

ORIGINALES

Descripción de inmunógenos de *Chlamydia pneumoniae* reconocidos por el suero de sujetos con enfermedad arterial periférica



José Gutiérrez^a, José Linares^{b,c}, Ana Camacho^d, Matilde Palanca^a, Carmen Maroto^a, Eduardo Ros^{b,c}, Juan de Dios Luna^e, María José Soto^a y Antonio Sorlózano^a

^aDepartamento de Microbiología. Universidad de Granada. Granada.

^bDepartamento de Cirugía. Universidad de Granada. Granada.

^cServicio de Cirugía. Hospital Universitario San Cecilio. Granada.

^dDepartamento de Estadística. Universidad de Granada. Granada.

^eLaboratorio Vircell. Granada. España.

FUNDAMENTO Y OBJETIVO: Se estudian, en sujetos con enfermedad arterial periférica, los tipos de anticuerpos frente a *Chlamydia pneumoniae* y su relación con la presencia de la bacteria.

PACIENTES Y MÉTODO: Se ha realizado un estudio en 68 casos y 50 controles en los que se investiga en suero las inmunoglobulinas (Ig G y A frente a *C. pneumoniae* mediante Western-blot (comercial y no comercial), enzimoimmunoanálisis y microimmunofluorescencia (MIF), así como el ADN de la bacteria en biopsia de tejido vascular mediante reacción en cadena de la polimerasa.

RESULTADOS: Mediante 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 con la presencia de ADN de *C. pneumoniae*; así como de IgA antilipopolisacárido, anti-92 kDa y anti-Hsp60 kDa, que se relacionaron con la presencia de ADN. Mediante Western-blot no comercial destacó la presencia significativa, en los casos, de las bandas de 128,8 y 9,2 kDa para la IgG, que se asoció con la existencia de ADN; también se detectaron en los casos bandas de IgG de 70,8, 58,9, 47,9, 47,5, 18,4, 12,1, 10,6, 8,1 y 7,6 kDa; asimismo se detectó ADN cuando se observaron las bandas de 54,6 y 1,1 kDa de IgG, y las bandas de 79,4, 50,1 y 18,4 kDa de IgA.

CONCLUSIONES: En los sujetos con enfermedad arterial periférica se encontró una respuesta serológica, mediante Western-blot, más importante frente a determinadas proteínas de la bacteria. Esto podría reflejar una fase inicial con presencia de ADN e IgG específica. Posteriormente, aun en ausencia de la bacteria, podría existir una enfermedad inmunomediada con presencia de IgA e IgG.

Palabras clave: Enfermedad arterial periférica. *Chlamydia pneumoniae*. Anticuerpo. ADN.

Description of immunogens of *Chlamydia pneumoniae* recognized by serum of individuals with peripheral artery disease

BACKGROUND AND OBJECTIVE: The relationship between antibodies to *C. pneumoniae* and presence of the bacteria was studied in individuals with peripheral arterial disease.

PATIENTS AND METHOD: An observational analytical, case-control study was performed in 118 patients (68 cases, 50 controls) to investigate immunoglobulin (Ig G and A against *C. pneumoniae* in serum, using Western-blot (commercial and no commercial methods), ELISA and MIF; DNA of the bacteria in vascular tissue biopsy specimens was studied by polymerase chain reaction.

RESULTS: Using commercial Western-blot, significant presence of IgG anti-39 kDa and anti-54 kDa was found in cases and was related to MIF results and *C. pneumoniae* DNA findings; IgA anti-LPS, anti-92 kDa and anti-Hsp60 kDa were also found and related to DNA presence. Using no commercial Western-blot, significant presence of 128.8 and 9.2 kDa bands for IgG was detected in cases and associated with DNA presence; 70.8, 58.9, 47.9, 47.5, 18.4, 12.1, 10.6, 8.1, and 7.6 kDa bands for IgG were found in cases; and DNA was present when 54.6 and 1.1 kDa bands for IgG and 79.4, 50.1, and 18.4 kDa bands for IgA were also detected.

CONCLUSIONS: Using Western-blot, a greater serologic response was found against certain proteins of the bacteria in individuals with peripheral arterial disease. This may reflect an initial stage with presence of DNA and specific IgG. Subsequently, even in absence of the bacteria, an immunomediated disease may develop with presence of IgA and IgG.

Key words: Peripheral arterial disease. *Chlamydia pneumoniae*. Antibody. DNA.

Estudio financiado en parte con las ayudas procedentes de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía (grupo de investigación CTS 521 para el «Estudio de los agentes infecciosos relacionados con procesos clínicos de causa desconocida») y la Universidad de Granada (proyecto «Detección de *Chlamydia pneumoniae* en la arteriopatía periférica. El papel del leucocito»).

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

Recibido el 27-6-2005; aceptado para su publicación el 11-10-2005.

Los factores de riesgo clásicos para la arteriosclerosis sólo explican el 60% de los casos. Nuevos agentes, tales como *Chlamydia pneumoniae*, se han asociado con la enfermedad. Hasta la fecha se ha investigado de forma importante la posible relación entre la arteriosclerosis, fundamentalmente localizada en las arterias coronarias, y la infección por *C. pneumoniae*¹⁻³. Sin embargo, son menos numerosos los estudios en sujetos con enfermedad arterial periférica (EAP). Con esta distinción se ha querido diferenciar este proceso de la enfermedad coronaria, ya que, en primer lugar, parece que la enfermedad coronaria y la periférica son procesos con una patogenia diferente y, en segundo lugar, se han realizado pocos estudios hasta la fecha, bien caracterizados, sobre la EAP que analicen esta relación⁴. Respecto de la patogenia de la arteriosclerosis, podemos decir que la EAP comparte cualitativamente muchos de los factores de riesgo con la enfermedad coronaria para la aparición de la placa de ateroma. Sin embargo, la frecuencia de presentación de aquéllos es diferente⁵. Acerca de la asociación entre la EAP y la infección por esta bacteria se han publicado algo más de 40 estudios⁶⁻⁴⁸, caracterizados por contar con un grupo de casos y controles y métodos analíticos bien definidos, en los que se analiza, mediante alguna prueba independiente, esta relación. De éstos, se puede concluir que existe, de forma estadísticamente significativa⁴, una asociación cuando se utilizan pruebas inmunohistoquímicas⁹, de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada en biopsias de arterias⁴³, estudios de PCR en muestras no arteriales⁷, pruebas de enzimoimmunoanálisis²⁶, microimmunofluorescencia (MIF) para detectar títulos altos de inmunoglobulina (Ig G e IgA³⁸, y otros métodos directos de detección de la bacteria diferentes de los anteriores³⁵. Sin embargo, no se ha encontrado asociación cuando se ha empleado la PCR simple en biopsias arteriales³⁷, en las pruebas de MIF que detectan IgG en concentraciones bajas¹¹ o IgM²³, y en los estudios de enzimoimmunoanálisis para detectar IgM^{44,45}.

Según lo anterior, el hallazgo de la asociación entre la EAP y la infección por *C. pneumoniae* depende del método empleado en estos trabajos. La mayoría establece una relación con una probabilidad variable, pero no se encuentra esta relación con los métodos de PCR menos sensibles y la presencia de IgM antibacteriana, lo que parecería lógico, ya que la EAP hay que entenderla como una enfermedad crónica. En relación con la detección del ADN de *C. pneumoniae*, en la mayor parte de los estudios publicados sólo se informa de las regiones amplificadas, que han sido muy diferentes, pero no del método de extracción del ADN y de la sensibilidad de la prueba empleada⁴. Esto puede explicar las discrepancias de los resultados obtenidos en los estudios, ya que los métodos han sido muy diferentes.

Por lo tanto, a nuestro entender, para obtener una conclusión definitiva todavía falta en la bibliografía 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, en un mismo sujeto y muestra, relacionando los resultados entre ellos y con la actividad de la enfermedad. Destacamos el WB dado que las pruebas de MIF y enzimo-inmunoanálisis sólo permiten realizar un análisis global de los anticuerpos sintetizados, pero no indican frente a qué antígenos se sintetizan. Finalmente, no existen estudios, hasta la fecha, que se basen en las pruebas de WB. Sin embargo, su uso en estos enfermos permitiría saber más acerca de los anticuerpos y quizá 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 anticuerpos frente a *C. pneumoniae* en sujetos con EAP y se analiza su relación con la enfermedad y la presencia de la bacteria.

Pacientes y método

Las características de la población estudiada ya se han publicado⁴⁹. En el momento de su selección todos carecían de IgG (< 1/8) anti-*Chlamydia trachomatis*. Los casos estuvieron representados por 68 pacientes. A partir de ellos se obtuvieron muestras de suero y tejido arterial arteriosclerótico. Los controles estuvieron representados por 50 sujetos con insuficiencia venosa crónica superficial, tributaria de cirugía de resección de varices. En el curso de la cirugía de varices se obtuvo 1 cm de la arteria pudenda externa y una muestra de suero. Se consideraron en el estudio los siguientes datos analíticos y clínicos: sexo, exposición al tabaco, obesidad (superior al 30% del peso teórico), presión arterial sistólica, hipertensión y valores de colesterol y de triglicéridos. Los fumadores actuales y los ex fumadores que habían fumado durante más de 10 años se consideraron expuestos al tabaco. Se realizó un estudio doble ciego. En todos los sujetos se determinaron la IgG anticuerpo elemental (CE) mediante MIF⁴⁹ y la IgG e IgA anti-CE y antilipopolisacárido (anti-LPS) mediante enzimo-inmunoanálisis⁴⁹ y

WB. La investigación del ADN de *C. pneumoniae* se realizó mediante PCR en las biopsias vasculares de los casos y controles⁴⁹. La sensibilidad de esta prueba fue de 2 copias del fragmento *psfI* de la bacteria.

Western-blot comercial

Se usó una prueba comercial (*Chlamydia pneumoniae* IgG+IgA Immunoblot, AID GmbH, Alemania) según las instrucciones del fabricante. En el caso de la IgA, la muestra se diluyó con anti-IgG (DadeBehring Diagnostics Inc., Alemania). La lectura fue objetiva y automatizada mediante un escáner que comparó los resultados obtenidos con un patrón de referencia. Esta prueba detectó cualitativamente la presencia de anticuerpos frente a los antígenos LPS (de 3 pesos moleculares diferentes) y proteínas de 35, 39 (MOMP), 48, 54, 60, 90, 92 y 98 kDa.

Western-blot no comercial

Para la preparación del antígeno se usó la cepa 1.360 de *C. pneumoniae* crecida en células Hep-2⁵⁰. Posteriormente se obtuvieron los CE, que se purificaron⁵¹. Éstos se resuspendieron en tampón de lisis al 16% (w/v) (SDS: 1%; DL-ditiotreitol [DTT]: 0,2 mmol; urea: 3 mol; fosfato sódico: 100 mmol; Tris-HCl: 50 mmol; pH: 7,5) con 0,5 mol de NaCl e inhibidores de las proteasas (1x). Las células se lisaron por sonicación y se hirvieron durante 10 min. Posteriormente, para establecer el volumen correcto del extracto que se utilizó en los WB, se cargaron varios volúmenes del lisado en un gel de cromatografía de SDS-PAGE (15%). Se usaron los siguientes estándares proteicos en la cromatografía teñida con Coomassie: fosforilasa b (97 kDa), albúmina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de la tripsina (20,1 kDa) y alfaalcoalbumina (14,4 kDa). Para la realización del WB se cargaron 10 µl del extracto lisado en cada pocillo del gel SDS-PAGE y luego se trasladaron a una membrana de nitrocelulosa (0,2 mm) mediante la Unidad Bio-Rad Mini Trans Blot, tras lo cual la nitrocelulosa se tiñó con rojo Ponceau para poder cortar las tiras antigénicas. Éstas se bloquearon mediante PBS (KCl: 2,6 mmol; NaCl: 0,14 mol; Na₂HPO₄: 10 mmol; H₂KPO₄: 1,2 mmol; pH: 7,2) con Tween 20 (0,1%) y leche desnatada (5%), durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó cada tira durante 1 h con el correspondiente suero (diluido 1/50 en solución de lavado), en agitación y a temperatura ambiente. Estas tiras se lavaron en 5 ocasiones (PBS y Tween 20) y posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario apropiado, anti-IgG o anti-IgA de conejo (diluido 1/2.000 en solución de lavado) marcado con peroxidasa de rábano, durante 1 h. Para visualizar la reacción se usó un sustrato de TMB/H₂O₂ durante 2 min, vigilando la aparición de las bandas y el ruido de fondo. La reacción se interrumpió con agua destilada. El peso molecular de cada una de las bandas observadas se estimó a través del cálculo de su movilidad relativa mediante una curva de calibración previamente confeccionada a partir de las proteínas patrones, que fueron corridas en las electroforesis en iguales condiciones que los antígenos de *C. pneumoniae* y cuyos pesos moleculares se transformaron en logaritmos y se representaron gráficamente frente a su

respectiva movilidad relativa mediante un tratamiento de correlación lineal simple ($r^2 = 0,98$).

Enzimas y reactivos. Para los detalles técnicos se puede acceder en Internet al contenido completo de la prueba en: <http://adrasitea.ugr.es/search?spi/apalanca/apalanca/1%2C8%2C12%2CB/856&FF=apalanca+gimenez+matilde+maria&1%2C1%2C%2C1%2C0>. La acrilamida ultrapura/bisacrilamida (ratio 29:1, solución al 40%), DTT, solución de Ponceau S, Tween-20 y cicloheximida se obtuvieron de SIGMA (St. Louis, MO, EE.UU.); el dodecilsulfato sódico de Fluka (Munich, Alemania); Optitran BA-S 83 reinforced nitrocellulose de Schleicher & Schuell (Keene, NH, EE.UU.); el TMB blotting plus de Kem-En-Tec Diagnostics (Copenhague, Dinamarca). Los marcadores de peso molecular usados para el WB se obtuvieron de Bio-Rad (Hercules, CA, EE.UU.) y los marcadores usados para el SDS-PAGE y la tinción de Coomassie de Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, EE.UU.). Los conjugados de conejos anti-IgG y anti-IgA procedieron de DAKO (Glostrup, Dinamarca) y Trizma Base de MP Biomedicals (Irvine, CA, EE.UU.). El cóctel de inhibidores de las proteasas se obtuvo de Roche (Indianapolis, IN, EE.UU.), el medio RPMI de Bio-Whittaker (Baltimore, MD, EE.UU.) y FBS de Kraeber (Ellerbek, Alemania). Todos los reactivos se usaron según las recomendaciones del fabricante.

Análisis estadístico

La hipótesis nula de este estudio estuvo representada por la demostración de que la infección por *C. pneumoniae* no se relacionaba con la presencia de la EAP. El tratamiento estadístico se llevó a cabo mediante el programa SPSS, versión 11.5.1 (SPSS Inc., 1989-2002). El análisis de regresión logística exacta para conocer la participación de la bacteria en la presencia de la placa de ateroma se realizó mediante el programa LogXact (Civile Software Corporation, versión 2.1, 1996). La prueba de Hosmer-Lemeshow se usó para ajustar el modelo. La comparación de las variables continuas entre enfermos y controles se realizó mediante la prueba de la t de Student. Las variables discretas se analizaron mediante la prueba de Fisher bilateral exacta y de la χ^2 . La relación entre variables se estableció mediante la prueba de correlación R de Pearson y la concordancia con el índice kappa.

Resultados

A partir de 118 sujetos se obtuvieron muestras adecuadas para el análisis microbiológico, salvo en 12 casos y 2 controles, en los que, por agotamiento de las muestras, no se pudo realizar el WB no comercial. En la tabla 1 se reflejan las características de la población. Para diferenciar la participación de la infección del resto de los parámetros descritos que intervenirían en la génesis de la arteriosclerosis se realizó un estudio multivariante (tabla 1) que analizó el hecho de pertenecer al grupo de

TABLA 1
Características clínicas de los casos y controles

Variables	Casos (n = 68)	Controles (n = 50)	p	Análisis multivariante	
				p	OR (IC del 95%)
Edad media (DE), años	65,9 (8,5)	60,1 (3,5)	< 0,0001 ^a		
Mayores de 59 años (primer cuartil)	84,4%	76%	0,2 ^b	0,6	0,7 (0,2-2,1)
Varones	83,8%	80%	0,6 ^b	0,7	1,3 (0,3-5,2)
Fumadores	75%	60%	0,08 ^b	0,7	0,8 (0,2-2,7)
Diabetes mellitus	27,9%	4%	< 0,0001 ^c	0,9	1,1 (0,3-3,7)
Hipertensión	58,8%	8%	< 0,0001 ^b	0,09	0,4 (0,1-1,1)
Hipercolesterolemia	35,3%	4%	< 0,0001 ^c	0,9	0,9 (0,3-2,9)
Hipertrigliceridemia	23,5%	8%	0,007 ^b	0,7	0,8 (0,2-2,6)
Obesidad	26,6%	28%	0,6 ^b	0,4	1,6 (0,6-4,5)
Casos/controles				0,000	38 (9,2-157,7)

DE: desviación estándar; OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza. ^aPrueba de la t de Student. ^bPrueba de la χ^2 . ^cPrueba exacta de Fisher.

casos o de controles. En ambos grupos, y teniendo en cuenta el tamaño de la población, se aplicó la prueba de regresión logística exacta. El único factor identificado claramente como significativo fue el hecho de pertenecer al grupo de casos o controles (*odds ratio* [OR] = 8,1; intervalo de confianza del 95%, 9,2-157,7). El alto valor de la OR estimada en este caso se pudo explicar por una sobrestimación debida al tamaño pequeño de la muestra e intensa relación entre los factores de riesgo. La bondad del modelo se ajustó usando la prueba de Hosmer-Lemeshow, que no fue significativa ($\chi^2 = 2,7$; $p = 0,1$; 8 grados de libertad). 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, estaban ajustados para las distintas variables, y la única que determinó diferencia fue la presencia o ausencia de EAP, es decir, el hecho de participar en el grupo de casos o controles.

El ADN de *C. pneumoniae* se detectó en el 66,2% de los casos (45 muestras) y el 12% de los controles (6 muestras) ($p < 0,0001$; OR = 15,3; intervalo de confianza del 95%, 5,7-41,4).

En la tabla 2 se reflejan los resultados obtenidos en las pruebas de enzimoimmunoanálisis y MIF, y su significación estadística. Destacó en los casos un mayor número de muestras con IgG anti-CE ($p < 0,0001$; prueba de la χ^2), con una OR de 14,6 para la primera y de 10,3 para la segunda.

En la figura 1 se refleja el aspecto de las bandas observadas en el WB comercial y en la tabla 2 se reflejan los resultados, agrupados, y su significación estadística. 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 fueron elevados y no hubo ningún patrón específico dentro del grupo de casos o controles. Se obtuvieron diferentes lecturas para la IgG, que oscilaron desde un resultado negativo hasta tiras que mostraron gran número de bandas. Lo mismo ocurrió para la IgA. Los resultados de los WB de IgG e IgA para el mismo suero fueron parecidos. No hubo muestras que mostraran anticuerpos sólo frente al LPS. Destacó, para la IgG, la presencia significativa de las proteínas de 39 kDa (MOMP), 54 kDa y el LPS, y para la IgA la presencia significativa de anticuerpos frente a las proteínas Hsp60 kDa y de 92 kDa. En la tabla 3 se indica la relación que existió entre los resultados obtenidos mediante las pruebas serológicas de MIF, enzimoimmunoanálisis anti-CE y WB comercial. La prueba de MIF IgG se relacionó con la IgG frente a las proteínas de 39 y 54 kDa, y el enzimoimmunoanálisis IgG se relacionó con las proteínas de 35 y 39 kDa. La relación entre la presencia de

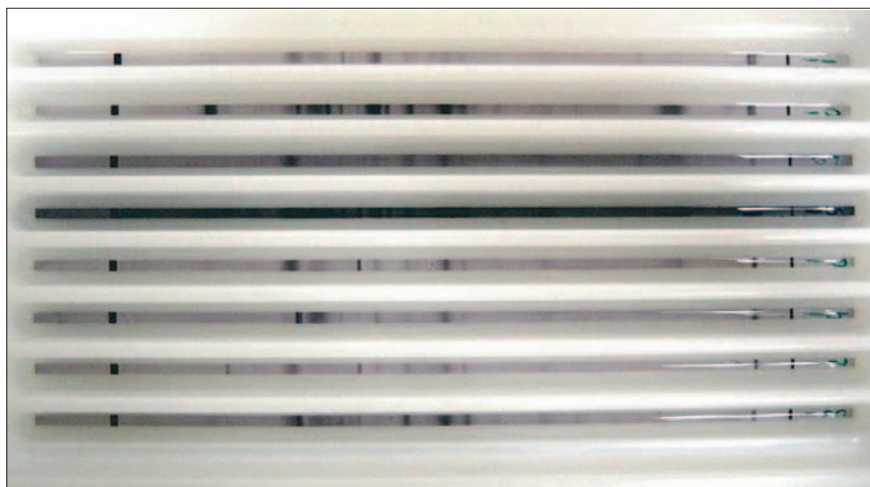


Fig. 1. Aspecto de las bandas obtenidas mediante el Western-blot comercial.

TABLA 2

Seroprevalencia de anticuerpos frente a *C. pneumoniae* detectados mediante microinmunofluorescencia (MIF), enzimoimmunoanálisis (ELISA) y Western-blot comercial en la enfermedad arterial periférica

Pruebas	Casos	Controles	p	OR	IC del 95%
Western-blot IgG					
LPS	22,1%	24%	0,8	0,9	0,4-2,1
LPS'	16,2%	4%	0,04*	4,6*	0,9-21,9*
LPS''	23,5%	14%	0,2	1,9	0,7-5,0
35 kDa	89,7%	92%	0,7	0,7	0,2-2,7
39 kDa	25%	4%	0,002	8*	1,7-36,5*
48 kDa	38,2%	36%	0,8	1,1	0,5-2,3
54 kDa	30,9%	8%	0,003*	5,1*	1,6-16,1*
Hsp60 kDa	52,9%	40%	0,1	1,7	0,8-3,5
90 kDa	8,8%	4%	0,3	2,3	0,4-12,0
92 kDa	48,5%	48%	0,9	1,0	0,5-2,1
98 kDa	29,4%	20%	0,2	1,7	0,7-3,9
Western-blot IgA					
LPS	4,4%	4%	0,91	1,1	0,2-6,9
LPS'	1,5%	0%	0,4	0,9	0,9-1,0
LPS''	8,8%	0%	0,03*	0,9	0,8-0,9
35 kDa	39,7%	24%	0,07	2,1	0,9-4,7
39 kDa	11,8%	12%	0,9	0,9	0,3-3,0
48 kDa	11,8%	8%	0,5	1,5	0,4-5,5
54 kDa	11,8%	16%	0,5	0,7	0,2-2,0
Hsp60 kDa	29,4%	12%	0,02*	3,0*	1,1-8,3*
90 kDa	0%	0%	-	-	-
92 kDa	16,2%	4%	0,04*	4,6*	0,9-21,9*
98 kDa	14,7%	8%	0,3	1,9	0,6-6,7
ELISA IgG	73,5%	16%	< 0,0001*	14,6*	5,7-36,9*
ELISA IgA	8,8%	16%	0,2	0,5	0,1-1,5
ELISA IgG anti-LPS	20,6%	24%	0,6	0,8	0,4-1,9
ELISA IgA anti-LPS	22,1%	32%	0,2	0,6	0,2-1,3
MIF IgG	76,5%	24%	< 0,0001*	10,3*	4,4-24,3*

Ig: inmunoglobulina; LPS, LPS', LPS'': lipopolisacáridos con 3 pesos moleculares diferentes; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confianza. *Datos significativos.

TABLA 3

Relación entre las pruebas serológicas de enzimoimmunoanálisis (ELISA) anticuerpo elemental, microinmunofluorescencia (MIF) y Western-blot (WB) comercial

WB	MIF IgG			ELISA IgG			ELISA IgA		
	χ^2	Pearson	Kappa	χ^2	Pearson	Kappa	χ^2	Pearson	Kappa
35 kDa	0,5	-0,1	-0,04	0,02*	0,2*	0,1*	0,7	-0,3	-0,29
39 kDa	0,02*	0,2*	0,1*	0,02*	0,2*	0,2*	0,76	0,03	0,02
48 kDa	0,7	0,04	0,04	0,9	0,01	0,01	0,68	-0,04	-0,03
54 kDa	0,04*	0,2*	0,1*	0,9	0,1	0,1	0,45	-0,07	-0,07
Hsp60 kDa	0,6	-0,5	-0,5	0,2	0,1	0,1	0,95	-0,005	-0,005
90 kDa	0,8	-0,2	-0,01	0,5	-0,06	-0,03	-	-	-
92 kDa	0,7	0,4	0,4	0,5	0,06	0,07	0,62	-0,04	-0,04
98 kDa	0,5	0,7	0,6	0,6	0,05	0,04	0,23	0,1	0,1

Ig: inmunoglobulina. *Datos significativos.

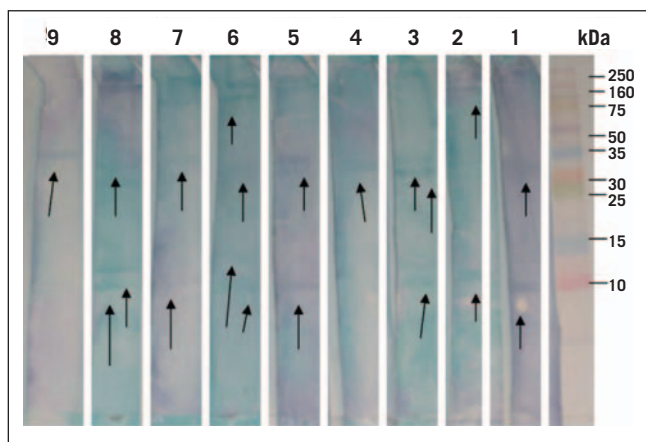


Fig. 2. Aspecto de las bandas obtenidas mediante el Western-blot no comercial.

ADN en las biopsias y los anticuerpos detectados mediante MIF, enzoinmunoanálisis y WB comercial se refleja en la tabla 4. En el grupo de casos se encontró una presencia significativa de IgG anti-39 kDa, que se relacionó con las pruebas de MIF y enzoinmunoanálisis, y la presencia de ADN, así como una presencia significativa de IgA anti-LPS y anti-92 kDa en el WB comercial, que se relacionaron con la presencia de ADN.

Hubo 12 casos y 2 controles en los que, debido al agotamiento de las muestras de suero, no se pudo realizar las pruebas de WB no comercial. Mediante éste se obtuvo un total de 57 bandas proteicas diferentes, de IgG y/o IgA (fig. 2). Los patrones de los sueros fueron semejantes cuando se repitieron los ensayos. 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 la tabla 5 se indica, 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 la presencia significativa 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.

Discusión

Hasta la fecha se ha publicado una serie de estudios que analizan parcialmente la relación entre la EAP y la infección por *C. pneumoniae*⁴. En algunos no se realizó un ajuste adecuado de las poblaciones (ya fuera porque no se hizo para ninguna va-

riable, o porque sólo se realizó para algunas); en otros, algo novedoso, el estudio se realizó en arterias lesionadas y sanas del mismo sujeto. Sin embargo, en ninguno de los trabajos se han empleado simultáneamente métodos directos e indirectos para el análisis de la relación, salvo en los de LaBiche et al²³, Linares et al²⁶ y Sessa et al³⁸, sobre arterias carótidas, y en los estudios de Vécsei et al^{44,45}, sobre arterias diferentes. En este sentido, nuestro trabajo resulta novedoso, ya que se emplearon poblaciones comparables que se sometieron simultáneamente a estudio mediante pruebas directas e indirectas.

Desafortunadamente, se sabe poco sobre las proteínas inmunogénicas de *C. pneumoniae*. Es especialmente controvertido el papel de la MOMP⁵². Ésta constituye el 60% de las proteínas de la membrana externa y es diferente en cada una de las especies de la familia *Chlamydiaceae*⁵³. Además, en el caso de *C. pneumoniae* parece que está oculta entre las proteínas polimórficas de la membrana externa^{54,55}. Todo ello hace que no sea inmunodominante, a diferencia de lo que ocurre con las otras especies. Sobre esta base, en principio, la respuesta que genera la proteína MOMP no parece tener un papel importante en la patogenia de la enfermedad causada por *C. pneumoniae*. Sin embargo, un estudio realizado en sujetos con enfermedad coronaria, en el que se empleó un enzoinmunoanálisis con antígeno MOMP recombinante, mostró una presencia significativa de IgA anti-MOMP, pero no de IgG⁵⁶. Si bien nuestro grupo de casos es diferente del anterior, encontramos una presencia significativa de IgG anti-MOMP en el WB comercial, que se relacionó con las pruebas de MIF y enzoinmunoanálisis y la presencia de ADN de *C. pneumoniae* en las biopsias. Esto no ocurrió con la IgA. Maass y Gieffers⁵⁷ obtuvieron un resultado similar al nuestro empleando un WB no comercial en sueros de enfermos coronarios.

La proteína de 54 kDa está en la superficie del CE, es inmunodominante^{58,59} y podría

ser de interés en el diagnóstico serológico⁶⁰ y el desarrollo de vacunas^{61,62}. En nuestro estudio se encontró, en el grupo de casos, una presencia significativa de IgG anti-54 kDa en el WB comercial, que se relacionó con la prueba de MIF y la presencia de ADN. Esto no ocurrió con la IgA. Maass y Gieffers⁵⁷ obtuvieron un resultado similar. El LPS es una molécula presente en los CE, en los cuerpos de inclusión, en la membrana de las células infectadas y en la porción más cercana de células próximas no infectadas⁶³ de todos los miembros de la familia *Chlamydiaceae*. La estructura de este LPS coincide en parte con la de otras bacterias gramnegativas y difiere en la naturaleza de los ácidos grasos y el KDO, que posee un antígeno específico de familia con enlaces α -2-8⁶⁴. Es capaz de unirse a los receptores CD14 y de activar a los monocitos⁶⁵. Los anticuerpos anti-LPS se forman precozmente en la infección por *Chlamydia*, pero sus valores disminuyen antes que los inducidos por proteínas. Entonces su detección no parece útil en los estudios de seroprevalencia. No obstante, la presencia persistente de IgG podría ser un marcador de infección crónica debido a una exposición continua a *C. pneumoniae* del sistema inmunológico del hospedador, que

TABLA 4

Grado de relación entre la presencia de anticuerpos, mediante pruebas comerciales, y el ADN de la bacteria en la placa de ateroma

Prueba serológica	Sujetos (%) con ADN y anticuerpos positivos/negativos	Correlación	
		χ^2	Pearson
MIF IgG-CE ELISA	57,8*/27,8*	0,001	0,3*
IgG-EB	63,8*/25,0*	0,0001*	0,4*
IgA-EB	38,7/46,0	0,07	-0,2
IgG-LPS	34,6/46,7	0,3	-0,1
IgA-LPS	21,4/47,1	0,5	-0,06
Western-blot IgG			
LPS	40,7/45,1	0,7	-0,03
LPS'	61,5/41,9	0,2	0,1
LPS''	52,2/42,1	0,4	0,08
35 kDa	42,1/63,6	0,2	-0,1
39 kDa	68,4*/39,4*	0,01*	0,2*
48 kDa	56,8*/36,5*	0,03*	0,2*
54 kDa	76,0*/35,5*	0,0001*	0,3*
Hsp60 kDa	42,9/45,2	0,8	-0,02
90 kDa	37,5/44,5	0,7	-0,03
92 kDa	43,9/44,3	0,9	-0,004
98 kDa	50,0/42,0	0,4	0,07
Western-blot IgA			
LPS	40,0/44,2	0,9	-0,02
LPS'	0,0/44,4	0,4	-0,08
LPS''	83,3*/42,0*	0,04*	0,2*
35 kDa	43,6/44,3	0,9	-0,007
39 kDa	35,7/45,2	0,5	-0,6
48 kDa	50,0/43,4	0,7	0,04
54 kDa	37,5/45,1	0,6	-0,06
Hsp60 kDa	57,7/40,2	0,11	0,1
90 kDa	44,1/44,1	-	-
92 kDa	76,9*/40,0*	0,01*	0,2*
98 kDa	42,9/44,2	0,9	-0,01

MIF: microinmuno fluorescencia; ELISA: enzoinmunoanálisis; LPS, LPS', LPS'': lipopolisacáridos con 3 pesos moleculares diferentes; CE: cuerpo elemental. * Datos significativos.

debería provocar una estimulación repetitiva de IgG anti-LPS, entre otros anticuerpos⁶⁶. En nuestro estudio se encontró en los casos, en el WB comercial, una presencia significativa de IgG e IgA anti-LPS, que no se relacionó con la detección de anticuerpos anti-LPS mediante enzimo-inmunoanálisis y la presencia de ADN. Es posible que las diferencias químicas entre los antígenos del WB y el enzimo-inmunoanálisis (éste emplea un antígeno recombinante específico de familia) expliquen esta falta de relación. Finalmente, la detección de anticuerpos anti-LPS mediante el WB comercial puede tener un mayor riesgo de reacciones serológicas cruzadas con otros géneros de bacterias u otras especies de *Chlamydia*⁶⁷, aunque las características de la población estudiada, en principio, excluyen estas últimas. No obstante, esto puede justificar la falta de relación con el ADN bacteriano, ya que los anticuerpos detectados podrían ser inespecíficos.

Chlamydia produce grandes cantidades de Hsp de 60 kDa, presentes en la membrana externa, placas arterioscleróticas y suero de sujetos infectados de forma crónica. La Hsp60 kDa de *C. pneumoniae* induce la expresión de citocinas 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 alfamosina^{68,69}. Finalmente, existen datos que relacionan el LPS y la Hsp60 kDa con los procesos aterogénicos⁷⁰. En nuestro estudio se encontró, en el grupo de casos, una presencia significativa de IgA anti-Hsp60 kDa, a diferencia de la IgG encontrada por Maass y Gieffers⁵⁷. Aquélla no se relacionó con la presencia de ADN y los resultados del enzimo-inmunoanálisis y la MIF. Esto último es comprensible, ya que el antígeno Hsp60 kDa forma parte de la fracción sarcosil soluble de los CE.

Los anticuerpos anti-92 kDa detectados están dirigidos frente a una proteasa con actividad dependiente del adenosintrifosfato que degrada los plegamientos y anomalías de las proteínas dentro de las células (<http://www.stdgen.lanl.gov/>), aunque también podrían reflejar la presencia de una gelatinasa liberada por los macrófagos ante el estímulo de *C. pneumoniae*. Así, se ha demostrado la capacidad de las proteínas Omp2, MOMP y Hsp60 kDa para inducir la gelatinasa de 92 kDa de los monocitos⁷¹. En nuestro estudio se encontró en los casos una presencia significativa de IgA anti-92 kDa, no referida por Maass y Gieffers⁵⁷, que no se relacionó con la detección de ADN de *C. pneumoniae* en la placa de ateroma y que podría deberse a reacciones serológicas inespecíficas.

TABLA 5

Relación entre los resultados del Western-blot no comercial y la detección de ADN de *C. pneumoniae*

Banda kDa	Positividad (%)			
	Inmunoglobulina G		Inmunoglobulina A	
	Casos/controles/p/OR	ADN, p/Pearson/kappa	Casos/controles/p	ADN, p/Pearson/kappa
158,5	3,6/0/0,2	0,2	0/0	
147,2	5,4/0/0,1	0,6	0/0	
138	7,1/0/0,06	0,2	0/0	
136,4	3,6/0/0,2	0,3	0/0	
128,8	17,9/0/0,001*/2* (1,7-2,5) *	0,01*/0,2*/0,2*	0/4,2/0,2	0,5
121,9	1,8/0/0,3	0,4	0/0	
114,8	1,8/0/0,3	0,6	0/0	
109,6	3,6/0/0,2	0,3	0/0	
108,1	1,8/0/0,3	0,4	0/0	
95,5	1,8/0/0,3	0,6	0/0	
86,1	1,8/0/0,3	0,4	0/0	
88,7	1,8/0/0,3	0,6	0/0	
85,1	1,8/0/0,3	0,6	0/0	
79,4	3,6/4,2/0,6	0,5	7,1/0/0,08	0,03*/0,2*/0,1*
70,8	8,9/0/0,04*/1,9* (1,6-2,3)*	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	8,9/0/0,04*/1,9* (1,6-2,3)*	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	0,02*/0,2*/0,1*	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	0,04*/0,2*/0,8*
47,9	14,3/0/0,006*/2* (1,6-2,4)*	0,2	0/0	
47,5	8,9/0/0,04*/1,9* (1,6-2,3)*	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	14,3/0/0,006*/2* (1,6-2,4)*	0,2	5,4/0/0,1	0,04*/0,2*/0,1*
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
12,1	10,7/0/0,02*/1,9* (1,6-2,4) *	0,5	0/0	
12	5,4/4,2/0,6	0,7	3,6/4,2/0,6	0,4
11,8	1,8/0/0,3	0,4	0/0	
11	3,6/0/0,5	0,6	0/0	
10,7	1,8/0/0,3	0,6	0/0	
10,6	8,9/0/0,04*/1,91* (1,6-2,35)*	0,1	0/0	
9,8	12,5/20,8/0,2	0,4	16,1/0	0,3
9,2	14,3/0/0,006*/2* (1,6-2,4)*	0,04*/0,2*/0,1*	1,8/0/0,3	0,6
8,1	10,7/0/0,02*/1,9* (1,6-2,4)*	0,7	0/0	
7,6	14,3/0/0,006*/2* (1,6-2,4)*	0,2	0/0	
7	3,6/4,2/0,6	0,4	0/0	
6,6	1,8/0/0,3	0,6	0/0	
6	1,8/0/0,3	0,6	0/0	
5,9	1,8/0/0,3	0,6	3,6/0/0,2	0,3
4,8	1,8/0/0,3	0,6	0/0	
2,4	1,8/0/0,3	0,6	1,8/4,2/0,4	0,2
2,2	1,8/0/0,3	0,4	0/0	
2,1	3,6/0/0,2	0,6	0/0	
1,7	1,8/0/0,3	0,6	0/0	
1,1	7,1/0/0,06	0,02*/0,2*/0,1*	0/0	

Entre paréntesis se indican los intervalos de confianza del 95%. OR: odds ratio. *Datos significativos.

La utilización de la prueba de WB no comercial ha permitido la obtención de un gran número de bandas diferentes, con una información, a nuestro modo de ver, complementaria a la anteriormente expuesta. ¿Por qué las diferencias en los resultados obtenidos mediante los 2 WB? Podrían deberse a la diferente composición de las tiras antigénicas. Así, por ejemplo, el comercial no utiliza los antígenos de 128 y 9,2 kDa, por lo que no está capacitado para la detección de tales anticuerpos. Por el contrario, no se puede descartar que se detectaran me-

dante el WB no comercial los anticuerpos anti-39 y anti-54 kDa, ya que es posible que se produjeran fragmentaciones proteicas en el procesamiento de los antígenos, con aparición de bandas antigénicas diferentes. El empleo de condiciones de electroforesis diferentes en los 2 WB explica estos comportamientos, de tal forma que, por ejemplo, una banda de 57, 54,5 y 52 kDa del WB no comercial se podría corresponder con la banda de 54 kDa encontrada en el WB comercial. Debido a que no se han utilizado anticuerpos monoclonales, no podemos saber

TABLA 6

Relación entre las proteínas significativas detectadas en el Western-blot no comercial y las proteínas más próximas descritas en los estudios de Vandahl et al⁵⁹, Montigiani et al⁵⁸ y Los Alamos National Laboratory

Presente estudio	Peso molecular observado (kDa)		
	Vandahl et al ⁵⁹	Montigiani et al ⁵⁸	Los Alamos National Laboratory
128,8	Más cercana: 114,2 (Pmp 20)	Más cercana: 142,9 (Pmp 6)	Más cercana: 127,3 (proteína específica de <i>Chlamydia</i>)
70,8	Más cercana: 67,8 (Omp 2) o 71,3 (DnaK)	Más cercana: 71,3 (DnaK)	Más cercana: 70,8 (fosfatasa) o 70,9 (transcitolasa B)
58,9	Más cercana: 58,8 (Omp) o 56,9 (Hsp60) o 60,3 (Omc B)	Más cercana: 58,6 (Omp) o 57,3 (Omc B)	Más cercana: 58,7 (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa) o 58,2 (Hsp60)
47,9/47,5	Más cercanas: 47,8 (proteasas) o 47,1 (Pmp 21)	Descrita: 47,9 (hipotética proteína específica de <i>Chlamydia</i>)	Descrita: 47,9 (proteína específica de <i>Chlamydia</i>)
18,4	Más cercana: 18,9 (hipotética proteína)	Más cercana: 17,9 (hipotética proteína) o 17,3 (Omp H)	Más cercana: 18,3 (proteína específica de <i>Chlamydia</i>)
12,1	Más cercana: 12,3 (riboflavina sintasa) o 12,9/11,4 (hipotética proteína)	No describe	Descrita: 12,1 (proteína específica de <i>C. pneumoniae</i>)
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 (Pmp 8) o 9,4 (proteína específica de <i>Chlamydia</i>)	Descrita: 9,2 (Omc A)	Descrita: 9,2 (Omc A)
8,1	No describe	Descrita: 8,1 (Omc A)	Descrita: 8,1 (proteína específica de <i>Chlamydia</i>)
7,6	No describe	Descrita: 7,6 (Omc A)	Descrita: 7,6 (proteína específica de <i>Chlamydia</i>)

con exactitud la naturaleza de la proteína detectada, aunque sí se puede hacer un estudio comparativo con las obtenidas en los estudios de Vandahl et al⁵⁹, Montigiani et al⁵⁸ y la base de datos de Los Alamos National Laboratory (<http://www.std-gen.lanl.gov/>), como se aprecia en la tabla 6. Finalmente, es lógico que en nuestra prueba no comercial no esté presente el antígeno LPS, debido a que no se empleó fenol en la extracción, se hirvió el extracto bacteriano más de 5 min y, por último, nuestro método, SDS-PAGE, es óptimo para la separación de proteínas, no del LPS. Todo lo anterior no evitó que se detectaran anticuerpos frente a bandas proteicas diferentes en los casos respecto a controles.

Globalmente, los resultados obtenidos mediante el WB invitan a reflexionar sobre por qué entre las bandas presentes significativamente sólo algunos anticuerpos se asociaron a la presencia de ADN. Esto podría deberse a que en el grupo de casos reflejan una fase inicial con presencia de ADN e IgG específica anti-128,8, 54, 39 y 9,2 kDa. Posteriormente, aun en ausencia de la bacteria, podría existir una enfermedad inmunomediada con presencia de IgA anti-HSP60 kDa y de otras IgG específicas, detectadas mediante WB no comercial. Esta última situación se ve favorecida por los fenómenos de latencia microbiana y las respuestas inmunológicas ananésticas o autoinmunitarias.

En conclusión, se encontró en los sujetos con EAP una respuesta serológica, mediante WB, más importante frente a determinadas proteínas de la bacteria. Esto podría deberse a que reflejan una fase inicial con presencia de ADN e IgG espe-

cífica. Posteriormente, aun en ausencia de la bacteria, podría existir una enfermedad inmunomediada con presencia de IgA e IgG. La contribución más importante de este estudio deriva del análisis simultáneo de diferentes pruebas que evalúan la relación entre la infección y la enfermedad. Pensamos que los resultados obtenidos derivan del 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. No se puede deducir de nuestro estudio una relación causal directa entre la infección crónica y la enfermedad, 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.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Danesh J, Whincup P, Lewington S, Walker M, Lenon L, Thomson A, et al. *Chlamydia pneumoniae* IgA titres and coronary heart disease: prospective study and meta-analysis. *Eur Heart J*. 2002;23:371-5.
- Danesh J, Whincup P, Walker M, Lenon L, Thomson A, Appleby P, et al. *Chlamydia pneumoniae* IgG titres and coronary heart disease: prospective study and meta-analysis. *BMJ*. 2000;321:208-13.
- Danesh J, Whincup P, Walker M, Lenon L, Thomson A, Appleby P, et al. Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta analyses. *BMJ*. 2000;321:199-204.
- Gutiérrez J, Luna JD, Linares J, Montes MR, Quesada E, Soto MJ, et al. Relationship between peripheral arterial occlusive disease (PAOD) and chronic *Chlamydia* (*Chlamydia pneumoniae*) infection: a meta-analysis. *Throm Haemost*. 2005;93:1153-60.

- Fowkes FG, Housley E, Riemersma RA, Macintyre CC, Cawood EH, Prescott RJ. 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*. 1992;135:331-40.
- Alakärppä H, Surcel H-M, Laitinen K, Juvonen T, Saikku P, Laurila A. Detection of *Chlamydia pneumoniae* by colorimetric in situ hybridization. *APMIS*. 1999;107:451-4.
- Al-Amro AA, Al-Jafari AA, Al-Fagih MR, Tajeldin M, Qavi HB. Frequency of occurrence of cytomegalovirus and *Chlamydia pneumoniae* in lymphocytes of atherosclerotic patients. *Cent Eur J Public Health*. 2001;9:106-8.
- Berger M, Schroder B, Daeschlein G, Schneider W, Busjahn A, Buchwalow I, et al. *Chlamydia pneumoniae* DNA in non-coronary atherosclerotic plaques and circulating leukocytes. *J Lab Clin Med*. 2000;136:194-200.
- Chiu B, Viira E, Tucker W, Fong IW. *Chlamydia pneumoniae*, cytomegalovirus, and herpes simplex virus in atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation*. 1997;96:2144-8.
- Cook PJ, Honeybourne D, Lip GY, Beevers DG, Wise R, Davies P. *Chlamydia pneumoniae* antibody titers are significantly associated with acute stroke and transient cerebral ischemia: the West Birmingham Stroke Project. *Stroke*. 1998;29:404-10.
- Elkind MS, Lin IF, Grayston JT, Sacco RL. *Chlamydia pneumoniae* and the risk of first ischemic stroke: The Northern Manhattan Stroke Study. *Stroke*. 2000;31:1521-5.
- Farsak B, Yildirim A, Akyon Y, Pinar A, Oc M, Boke E, et al. Detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori* DNA in human atherosclerotic plaques by PCR. *J Clin Microbiol*. 2000;38:4408-11.
- Freidank HM, Lux A, Dern P, Meyer-König U, Els T. *Chlamydia pneumoniae* DNA in peripheral venous blood samples from patients with carotid artery stenosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002;21:60-2.
- Gil-Madre J, García JL, González RC, Montero JM, Paniagua EB, Escribano JR, et al. Association between seropositivity to *Chlamydia pneumoniae* and acute ischaemic stroke. *Eur J Neurol*. 2002;9:303-6.
- Glader C, Stegmayr B, Boman J, Stenlund H, Weinehall L, Hallmans G, et al. *Chlamydia pneumoniae* antibodies and high lipoprotein(a) levels do not predict ischemic cerebral infarctions. Results from case-control study in Northern Sweden. *Stroke*. 1999;30:2013-8.

GUTIÉRREZ J ET AL. DESCRIPCIÓN DE INMUNÓGENOS DE *CHLAMYDIA PNEUMONIAE* RECONOCIDOS POR EL SUERO DE SUJETOS CON ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA

16. Goo Y, Moon H, Myung J, Kee B, Soo D, Jung A, et al. Serologic and histopathologic study of *Chlamydia pneumoniae* infection in atherosclerosis induced by *Chlamydia pneumoniae*. *Yonsei Med J*. 2000;41:319-27.
17. Gutiérrez J, Linares-Palomino J, López-Espada C, Rodríguez M, Ros E, Piedrola G, et al. *Chlamydia pneumoniae* DNA in the arterial wall of patients with peripheral vascular disease. *Infection*. 2001;29:196-200.
18. Gutiérrez-Fernández J, Linares-Palomino J, Fernández-Sánchez F, Guerrero-Fernández M, López Espada C, Ros-Díez E, et al. The presence of anti-*Chlamydia pneumoniae* antibodies in peripheral vascular and neurological disorders. *Rev Neurol*. 2001;32:501-5.
19. Juvonen J, Juvonen T, Laurila A, Alakärppä H, Lounatmaa K, Surcel HM, et al. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in the walls of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 1997;25: 499-505.
20. Kalayoglu MV, Galvan C, Mahdi OS, Byrne GI, Mansour S. Serological association between *Chlamydia pneumoniae* infection and age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol*. 2003; 121:478-82.
21. Kol A, Sukhova GK, Lichtman AH, Libby P. Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor- α and matrix metalloproteinase expression. *Circulation*. 1998;98:300-7.
22. Kuo CC, Gown AM, Benditt EP, Grayston JT. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain. *Arterioscler Thromb*. 1993;13:1501-4.
23. LaBiche R, Koziol D, Quinn TC, Gaydos C, Azhar S, Ketron G, et al. Presence of *Chlamydia pneumoniae* in human symptomatic and asymptomatic carotid atherosclerotic plaque. *Stroke*. 2001; 32:855-60.
24. Lehto S, Niskanen L, Suhonen M, Ronnema T, Saikku P, Laakso M. Association between *Chlamydia pneumoniae* antibodies and intimal calcification in femoral arteries of nondiabetic patients. *Arch Intern Med*. 2002;162:594-9.
25. Lin TM, Chen WJ, Chen HY, Wang PW, Eng HL. 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*. 2003;56:429-32.
26. Linares-Palomino J, Gutiérrez J, López-Espada C, Ros E, Moreno J, Pérez T, et al. *Chlamydia pneumoniae* and cerebrovascular disease. *Rev Neurol*. 2001;32:201-6.
27. Maass M, Bartels C, Kruger S, Krause E, Engel PM, Dalhoff K. Endovascular presence of *Chlamydia pneumoniae* DNA is a generalized phenomenon in atherosclerotic vascular disease. *Atherosclerosis*. 1998;140 Suppl 1:25-30.
28. Maeda N, Sawayama Y, Tatsukawa M, Okada K, Furusyo N, Shigematsu M, et al. Carotid artery lesions and atherosclerotic risk factors in Japanese hemodialysis patients. *Atherosclerosis*. 2003;169:183-92.
29. Melnick SL, Shahar E, Folsom AR, Grayston JT, Sorlie PD, Wang SP, et al. Past infection by *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR and asymptomatic carotid atherosclerosis. Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. *Am J Med*. 1993;95:499-504.
30. Müller J, Möller DS, Kjaer M, Nyvad O, Larsen NA, Pedersen EB. *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*. 2003;35:704-12.
31. Neureiter D, Heuschmann P, Stintzing S, Kolomoisky-Rabas P, Barbera L, Jung A, et al. Detection of *Chlamydia pneumoniae* but not of *Helicobacter pylori* in symptomatic atherosclerotic carotids associated with enhanced serum antibodies, inflammation and apoptosis rate. *Atherosclerosis*. 2003;168:153-62.
32. Ong G, Thomas BJ, Mansfield AO, Davidson BR, Taylor-Robinson D. Detection and widespread distribution of *Chlamydia pneumoniae* in the vascular system and its possible implications. *J Clin Pathol*. 1996;49:102-6.
33. Ong GM, Coyle PV, Barros D'Sa AA, McCluggage WG, Duprex WP, O'Neill HJ, et al. Non-detection of *Chlamydia* species in carotid atheroma using generic primers by nested PCR in a population with a high prevalence of *Chlamydia pneumoniae* antibody. *BMC Infect Dis*. 2001;1:12.
34. Ouchi K, Fujii B, Kudo S, Shirai M, Yamashita K, Gondo T, et al. *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic and nonatherosclerotic tissue. *J Infect Dis*. 2000;181 Suppl 3:441-3.
35. Ramos PM, Ortega F, Samaniego J, Díaz R. Microscopia electrónica, *Chlamydia pneumoniae* y arteriosclerosis. *Med Clin (Barc)*. 1999;112:277-8.
36. Rassu M, Cazzavillan S, Scagnelli M, Peron A, Bevilacqua PA, Facco M, et al. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic arteries from various vascular regions. *Atherosclerosis*. 2001;158:73-9.
37. Rose AG. 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*. 2002;11: 300-4.
38. Sessa R, Di Pietro M, Schiavoni G, Santino I, Benediti-Valentini F, Perna R, et al. *Chlamydia pneumoniae* DNA in patients with symptomatic carotid atherosclerotic disease. *J Vasc Surg*. 2003;37:1027-31.
39. Shi Y, Tokunaga O. *Chlamydia pneumoniae* and multiple infections in the aorta contribute to atherosclerosis. *Pathol Int*. 2002;52:755-63.
40. Tanne D, Haim M, Boyko Y, Goldbourt U, Reshef T, Adler Y, et al. Prospective study of *Chlamydia pneumoniae* IgG and IgA seropositivity and risk of incident ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis*. 2003;16:166-70.
41. Tarnacka B, Gromadzka G, Czlonkowska A. Increased circulating immune complexes in acute stroke. The triggering role of *Chlamydia pneumoniae* and cytomegalovirus. *Stroke*. 2002;33: 936-40.
42. Taylor-Robinson D, Thomas BJ, Goldin R, Stanbridge R. *Chlamydia pneumoniae* in infrequently examined blood vessels. *J Clin Pathol*. 2002;55: 218-20.
43. Van der Ven AJ, Hommels MJ, Kroon AA, Kessels A, Flobbe K, Van Engelshoven J, et al. *Chlamydia pneumoniae* seropositivity and systemic and renovascular atherosclerotic disease. *Arch Intern Med*. 2002;162:786-90.
44. Vécsei PV, Kircher K, Reitner A, Khanakha G, Stanek G. *Chlamydia pneumoniae* in central retinal artery occlusion. *Acta Ophthalmol Scand*. 2002;80:656-9.
45. Vécsei PV, Kircher K, Reitner A, Khanakha G, Stanek G. *Chlamydia* in anterior ischemic optic neuropathy. *Ophthalmologica*. 2002;216:215-20.
46. Virok D, Kis Z, Karai L, Intzedy L, Burian K, Szabo A, et al. *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic middle cerebral artery. *Stroke*. 2001;32:1973-6.
47. Wimmer ML, Sandmann-Strupp R, Saikku P, Haberl RL. Association of chlamydial infection with cerebrovascular disease. *Stroke*. 1996;27: 2207-10.
48. Wolf SC, Mayer O, Jurgens S, Vonthein R, Schultz G, Risler T, et al. *Chlamydia pneumoniae* IgA seropositivity is associated with increased risk for atherosclerotic vascular disease, myocardial infarction and stroke in dialysis patients. *Clin Nephrol*. 2003;59:273-9.
49. Gutiérrez J, Linares J, Fernández F, Ros E, Luna JD, Mendoza J, et al. Relación entre la enfermedad arterial periférica oclusiva y la infección por *Chlamydia pneumoniae*. *Med Clin (Barc)*. 2004;3:561-6.
50. Roblin PM, Dumornay W, Hammerschlag MR. Use of Hep-2 cells for improved isolation and passage of *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 1992;30:1968-71.
51. Ladany S, Black CM, Farshy CE, Ossewaarde JM, Barnes RC. Enzyme immunoassay to determine exposure to *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR). *J Clin Microbiol*. 1989;27:2778-83.
52. Essig A, Simnacher U, Milorad S, Marre R. Analysis of the humoral immune response to *Chlamydia pneumoniae* by immunoblotting and immunoprecipitation. *Clin Diagnost Lab Immunol*. 1999;6:819-25.
53. Stephens RS, Lammel CJ. *Chlamydia* outer membrane protein discovery using genomics. *Curr Opin Microbiol*. 2001;4:16-20.
54. Biendo M, Eb F, Lefebvre F, Orfila J. Limits of the immunofluorescence test and advantages of immunoblotting in the diagnosis of chlamydia. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1996;3:706-9.
55. Persson K, Peykani A. Polymeric but not monomeric MOMP reacts with many monoclonal antibodies to *Chlamydia pneumoniae*. En: Stephens RS, Byrne GI, editors. *Chlamydia infections*. Actas de 9th International Symposium on Human Chlamydial Infections; 1998; Napa. p. 279-82.
56. Kido Y, Shirai M, Ouchi K, Nakazawa T. Analysis of the serological response to *Chlamydia pneumoniae* in patients with ischemic heart disease by recombinant MOMP-ELISA. *J Infect Chemother*. 2001;7:180-5.
57. Maass M, Gieffers J. Cardiovascular disease risk from prior *Chlamydia pneumoniae* infection can be related to certain antigens recognized in the immunoblot profile. *J Infect*. 1997;35:171-6.
58. Montigiani S, Falugi F, Scarselli M, Finco O, Petracca R, Galli G, et al. Genomic approach for analysis of surface proteins in *Chlamydia pneumoniae*. *Infect Immun*. 2002;70:368-79.
59. Vandahl BB, Birkelund S, Demol H, Hoorelbeke B, Christiansen G, Vandekerckhove J, et al. Proteome analysis of the *Chlamydia pneumoniae* elementary body. *Electrophoresis*. 2001;22: 1204-23.
60. Campbell LA, Roberts S, Inoue S, Kong L, Kuo CC. Evaluation of *Chlamydia pneumoniae* 43- and 53-kilodalton recombinant proteins for serodiagnosis by western blot. *Clin Diag Lab Immunol*. 2001;8:1231-3.
61. Wiedmann-AI-Ahmad M, Schuessler P, Freidank H. Reactions of polyclonal and neutralizing anti-p54 monoclonal antibodies with an isolated, species-specific 54 kilodalton protein of *Chlamydia pneumoniae*. *Clin Diag Lab Immunol*. 1997; 4:700-4.
62. Mygind P, Christiansen G, Persson K, Birkelund S. Analysis of the humoral immune response to *Chlamydia* outer membrane protein 2. *Clin Diag Lab Immunol*. 1998;5:313-8.
63. Campbell LA, Kuo CC. *Chlamydia pneumoniae* – an infectious risk factor for atherosclerosis? *Nat Rev Microbiol*. 2004;2:23-32.
64. Belunis CJ, Mdluli KE, Raetz CR. A novel 3-deoxy-D-manno-oculosonic acid transferase from *Chlamydia trachomatis* required for expression of the genus-specific epitope. *J Biol Chem*. 1992;267:18702-7.
65. Eng HL, Chen CH, Kuo CH, Wu JS, Wang CH, Lin TM. Association of CD14 promoter gene polymorphism and *Chlamydia pneumoniae* infection. *J Infect Dis*. 2003;188:90-7.
66. Hermann C, Graf K, Groh A, Straube E, Hartung T. Comparison of eleven commercial tests for *Chlamydia pneumoniae*-specific immunoglobulin G in asymptomatic healthy individuals. *J Clin Microbiol*. 2002;40:1603-9.
67. Ossewaarde JM. Introducing *Chlamydia pneumoniae*: the TWAR agent *Chlamydia pneumoniae* in a new perspective. *Neth J Med*. 2001; 59:41-4.
68. Saikku P. *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerosis. *J Intern Med*. 2000;247:391-6.
69. Stephens RS. The cellular paradigm of chlamydial pathogenesis. *Trends Microbiol*. 2003;11:44-51.
70. Kalayoglu MV, Indrawati V, Morrison RP, Morrison SG, Yuan Y, Byrne GI. Chlamydial virulence determinants in atherogenesis: the role of chlamydial lipopolysaccharide and heat shock protein 60 in macrophage-lipoprotein interactions. *J Infect Dis*. 2000;181:483-9.
71. Vehmaan-Kreula P, Puolakkainen M, Sarvas M, Welgus HG, Kovanen PT. *Chlamydia pneumoniae* proteins induce secretion of the 92-kDa gelatinase by human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1-8.