of five quinolones against *Chlamydia pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 36: 682-3.

**HAMMERSCHLAG MR**, Qumei KK y Roblin PM. 1992c. In vitro activities of azithromycin, clarithromycin, L-ofloxacin, and other antibiotics against *Chlamydia pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 36: 1573-4.

**HARALAMBIEVA I**, Iankov I, Petrov D y cols. 2001. Cross reaction between the genus-specific lipopolysaccharide antigen of *Chlamydia* spp. and the lipopolysaccharide of *Porfiromonas gingivalis*, *Escherichia coli* 0119 and *Salmonella newington*: Implications for diagnosis. *Diagn Microb Infect Dis*. 41: 99-106.

**HASHIGUCCI K**, Ogawa H, Suzuki T y cols. 1992. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from the maxillary sinus of a patient with purulent sinusitis. *Clin Infect Dis*. 15: 570-1.

**HATCH TP**, Allan I y Pearce JH. 1984. Structural and polypeptide differences between envelopes of infective and reproductive life cycle forms of *Chlamydia* spp. *J Bacteriol*. 157: 13-20.

**HENDERSON IR** y Lam AC. 2001. Polymorphic proteins of *Chlamydia* spp.; autotransporters beyond the Proteobacteria. *Trends Microbiol.* 9: 573-8.

**HERMANN C**, Graf K, Groh A y cols. 2002. Comparison of eleven commercial tests for *Chlamydia pneumoniae*-specific immunoglobulin G in asymptomatic healthy individuals. *J Clin Microbiol.* 40: 1603-9.

**HOLLAND SM**, Taylor H, Gaydos CA y cols. 1990. Experimental infection with *Chlamydia pneumoniae* in nonhuman primates. *Infect Immun.* 58: 593-7.

**HOLTJE JV**, Fiedler W, Rotering H y cols. 1988. Lysis induction of *Escherichia coli* by the cloned lysis protein of the phage MS2 depends on the presence of osmoregulatory membrane-derived oligosaccharides. *J Biol Chem.* 263: 3539-41.

**HUECK CJ**. 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62: 379-433.

**HUKKI-IMMONEN O**, Leinonen M y Saikku P. 1992. Diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* by microimmunofluorescence using Kajaani-6 (Local Epidemic) and TW-183 strains as antigens. En: *Second European Chlamydia Meeting*. Stockholm, EEUU.

**HYMAN CL**, Roblin PM, Gaydos CA y cols. 1995. Prevalence of asymptomatic nasopharyngeal carriage of *Chlamydia pneumoniae* in subjectively healthy adults: assessment by polymerase chain reaction-enzyme immunoassay and culture. *Clin Infect Dis.* 20: 1174-8.

**IJIMA Y**, Miyashita N, Kishimoto T y cols. 1994. Characterization of *Chlamydia pneumoniae* species-specific proteins immunodominant in humans. *J Clin*

*Microbiol.* 32: 583-8.

**INGALLS RR**, Rice PA, Qureshi N y cols. 1995. The inflammatory cytokine response to *Chlamydia trachomatis* infection is endotoxin mediated. *Infect Immun.* 63: 3125-30.

**JAQUETI J.** 2000. Procedimientos diagnósticos en las infecciones por *Chlamydia pneumoniae*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 18: 204-5.

**JONES RB** y Batteiger BE. 2000. Introduction to Chlamydial Diseases, p. 1986-9. En: Mandell GL, Bennett JE y Dolin R. (eds.) *Principles and Practice of Infectious Diseases 5<sup>th</sup> Ed.* Churchill Livingstone. New York, EEUU.

**JUVONEN J**, Juvonen T, Laurila A y cols. 1997. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in the walls of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 25: 499-505.

**KALAYOGLU M** y Byrne G. 1998. Induction of macrophage foam cell formation by *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis.* 177: 725-9.

**KALAYOGLU M**, Galvan C, Mahdi OS y cols. 2003. Serological association between *Chlamydia pneumoniae* infection and age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol.* 121: 478-82.

**KALAYOGLU M**, Indrawati V, Morrison RP y cols. 2000. Chlamydial virulence determinants in atherogenesis: The role of *chlamydial* lipopolysaccharide and heat shock protein 60 in macrophage-lipoprotein interactions. *J Infect Dis.* 18: 483-9.

**KALTENBOECK B**, Kousoulas KG y Storz J. 1993. Structures of and allelic diversity and relationships among the major outer membrane protein (*ompA*) genes of the four chlamydial species. *J Bacteriol.* 175: 487-502.

**KANAMOTO Y**, Iijima Y, Miyashita N y cols. 1993. Antigenic characterization of *Chlamydia pneumoniae* isolated in Hiroshima, Japan. *Microbiol Immunol.* 37: 495-8.

**KARIMI ST**, Schloemer RH y Wilde CE. 1989. Accumulation of chlamydial lipopolysaccharide antigen in the plasma membranes of infected cells. *Infect Immun.* 57: 1780-5.

**KAUKURANTA-TOLVANEN SS**, Laurila A, Liesirova L y cols. 1993. Experimental infection of *Chlamydia pneumoniae* in mice. *Microb Pathog.* 15: 293-302.

**KAUPPINEN M**, Kujala P, Leinonen M y cols. 1994. Clinical features of community-acquired *Chlamydia pneumoniae* pneumonia, p. 457-60. En: Orfila J, Byrne GI, Cherneskey A, Grayston JT, Jones JP, Ridgway GL, Saikku P, Schachter J, Stamm WE y Stephens RS. (eds.) *Chlamydial infections*. Societa Editrice Esculapio. Bolonia, Italia.

**KIDO Y**, Shirai M, Ouchi K y cols. 2001. Analysis of the serological response to *Chlamydia pneumoniae* in patients with ischemic heart disease by recombinant MOMP-ELISA. *J Infect Chemother.* 7: 180-5.

**KIKUTA L**, Puolakkainen M, Kuo CC y cols. 1991. Isolation and sequence analysis of the *Chlamydia pneumoniae GroEL* operon. *Infect Immun.* 59: 4665-9.

**KISHIMOTO T**, Kimura M, Kubota Y y cols. 1994. An outbreak of *C. pneumoniae* infection in households and schools, p. 465–68. En: Orfila J, Byrne GL, Cherneskey A, Grayston JT, Jones JP, Ridgway GL, Saikku P, Schachter J, Stamm WE y Stephens RS. (eds.) *Chlamydial infections. Societa Editrice Esculapio*. Bolonia, Italia.

**KOCKX M** y Herman G. 1988. Apoptosis in atherogenesis: implications for plaque destabilization. *Eur Heart J*. 19: 23-8.

**KOL A**, Bourcier T, Lichtman A y cols. 1999. *Chlamydia* and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J Clin Invest*. 103: 571-7.

**KOL A**, Sukhova GK, Lichtman AH y cols. 1998. Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase expression. *Circulation*. 98: 300-7.

**KORNAK JM**, Kuo CC y Campbell LA. 1991. Sequence analysis of the gene encoding the *Chlamydia pneumoniae* DnaK protein homolog. *Infect Immun*. 59: 721-5.

**KULLO I**, Edwards W y Schwartz R. 1998. Vulnerable plaque: pathobiology and clinical implications. *Ann Intern Med*. 129: 1050-60.

**KUO CC**, Chen HH, Wang SP y cols. 1986. Identification of a new group of *Chlamydia psittaci* strains called TWAR. *J Clin Microbiol*. 24: 1034-7.

**KUO CC**, Chi EY y Grayston JT. 1988a. Ultrastructural study of entry of *Chlamydia* strain TWAR into HeLa cells. *Infect Immun*. 56: 1668-72.

## *Chlamydophila pneumoniae*

---

**KUO CC**, Gown AM, Benditt EP y cols. 1993a. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain. *Arterioscler Thromb.* 13: 1501-4.

**KUO CC**, Grayston JT. 1988b. Factors affecting viability and growth in HeLa 229 cells of *Chlamydia* sp. strain TWAR. *J Clin Microbiol.* 26: 812-5.

**KUO C** y Grayston J. 1988c. In-vitro drug susceptibility of *Chlamydia* sp. Strain TWAR. *Antimicrob Agents Chemother.* 32: 257-8.

**KUO CC** y Grayston JT. 1990. Amino acid requirements for growth of *Chlamydia pneumoniae* in cell culture: growth enhancement by lysine or methionine depletion. *J Clin Microbiol.* 28: 1098-100.

**KUO CC**, Jackson LA, Campbell L y cols. 1995. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clin Microb Rev.* 4: 451-6.

**KUO CC**, Shor A, Campbell LA y cols. 1993b. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic lesions of coronary arteries. *J Infect Dis.* 167: 841-9.

**KUO CC**, Takahashi N, Swanson AF y cols. 1996. An N-linked high-mannose type oligosaccharide, expressed at the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*, mediates attachment and infectivity of the microorganism to HeLa cells. *J Clin Invest.* 98: 2813-08.

**KRULL M**, Klucken AC, Wuppermann FN y cols. 1999. Signal transduction pathways activated in endothelial cells following infection with *Chlamydia pneumoniae*. *J Immunol.* 162: 4834-41.

**KUTLIN A**, Tsumura N, Emre U y cols. 1997. Evaluation of *Chlamydia*

immunoglobulin M (IgM), Ig G, and Ig A ELISAs Medac for diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* infection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 4: 213-6.

**LABICHE R**, Koziol D, Quinn TC y cols. 2001. Presence of *Chlamydia pneumoniae* in human symptomatic and asymptomatic carotid atherosclerotic plaque. *Stroke.* 32: 855-60.

**LADANY S**, Black CM, Farshy CE y cols. 1989. Enzyme immunoassay to determine exposure to *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR). *J Clin Microbiol.* 27: 2778-83.

**LAMB DJ**, El-Sankary W y Ferns GA. 2003. Molecular mimicry in atherosclerosis: a role for heat shock proteins in immunisation. *Atherosclerosis.* 167: 177-85.

**LAURILA AL**, Anttila T y Laara E. 1997. Serological evidence of an association between *Chlamydia pneumoniae* infection and lung cancer. *Int J Cancer.* 74: 31-4.

**LEHTO S**, Niskanen L, Suhonen M y cols. 2002. Association between *Chlamydia pneumoniae* antibodies and intimal calcification in femoral arteries of nondiabetic patients. *Arch Intern Med.* 162: 594-9.

**LEINONEN M.** 1993. Pathogenetic mechanisms and epidemiology of *Chlamydia pneumoniae*. *Eur Heart J.* 14: 57-61.

**LENTSCHAT A**, El-Samalouti VT, Schletter J y cols. 1999. The internalization time course of a given lipopolysaccharide chemotype does not correspond to its activation kinetics in monocytes. *Infect Immun.* 67: 2515-21.

**LIN TM**, Chen WJ, Chen HY y cols. 2003. Increased incidence of cytomegalovirus but not *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic lesions of arteries of lower extremities from patients with diabetes mellitus undergoing amputation. *J Clin Pathol.* 56: 429-32.

**LINARES J**, Gutiérrez J, López C y cols. 2001. *Chlamydia pneumoniae* y enfermedad cerebrovascular. *Rev Neurol.* 32: 201-6.

**LINDQUIST EA** y Stephens RS. 1998. Transcriptional activity of a sequence variable protein family in *Chlamydia trachomatis*, p. 259-62. En: Stephens RS, Byrne GI, Christiansen G, Clarke IN, Grayston JT, Rank RG, Ridgway GL, Saikku P, Schachter J, y Stamm WE. (eds.) *Chlamydial Infections. Proceedings of the Ninth International Symposium on Human Chlamydial Infections*. International Chlamydia Symposium, San Francisco, EEUU.

**MAASS M** y Gieffers J. 1997. Cardiovascular disease risk from prior *Chlamydia pneumoniae* infection can be related to certain antigens recognized in the immunoblot profile. *J Infect.* 35: 171-6.

**MAASS M**, Bartels C, Kruger S y cols. 1998. Endovascular presence of *Chlamydia pneumoniae* DNA is a generalized phenomenon in atherosclerotic vascular disease. *Atherosclerosis.* 140: 25-30.

**MAEDA N**, Sawayama Y, Tatsukawa M y cols. 2003. Carotid artery lesions and atherosclerotic risk factors in Japanese hemodialysis patients. *Atherosclerosis.* 169: 183-92.

**MALINVERNI R.** 1996. The role of cytokines in chlamydial infections. *Infectious Diseases.* 9: 150-5.

**MALINVERNI R**, Kuo CC, Campbell LA y cols. 1995. Reactivation of *Chlamydia pneumoniae* lung infection in mice by cortisone. *J Infect Dis.* 172: 593-4.

**MANDELL GL**, Bennett JE, Dolin R. 2004. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th Edition. Churchill Livingstone. New York, EEUU.

**MARRIE TJ**, Marczy M, Mann OE y cols. 1990. Culture-negative endocarditis probably due to *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis.* 161: 127-9.

**MARTON A**, Ka'rolyi A, Szalka A. 1992. Prevalence of *Chlamydia pneumoniae* antibodies in Hungary. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 11: 139-42.

**MATSUMOTO A** y Manire GP. 1970. Electron microscopic observations on the effects of penicillin on the morphology of *Chlamydia psittaci*. *J Bacteriol.* 101: 278-85.

**MATTILA KJ**, Valtonan V, Nieminen MS y cols. 1998. Role of infection as a risk factor for atherosclerosis, myocardial infarction and stroke. *Clin Infect Dis.* 26: 719-34.

**MAYR M**, Metzler B, Kiechl S y cols. 1999. Endothelial cytotoxicity mediated by serum antibodies to heat shock proteins of *Escherichia coli* and *Chlamydia pneumoniae*. *Circulation.* 99: 1560-6.

**MAZZOLI S**, Tofani N, Fantini A y cols. 1998. *Chlamydia pneumoniae* antibody response in patients with acute myocardial infarction and their follow-up. *Am Heart J.* 135: 15-20.

**MELNICK SL**, Shahr E, Folsom AR y cols. 1993. Past infection by

## *Chlamydophila pneumoniae*

---

*Chlamydia pneumoniae* strain TWAR and asymptomatic carotid atherosclerosis. Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. *Am J Med.* 9: 499-504.

**MICHEL D**, Antoine JC, Pozzetto B y cols. 1992. Lumbosacral meningoradiculitis associated with *Chlamydia pneumoniae* infection. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 55: 511.

**MILLER ST**, Hammerschlag MR y Chirgwin K. 1991. Role of *Chlamydia pneumoniae* in acute chest syndrome of sickle cell disease. *J Pediatr.* 118: 30-3.

**MITOV I**, Haralambieva I, Petrov D y cols. 2003. Cross-reactive monoclonal antibodies raised against the lipopolysaccharide antigen of *Salmonella minnesota* RE chemotype: diagnostic relevance. *Diagn Microb Infect Dis.* 45: 225-31.

**MIYASHITA N**, Kanamoto Y y Matsumoto A. 1993. The morphology of *Chlamydia pneumoniae*. *J Med Microbiol.* 38: 418-25.

**MOAZED TC**, Grayston JT y Campbell LA. 1994. A rabbit model of *Chlamydia pneumoniae* infection, abstr. B-214, p. 66. En: *Abstracts of the 94th General Meeting of the American Society for Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, EEUU.

**MONTES M** y Cilla G. 1992. High prevalence of *Chlamydia pneumoniae* infection in children and young adults in Spain. *Pediatr Infect Dis J.* 11: 972-3.

**MONTIGIANI S**, Falugi F, Scarselli M y cols. 2002. Genomic approach for analysis of surface proteins in *Chlamydia pneumoniae*. *Infect Immun.* 70: 368-79.

**MORDHORST CH**, Wang SP y Grayston JT. 1994. Transmission of

*C.pneumoniae* (TWAR), p. 488–91. En Orfila J, Byrne GL, Cherneskey A, Grayston JT, Jones JP, Ridgway GL, Saikku P, Schachter J, Stamm WE y Stephens RS. (eds.) *Chlamydial infections*. Societa Editrice Esculapio. Bologna, Italia.

**MULLER J**, Moller DS, Kjaer M y cols. 2003. *Chlamydia pneumoniae* DNA in peripheral blood mononuclear cells in healthy control subjects and patients with diabetes mellitus, acute coronary syndrome, stroke, and arterial hypertension. *Scand J Infect Dis*. 35: 704-12.

**MYGIND P**, Christiansen G, Persson K y cols. 1998. Analysis of the humoral immune response to *Chlamydia* outer membrane protein 2. *Clin Diagn Lab Immunol*. 5: 313-8.

**NASCET: NORTH AMERICAN SYMPTOMATIC CAROTID ENDARTERECTOMY TRIAL INVESTIGATORS**. 1991. Clinical alert: benefit of carotid endarterectomy for patients with high-grade stenosis of the internal carotid artery. National Institute of Neurological Disorders and Stroke and Trauma Division. *Stroke*. 22: 816-7.

**NGEH J**, Anand V y Gupta S. 2002. *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis -- what we know and what we don't. *Clin Microbiol Infect*. 8: 2-13.

**NEUREITER D**, Heuschmann P, Stintzing S y cols. 2003. Detection of *Chlamydia pneumoniae* but not of *Helicobacter pylori* in symptomatic atherosclerotic carotids associated with enhanced serum antibodies, inflammation and apoptosis rate. *Atherosclerosis*. 168: 153-62.

**NEWHALL WJ**. 1987. Biosynthesis and disulfide cross-linking of outer membrane components during the growth cycle of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun*. 55: 162-8.

**NIESSNER A**, Kaun C, Zorn G y cols. 2003. Polymorphic Membrane Protein (PMP) 20 and PMP 21 of *Chlamydia pneumoniae* Induce Proinflammatory Mediators in Human Endothelial Cells In Vitro by Activation of the Nuclear Factor- $\kappa$ B Pathway. *J Infect Dis.* 188: 108-13.

**OGAWA H**, Hashiguchi K y Kazuyama Y. 1992. Recovery of *Chlamydia pneumoniae* in six patients with otitis media and effusion. *J Laryngol Otol.* 106: 490-2.

**ONG G**, Coyle PV, Barros D'Sa AA y cols. 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: 12.

**ONG G**, Thomas BJ, Mansfield AO y cols. 1996. Detection and widespread distribution of *Chlamydia pneumoniae* in the vascular system and its possible implications. *J Clin Pathol.* 49: 102-6.

**OSSEWAARDE JM.** 2001. Introducing *Chlamydophila pneumoniae*: the TWAR agent *Chlamydia pneumoniae* in a new perspective. *Neth J Med.* 59: 41-4.

**OUCHI K**, Fujii B, Kudo S y cols. 2000. *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic and nonatherosclerotic tissue. *J Infect Dis.* 181: 441-3.

**PÉREZ MELGOSA M**, Kuo CC y Campbell LA. 1993. Outer membrane complex proteins of *Chlamydia pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett.* 112: 199-204.

**PERSSON K** y Peykani A. 1998. Polymeric but not monomeric MOMP reacts with many monoclonal antibodies to *Chlamydia pneumoniae*, p. 279-82. En: Stephens RS, Byrne GI, Christiansen G, Clarke IN, Grayston JT, Rank RG, Ridgway

GL, Saikku P, Schachter J, Stamm WE. (Eds.) *Chlamydial Infections. Proceedings of the 9th International Symposium on Human Chlamydial Infections*, Napa, EEUU.

**PETERSON EM**, de la Maza LM, Brade L y cols. 1998. Characterization of a neutralizing monoclonal antibody directed at the lipopolysaccharide of *Chlamydia pneumoniae*. *Infect Immun.* 66: 3848-55.

**PORTER JM** y Moneta GL. 1995. International Consensus Committee on Chronic Venous Disease. Reporting standards in venous disease: an update. *J Vasc Surg.* 21: 635-45.

**PUOLAKKAINEN M**, Kuo CC, Shor A y cols. 1993. Serological response to *Chlamydia pneumoniae* in adults with coronary arterial fatty streaks and fibrolipid plaques. *J Clin Microbiol.* 31: 2212-4.

**PUOLAKKAINEN M**, Parker J, Kuo CC y cols. 1994. Characterization of a *Chlamydia pneumoniae* epitope recognized by species specific monoclonal antibodies, p. 185–8. En Orfila J, Byrne GL, Cherneskey A, Grayston JT, Jones JP, Ridgway GL, Saikku P, Schachter J, Stamm WE y Stephens RS. (eds.) *Chlamydial infections. Societa Editrice Esculapio*, Bolonia, Italia.

**RAMOS PM**, Ortega F, Samaniego J y cols. 1999. Electron microscopy, *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *Med Clin.* 112: 277-8.

**RASSU M**, Cazzavillan S, Scagnelli M y cols. 2001. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic arteries from various vascular regions. *Atherosclerosis.* 158: 73-9.

**ROBLIN PM**, Dumornay W, Emre U y cols. 1994a. Serological response to *Chlamydia pneumoniae* infection in children, abstr. G-40, p. 43. En: *Program and*

abstracts of the 34th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, Washington, EEUU.

**ROBLIN PM**, Dumornay W y Hammerschlag MR. 1992. Use of HEp-2 cells for improved isolation and passage of *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 30: 1968-71.

**ROBLIN PM**, Montalban G y Hammerschlag MR. 1994b. Susceptibilities of isolates of *Chlamydia pneumoniae* from children with pneumonia: relationship to clinical and microbiologic response, p. 469–72. En Orfila J, Byrne GL, Cherneskey A, Grayston JT, Jones JP, Ridgway GL, Saikku P, Schachter J, Stamm WE y Stephens RS. (eds.) *Chlamydial infections*. Societa Editrice Esculapio. Bolonia, Italia

**ROCKEY DD** y Matsumoto A. 1999. The chlamydial developmental cycle. p. 403-25. En: Brun YV y Shimkets LJ. (eds.) *Prokaryotic Development*. Washington, EEUU.

**ROCKEY DD**, Viratyosin W, Bannantine JP y cols. 2002. Diversity within inc genes of clinical *Chlamydia trachomatis* variant isolates that occupy non-fusogenic inclusions. *Microbiology.* 148: 2497-505.

**ROSE AG**. 2002. Failure to detect *Chlamydia pneumoniae* in senile calcific aortic stenosis or calcified congenital bicuspid aortic valve by immunofluorescence, polymerase chain reaction and electron microscopy. *Cardiovasc Pathol.* 11: 300-4.

**ROSS R**. 1999. Atherosclerosis-An inflammatory disease. *N England J Med.* 340: 115-26.

**SAIKKU P**. 2000. *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerosis. *J Intern Med.*

247: 391-6.

**SAIKKU P**, Ruutu P, Leinonen M y cols. 1988. Acute lower-respiratory-tract infection associated with *chlamydial* TWAR antibody in Filipino children. *J Infect Dis.* 158: 1095-107.

**SAIKKU P**, Wang SP, Kleemola M y cols. 1985. An epidemic of mild pneumonia due to an unusual strain of *Chlamydia psittaci*. *J Infect Dis.* 151: 832-9.

**SAKASH JB**, Byrne GI, Lichtman A y cols. 2002. Cytokines induce indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human atheroma-associated cells; Implications for persistent *Chlamydia pneumoniae* Infection. *Infection and Immunity.* 7: 3959-61.

**SCHACHTER H** y Brockhausen I. 1992. The biosynthesis of serine (threonine)-N-acetylgalactosamine-linked carbohydrate moieties, p. 263–332. En Allen HJ y Kisailus EC. (eds.) *In Glycoconjugates Composition, Structure and Function*. Marcel Dekker. Nueva York, EEUU.

**SESSA R**, Di Pietro M, Schiavoni G y cols. 2003. *Chlamydia pneumoniae* DNA in patients with symptomatic carotid atherosclerotic disease. *J Vasc Surg.* 37: 1027-31.

**SHAPIRO AL**, Vinuela E y Maizel JV. 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun.* 28: 815-20.

**SHI Y** y Tokunaga O. 2002. *Chlamydia pneumoniae* and multiple infections in the aorta contribute to atherosclerosis. *Pathol Int.* 52: 755-63.

**SHIRAI M**, Hirakawa H, Ouchi K y cols. 2000. Comparison of outer membrane protein genes *omp* and *pmp* in the whole genome sequences of *Chlamydia pneumoniae* isolates from Japan and the United States. *J Infect Dis.* 181: 524-7.

**SOURIAU A**, Salinas J, De Sa C y cols. 1994. Identification of subspecies- and serotype 1-specific epitopes on the 80- to 90-kilodalton protein region of *Chlamydia psittaci* that may be useful for diagnosis of chlamydial induced abortion. *Am J Vet Res.* 55: 510-604.

**STEPHENS RS.** 2003. The cellular paradigm of chlamydial pathogenesis. *Trends Microbiol.* 11: 44-51.

**STEPHENS RS**, Kalman S, Lammel C y cols. 1998. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science.* 282: 754-9.

**STEPHENS RS** y Lammel CJ. 2001. *Chlamydia* outer membrane protein discovery using genomics. *Curr Opin Microbiol.* 4: 16-20.

**STOREY C**, Lusher M, Yates P y cols. 1993. Evidence for *Chlamydia pneumoniae* of non-human origin. *J Gen Bacteriol.* 139: 2621-6.

**STRATTON WC** y Mitchel MW. 1997a. The pathogenesis of Systemic *Chlamydial* Infections: Theoretical Considerations of Host Cell Energy Depletion and Its Metabolic consequences. *AIDIEX.* 16: 33-40.

**STRATTON WC** y Mitchel MW. 1997b. The Immunopathology of Chlamydial Infections. *AIDIEX.* 16: 89-94.

**STRATTON WC.** 1998. The Role of *Chlamydia* in Connective Tissue Diseases. *AIDIEX.* 17: 9-16.

**STROHMAIER H**, Remler P, Renner W y cols. 1995 . Expression of genes *kdsA* and *kdsB* involved in 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid metabolism and biosynthesis of enterobacterial lipopolysaccharide is growth phase regulated primarily at the transcriptional level in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 177: 4488-500.

**SUBTIL A**, Parsot C y Dautry-Varsat A. 2001. Secretion of predicted Inc proteins of *Chlamydia pneumoniae* by a heterologous type III machinery. *Mol Microbiol.* 39: 792-800.

**SUMMERSGILL JT**, Molestina RE, Miller RD y cols. 2000. Interactions of *Chlamydia pneumoniae* with human endothelial cells. *J Infect Dis.* 181: 479–82.

**SUMMERSGILL JT**, Sahney NN, Gaydos CA y cols. 1995. Inhibition of *Chlamydia pneumoniae* growth in HEP-2 cells pretreated with gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun.* 63: 2801-3.

**SUMPTER M** y Dunn M. 1997. Is coronary artery disease an infectious disease?. *Chest.* 112: 302-3.

**SUNDELOF B**, Gnarpe H y Gnarpe J. 1993. An unusual manifestation of *Chlamydia pneumoniae* infection: meningitis, hepatitis, iritis and atypical erythema nodosum. *Scand J Infect Dis.* 25: 259-61.

**SUZUKI H**, Kurihara Y, Takeya M y cols. 1997. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature.* 386: 292-5.

**SWANSON F** y Kuo CC. 1996. The 18-kda lectin-binding protein of

## *Chlamydophila pneumoniae*

---

*Chlamydia trachomatis* is different from the 18-kda histone-like protein. *FEMS Microbiol Lett.* 137: 189-92.

**TANNE D**, Haim M, Boyko V y cols. 2003. Prospective study of *Chlamydia pneumoniae* IgG and IgA seropositivity and risk of incident ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis.* 16: 166-70.

**TARNACKA MD**, Gromadzka MS, Czlonkwska MD y cols. 2002. Increased circulating immune complexes in acute stroke. The Triggering role of *Chlamydia pneumoniae* and cytomegalovirus. *Stroke.* 33: 936-40.

**TAYLOR HR**, Maclean IW, Brunham RC y cols. 1990. Chlamydial heat shock proteins and trachoma. *Infect Immun.* 58: 3061-3.

**TAYLOR-ROBINSON D**, Thomas BJ, Goldin R y cols. 2002. *Chlamydia pneumoniae* in infrequently examined blood vessels. *J Clin Pathol.* 55: 218-20.

**THEUNISSEN HJ**, Lemmens-den Toom NA, Burggraaf A y cols. 1993. Influence of temperature and relative humidity on the survival of *Chlamydia pneumoniae* in aerosols. *Appl Environ Microbiol.* 59: 2589-93.

**THEUNISSEN JJ**, van Heijst BY, Wagenvoort JH y cols. 1992. Factors influencing the infectivity of *Chlamydia pneumoniae* elementary bodies on HL cells. *J Clin Microbiol.* 30: 1388-91.

**THOM DH**, Grayston JT, Campbell LA y cols. 1994. Respiratory infection with *Chlamydia pneumoniae* in middle-aged and older adult outpatients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 13: 785-92.

**TOH H**, Miura K, Shirai M y cols. 2003. In silico inference of inclusion

membrane protein family in obligate intracellular parasites chlamydiae. *DNA Res.* 10: 9-17.

**TONG CY** y Sillis M. 1993. Detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia psittaci* in sputum samples by PCR. *J Clin Pathol.* 46: 313-7.

**TSANG VC**, Peralta JM y Simons AR. 1983. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* 92: 377-91.

**VANDAHL BB**, Birkelund S y Christiansen G. 2002a. Proteome analysis of *Chlamydia pneumoniae*. *Methods Enzymol.* 358: 277-88.

**VANDAHL BB**, Birkelund S y Christiansen G. 2004. Genome and proteome analysis of *Chlamydia*. *Proteomics.* 4: 2831-42.

**VANDAHL BB**, Birkelund S, Demol H y cols. 2001a. Proteome analysis of the *Chlamydia pneumoniae* elementary body. *Electrophoresis.* 22: 1204-23.

**VANDAHL BB**, Gevaert K, Demol H y cols. 2001b. Time-dependent expression and processing of a hypothetical protein of possible importance for regulation of the *Chlamydia pneumoniae* developmental cycle. *Electrophoresis.* 22: 1697-704.

**VANDAHL BB**, Pedersen AS, Gevaert K y cols. 2002b. The expression, processing and localization of polymorphic membrane proteins in *Chlamydia pneumoniae* strain CWL029. *BMC Microbiol.* 2: 36.

**VAN DER VEN AJ**, Hommels MJ, Kroon AA y cols. 2002. *Chlamydia*

## *Chlamydophila pneumoniae*

---

*pneumoniae* seropositivity and systemic and renovascular atherosclerotic disease. *Arch Intern Med.* 162: 786-90.

**VÉCSEI PV**, Kircher K, Reitner A y cols. 2002a. *Chlamydia pneumoniae* in central retinal artery occlusion. *Acta Ophthalmol Scand.* 80: 656-9.

**VÉCSEI PV**, Kircher K, Reitner A y cols. 2002b. *Chlamydia* in anterior ischemic optic neuropathy. *Ophthalmologica.* 216: 215-20.

**VEHMAAN-KREULA P**, Puolakkainen M, Sarvas M y cols. 2001. *Chlamydia pneumoniae* proteins induce secretion of the 92-kDa gelatinase by human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21: 1-8.

**VERKOOYEN RP**, Hazenberg MA, Van Haasen GH y cols. 1992. Age-related interferences with *Chlamydia pneumoniae* microimmunofluorescence serology due to circulating rheumatoid factor. *J Clin Microbiol.* 30: 1289-90.

**VIROK D**, Kis Z, Karai L y cols. 2001. *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic middle cerebral artery. *Stroke.* 32: 1973-6.

**WANG SP** y Grayston JT. 1990. Population prevalence antibody to *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR, p. 402-5. En: Bowie WR, Caldwell HD, Jones RP, Mårdh PA, Ridgway GL, Schachter J, Stamm WE, y Ward ME. (eds.) *Chlamydial infections*. Cambridge, Reino Unido.

**WANG SP** y Grayston JT. 1994. The similarity of *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) isolates as antigen in the microimmunofluorescence (MIF) test, p. 181-4. En: Orfila J, Byrne GL, Cherneskey A, Grayston JT, Jones JP, Ridgway GL, Saikku P, Schachter J, Stamm WE y Stephens RS. (eds.) *Chlamydial infections*. Societa Editrice Esculapio. Bolonia, Italia.

**WATSON MW**, Lambden PR y Clarke IL. 1991. Genetic diversity and identification of human infection by amplification of the chlamydial 60-kilodalton cysteine-rich outer membrane protein gene. *J Clin Microbiol.* 29: 1188-93.

**WELSH LE**, Gaydos CA y Quinn TC. 1992. In vitro evaluation of azithromycin, erythromycin, and tetracycline against *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 36: 292-3.

**WIEDMANN-AL-AHMAD M**, Schuessler P y Freidank H. 1997. Reactions of polyclonal and neutralizing anti-p54 monoclonal antibodies with an isolated, species-specific 54 kilodalton protein of *Chlamydia pneumoniae*. *Clin Diag Lab Immunol.* 4: 700-4.

**WIMMER ML**, Sandmann-Strupp R, Saikku P y cols. 1996. Association of chlamydial infection with cerebrovascular disease. *Stroke.* 27: 2207-10.

**WISSLER RW**. 1991. USA multicenter study of the pathobiology of atherosclerosis in youth. *Ann N Y Acad Sci.* 6223: 26-39.

**WOLF SC**, Mayer O, Jurgens S y cols. 2003. *Chlamydia pneumoniae* IgA seropositivity is associated with increased risk for atherosclerotic vascular disease, myocardial infarction and stroke in dialysis patients. *Clin Nephrol.* 59: 273-9.

**WONG KH**, Skelton SK y Chan YK. 1992. Efficient culture of *Chlamydia pneumoniae* with cell lines derived from the human respiratory tract. *J Clin Microbiol.* 30: 1625-30.

**WWW.stdgen.lanl.gov.**

**WYLLIE S**, Ashley RH, Longbottom D y cols. 1998. The major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* functions as a porin-like ion channel. *Infect Immun.* 66: 5202-7.

**YANG ZP**, Kuo CC y Grayston JT. 1993. A mouse model of *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR pneumonitis. *Infect Immun.* 61: 2037-40.

**YANG ZP**, Kuo CC y Grayston JT. 1995. Systemic dissemination of *Chlamydia pneumoniae* following intranasal inoculation in mice. *J Infect Dis.* 171: 736-8.

**YOUNG K**, Silver L, Bramhill D y cols. 1995. The envA permeability /cell division gene of *Escherichia coli* encodes the second enzyme of Lipid A biosynthesis UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-n-acetylglucosamine deacetylase. *American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.* 51: 30384-91.

**YUAN Y**, Zhang YX, Watkins NG y cols. 1989. Nucleotide and deduced amino acid sequences for the four variable domains of the major outer membrane proteins of the 15 *Chlamydia trachomatis* serovars. *Infect Immun.* 57: 1040-9.

**ZHANG YX**, Morrison SG, Caldwell HD y cols. 1989. Cloning and sequence analysis of the major outer membrane protein genes of two *Chlamydia* strains. *Infect Immun.* 57: 1621-25.

