

***Chlamydia pneumoniae*, aterosclerosi e malattie coronariche**

Rosa Monno, Matteo Di Biase*, Antonella Costi, Teresa de Nicolò, Michele Correale*, Pierluigi Bolognese, Giandomenico Losacco

Sezione di Igiene, Cattedra di Microbiologia, Dipartimento di Medicina Interna e Medicina Pubblica, Università degli Studi, Bari, *Cattedra di Cardiologia, Università degli Studi, Foggia

Key words:

Atherosclerosis;
Chlamydia pneumoniae;
Coronary heart disease;
Myocardial infarction.

There is an increasing body of evidence that links *Chlamydia pneumoniae* infections to atherosclerosis and the clinical complications of unstable angina, myocardial infarction and stroke. Several epidemiologic reports indicate an association between the presence and titer of *Chlamydia pneumoniae* antibodies and atherosclerosis and its complications. Other studies show the presence of *Chlamydia pneumoniae*, chlamydial antigens or nucleic acid in atherosclerotic plaques. Moreover, experimental studies present mechanisms by which *Chlamydia pneumoniae* may play a role in the induction of atherosclerosis and its complications. Finally, many studies have evaluated the effect of antibiotic treatment on cardiovascular events in humans.

This article reviews all the aspects that link *Chlamydia pneumoniae* to atherosclerosis and its clinical manifestations.

(Ital Heart J Suppl 2003; 4 (5): 383-397)

© 2003 CEPI Srl

Ricevuto il 24 ottobre 2002; nuova stesura il 24 febbraio 2003; accettato il 26 marzo 2003.

Per la corrispondenza:

Prof.ssa Rosa Monno

Sezione di Igiene
Cattedra di Microbiologia
Dipartimento di Medicina
Interna e Medicina
Pubblica
Università degli Studi
Policlinico
Piazza Giulio Cesare, 11
70124 Bari
E-mail: r.monno@
igiene-seconda.uniba.it

Introduzione

L'aterosclerosi e le malattie cardiovascolari che ne conseguono sono responsabili di circa il 29% dei decessi nel mondo e rappresentano quindi un problema di sanità pubblica.

Negli Stati Uniti l'aterosclerosi colpisce il 25% degli individui con una mortalità del 42%. In oltre la metà dei casi sono interessate le arterie coronarie¹⁻³. Queste patologie iniziano a riscontrarsi anche nei paesi in via di sviluppo per l'aumentato tenore di vita⁴.

Il processo di aterosclerosi si verifica attraverso una progressiva formazione della placca nell'intima dei vasi. La placca è formata da lipidi, cellule muscolari lisce, cellule infiammatorie e da costituenti della matrice extracellulare. Con la maturazione, la placca viene rivestita dall'intima e tende a rompersi con conseguente trombosi acuta, angina instabile e infarto del miocardio. Molteplici fattori possono contribuire al processo di formazione dell'ateroma, inclusa una predisposizione familiare. Secondo alcuni autori questi fattori rappresenterebbero però solo il 10% dei casi di aterosclerosi negli Stati Uniti.

Dal punto di vista epidemiologico si è osservato un picco nel 1967 seguito da un periodo di bassa incidenza per le modificazioni dello stile di vita, inclusa la riduzione

dell'uso del tabacco. Si è osservato inoltre che la diminuzione dell'incidenza delle malattie associate all'aterosclerosi coincideva anche con l'incremento dell'uso degli antibiotici. Studi successivi hanno evidenziato un'associazione tra marker dell'infiammazione e aterosclerosi; è noto che in corso di infarto acuto del miocardio si osserva un aumento della velocità di eritrosedimentazione e della proteina C reattiva (PCR). Inoltre in molti individui affetti da aterosclerosi non è possibile rilevare i tradizionali fattori di rischio quali fumo, abitudini alimentari, sedentarietà, ipercolesterolemia, ipertensione, diabete e fattori genetici⁵.

Nonostante le campagne, condotte nei paesi industrializzati, per modificare le abitudini di vita, si è assistito recentemente ad un *plateau* nella riduzione dei tassi di mortalità da malattie cardiovascolari almeno nei paesi industrializzati¹⁻³. Queste evidenze hanno supportato l'ipotesi che il legame fra aterosclerosi e malattie cardiovascolari sia condizionato da altri fattori ambientali non ancora del tutto chiariti. Negli ultimi anni l'attenzione si è rivolta alla possibile relazione tra infezioni e aterosclerosi. Infatti diverse evidenze sperimentali dimostrano che il processo che porta all'aterosclerosi ha molti aspetti in comune con quello delle infezioni croniche indotte dai microrganismi e studi sperimentali in ani-

mali hanno dimostrato che molti agenti batterici e virali possono contribuire all'aterogenesi⁶.

Diversi microrganismi e virus sono stati associati alle modificazioni infiammatorie riscontrate nelle placche aterosclerotiche: herpes simplex virus di tipo 1 (HSV-1), *Cytomegalovirus* (CMV) sono stati associati ad aterosclerosi e ristenozi; *Helicobacter pylori* e infezioni dentali a malattie cardiovascolari croniche⁵. L'associazione più convincente, dimostrata da vari studi, è stata riscontrata per un batterio responsabile di infezioni respiratorie, la *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*).

Come precedentemente detto, nell'aterogenesi le lesioni iniziano con un accumulo nell'intima delle arterie di cellule schiumose e di linfociti T⁶.

Le cellule schiumose sono monociti che si trasformano in macrofagi che assumono lipoproteine a bassa densità (LDL) ossidate, che a sua volta derivano da LDL che migrano con i monociti nell'endotelio danneggiato⁷. Un agente infettivo può modulare questo processo stimolando sia la produzione di citochine proinfiammatorie che l'espressione di molecole di adesione, le quali favoriscono l'adesione dei leucociti alle pareti dei vasi.

Le citochine possono scatenare una seconda serie di eventi da parte delle cellule infiammatorie presenti nel sito dell'aterogenesi, delle cellule endoteliali della parete vasale o dei macrofagi⁸. Prodotti microbici ed in particolare le endotossine (lipopolisaccaride-LPS) possono amplificare questi eventi. Le stesse citochine, in particolare l'interleuchina (IL)-6, prodotte in distretti dove si instaura un processo infiammatorio, possono indurre, nel fegato, sintesi di proteine della fase acuta; alcune di queste possono promuovere la formazione di ateroma complicato da trombosi.

È stato dimostrato che i livelli di fibrinogeno sono proporzionali al rischio di danno a livello delle coronarie e che inibitori del sistema fibrinolitico, come l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno di tipo 1 (PAI-1), aumentano la stabilità del trombo^{6,9-11}. È chiaro che un processo infettivo che interessi la parete delle arterie può accelerare l'evoluzione della lesione aterosclerotica e favorire eventi cardiovascolari.

Lo scopo della presente rassegna è di fare il punto sulle acquisizioni relative all'associazione tra *C. pneumoniae*, aterosclerosi e malattie acute del miocardio. L'associazione tra *C. pneumoniae* e aterosclerosi si basa su: 1) studi sieroepidemiologici, 2) determinazione di *C. pneumoniae* o di suoi antigeni nelle lesioni aterosclerotiche, 3) studi sperimentali in animali, 4) effetto della terapia specifica, 5) ipotesi sui meccanismi patogenetici.

Studi sieroepidemiologici

La *C. pneumoniae* è un batterio intracellulare obbligato responsabile di infezioni delle alte vie respiratorie

e di circa il 10% delle polmoniti acquisite in comunità. Nella nostra esperienza la *C. pneumoniae* è responsabile di circa il 12% delle polmoniti acquisite in comunità e del 6% delle polmoniti osservate nei pazienti HIV-positivi^{12,13}.

La *C. pneumoniae* è acquisita per via respiratoria sotto forma di corpi elementari. Può penetrare nelle pareti dei vasi e, una volta nelle cellule, completa il suo ciclo vitale consistente nella trasformazione in corpo reticolato e nella sua moltiplicazione con formazione di inclusioni citoplasmatiche; segue la riorganizzazione in corpo elementare e la liberazione di questo all'esterno, con l'inizio di un nuovo ciclo. Recentemente è stata individuata, nelle cellule infettate, una nuova forma di *C. pneumoniae* metabolicamente inattiva, il "corpo persistente". Sotto questa forma la *C. pneumoniae* può rimanere nelle cellule per lunghi periodi di tempo, al riparo dall'azione del sistema immune e dall'azione degli antibiotici.

La presenza di anticorpi anti-*C. pneumoniae* è stata correlata da numerosi studi ad infarto del miocardio e a malattie cardiache croniche^{9,14,15}.

Questi studi presentano numerose variabili, inclusi il titolo anticorpale delle immunoglobuline specifiche rilevato, il numero dei pazienti esaminati e la correlazione con altri fattori di rischio quali fumo e fattori socio-economici¹⁶⁻¹⁸. Inoltre la mancanza di metodi sierologici standardizzati, variazioni interlaboratorio e, non ultima, la scarsa riproducibilità della microimmunofluorescenza, rendono confusa, a volte, l'interpretazione dei dati di laboratorio riscontrati da alcuni autori¹⁹⁻²¹. La presenza di anticorpi che nell'età adulta si può rilevare anche nel 50% dei soggetti studiati, è un ulteriore fattore che complica l'interpretazione dei risultati¹⁴.

Negli ultimi anni oltre 38 studi hanno riportato l'associazione tra presenza di anticorpi anti-*C. pneumoniae*, aterosclerosi e malattie coronariche.

Le prime evidenze sull'associazione tra *C. pneumoniae* e aterosclerosi sono riportate nel 1988 da Saikku et al.²² in Helsinki, Finlandia. Questi autori hanno riscontrato un titolo IgG ≥ 128 e/o IgA ≥ 32 in pazienti con infarto acuto del miocardio e in pazienti con malattie coronariche. In seguito gli stessi autori hanno studiato un ulteriore gruppo di pazienti (Helsinki Heart Study) con iperlipidemia e nessuna precedente esperienza di malattie cardiache. Questi pazienti ricevettero gemfibrozil o placebo e furono controllati nel tempo per lo sviluppo di infarto del miocardio o decesso per cause cardiovascolari. I pazienti sieropositivi per *C. pneumoniae* avevano un rischio 2.6 volte maggiore di patologie cardiache rispetto ai soggetti sieronegativi²³.

Uno studio condotto dall'Atherosclerosis Risk in Communities Study ha correlato titoli anticorpali (IgG ≥ 64) rivolti contro la *C. pneumoniae* con malattie cardiache, ma la relazione non veniva trovata tenendo conto di tutti i fattori di rischio delle malattie cardiovascolari²⁴. Tali studi furono in seguito confermati da altri autori²⁵⁻²⁹.

Kontula et al.³⁰ hanno valutato pazienti affetti da ipercolesterolemia familiare eterozigoti per la mutazione North Karelia. La presenza di malattie coronariche fu significativamente associata alla presenza di elevati titoli anticorpali sia per le IgG che per le IgA, nei confronti di *C. pneumoniae*. Al contrario, non fu riscontrata alcuna associazione statisticamente significativa tra i pazienti con ipercolesterolemia familiare e il gruppo di controllo.

Leinonen e Saikku³¹ studiarono gemelli omozigoti e trovarono IgA anti-*C. pneumoniae* e una risposta immunitaria cellulo-mediata (misurata con test di linfoproliferazione) più bassa nei gemelli fumatori che nei corrispondenti gemelli non fumatori. Gli autori conclusero che i fumatori sono soggetti a rischio di contrarre infezioni croniche da *C. pneumoniae*. Roivainen et al.³² trovarono alti livelli anticorpali anti-HSV-1 e *C. pneumoniae* in pazienti con infarto del miocardio o in pazienti deceduti per infarto. I valori di PCR erano significativamente più elevati e associati al fumo e a più alti livelli anticorpali. Lindholt et al.³³ trovarono una sieroprevalenza per *C. pneumoniae* nel 43-83% dei pazienti con aterosclerosi. Sulla base del titolo anticorpale venne riscontrata un'associazione tra *C. pneumoniae* e aterosclerosi. Korner et al.³⁴ trovarono che il 24% dei pazienti con aterosclerosi delle arterie degli arti inferiori e il 52.3% dei controlli non avevano anticorpi contro l'LPS di *C. pneumoniae*, mentre il 45.1% dei pazienti e il 16.9% dei controlli avevano anticorpi (IgG e IgA) specifici per *C. pneumoniae* ed i titoli anticorpali risultavano più elevati nel gruppo di pazienti con aterosclerosi rispetto al gruppo di controllo. Varveri et al.³⁵ trovarono IgG anti-*C. pneumoniae* a titoli ≥ 32 nel 38% del gruppo di controllo, nel 58.3% dei pazienti con infarto acuto del miocardio e nel 42.8% dei pazienti con cardiopatia ischemica cronica ($p < 0.05$ e $p < 0.01$ rispettivamente). IgA erano presenti a titolo ≥ 8 nel 22% del gruppo di controllo, nel 31.9% del gruppo con infarto acuto e nel 33.3% dei pazienti con malattia ischemica cronica del miocardio e progressione dell'aterosclerosi. Ossewaarde et al.³⁶, in uno studio condotto in Olanda, hanno osservato che elevati titoli anticorpali anti-*C. pneumoniae* valutati con metodica immunoenzimatica allestita nel loro laboratorio erano associati a rischio di malattia coronarica e questa associazione era più stringente in pazienti che sviluppavano sia infarto del miocardio che angina pectoris rispetto a quelli che svilupparono solo una di queste patologie. Questa associazione non fu rilevata per *Helicobacter pylori* e CMV.

Va segnalato che l'associazione tra sieropositività per *C. pneumoniae* e aterosclerosi non è stata confermata da tutti gli studi³⁷⁻³⁹. Miettinen et al.⁴⁰ trovarono un'associazione tra presenza di anticorpi anti-*C. pneumoniae* e malattie coronariche in pazienti che vivevano nella Finlandia orientale e non in altri pazienti che vivevano nella zona occidentale della Finlandia.

Hoffmeister et al.⁴¹ hanno trovato che la prevalenza di anticorpi (IgG) contro l'LPS di *C.* (LPS è comune a

tutte le tre specie di *C.* conosciute: *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *C. trachomatis*) non era significativamente differente nei pazienti affetti da stenosi coronarica e nei controlli (61 vs 62%, $p = 0.7$). Gli stessi dati furono ottenuti per la sieroprevalenza nei confronti della *C. pneumoniae* (88 vs 87%) ed i marcatori dell'infiammazione (PCR, fibrinogeno, velocità di eritrosedimentazione, conta e formula leucocitaria) che non furono differenti nei due gruppi esaminati. Gli autori concludevano che non vi è associazione tra *C. pneumoniae* e malattie cardiache e che l'incremento dei marcatori dell'infiammazione in pazienti con malattie coronariche non si correla né alla positività per anticorpi anti-LPS né a quella per *C. pneumoniae*. Nieto et al.⁴² trovarono che il 65% di pazienti con malattie coronariche avevano anticorpi anti-*C. pneumoniae* (IgG $\geq 1:64$) contro il 55% dei controlli ($p < 0.01$). Se invece si teneva conto dell'età, sesso, fumo, colesterolo, ipertensione, diabete, stato sociale, le differenze non risultavano significative.

Uno studio condotto in Italia da Colizzi et al.⁴³, presso l'Istituto di Cardiologia dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma, non ha rilevato alcuna relazione tra sieropositività per CMV, *Helicobacter pylori* e *C. pneumoniae* e incremento nella produzione di IL-6 da parte di monociti stimolati con LPS in pazienti con angina instabile. Ridker et al.³⁹ studiarono un gruppo di donne sane in postmenopausa. IgG anti-*C. pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, HSV, CMV furono ricercati in 122 donne che in seguito ebbero un evento cardiovascolare e in 244 che non riportarono alcun evento cardiovascolare nei 3 anni di follow-up. Gli autori non trovarono alcuna associazione tra rischio cardiovascolare e presenza di anticorpi rivolti contro ciascuno dei precedenti microrganismi. Risultati analoghi sono stati ottenuti da Coles et al.⁴⁴ che non trovarono differenza tra presenza di IgG o IgA anti-*C. pneumoniae* nel gruppo di controllo e in pazienti con aterosclerosi carotidea e da Altman et al.⁴⁵ che, in uno studio condotto in Buenos Aires, Argentina, hanno dimostrato che IgG erano presenti nel 67.3% dei pazienti con malattie a carico delle arterie coronarie e nel 59.1% dei pazienti con protesi valvolari e senza malattie coronariche. Nessuna associazione tra infezione da *C. pneumoniae* e malattie coronariche è stata riscontrata nello studio di Nobel et al.⁴⁶. Ancora più recentemente uno studio ha dimostrato che durante i 5 anni di follow-up, malattie cardiovascolari si verificavano nel 16.8% dei soggetti e che la sieropositività per *C. pneumoniae*, ma non per *Helicobacter pylori* e CMV, aumentava il rischio di malattie cardiovascolari³⁶.

I dati relativi ad alcuni di questi studi sono riportati nella tabella I^{22,23,27,30,32,35,36,38-42,44-48}.

Molti studi hanno dimostrato un'associazione tra elevati titoli anticorpali IgA piuttosto che IgG anti-*C. pneumoniae* e rischio di aterosclerosi. Infatti Strachan et al.⁴⁷ hanno dimostrato su 1773 pazienti un'associazione tra presenza di IgA anti-*C. pneumoniae*, considerata un marker di infezione cronica, e rischio di morte

Tabella I. Studi sull'associazione tra *Chlamydia pneumoniae* e malattia coronarica.

Autori	N. pazienti	Patologia	Metodo sierologico	Titoli anticorpali	Positività (%)	Controlli (%)	Associazione
Saikkou et al. ²² , 1988	70	IMA, MC	MIF (AR39)	IgG ≥ 32, e/o IgA ≥ 32	IgG ≥ 32: 85 IMA, 87 MC, IgG ≥ 128: 50 IMA, 47 MC IgA ≥ 32: 45 IMA, 37 MC IgG ≥ 64: 22	61 15 10 13	Sì Sì Sì Sì
Thom et al. ²⁷ , 1991	461	MC	MIF (TWAR)	IgG ≥ 8	IgG: 78, IgA: 49	IgG: 76, IgA: 41	Sì per titoli ≥ 64 Sì/no
Saikkou et al. ²³ , 1992	103	MC	MIF (TWAR 183)	IgG ≥ 32, IgA ≥ 16	IgG: 32	15	Sì/no
Miettinen et al. ⁴⁰ , 1996	202	Rischio di IMA	MIF (Kajaani 6)	IgG ≥ 128, IgA ≥ 40	Successivi eventi cardiovascolari: IgG: 8-32: 15; ≥ 64: 28	7	Sì
Gupta et al. ⁴⁸ , 1997	220	Soppravvissuti dopo IMA	MIF (IOL-207)	IgG ≥ 8			
Ossewaarde et al. ³⁶ , 1998	54	MC	EIA (TWAR 183)	IgG ≥ 3200, IgA ≥ 3200	IgG ≥ 3200: 51.9, IgA ≥ 3200: 16.7	IgG: 34.3, IgA: 24.4	Sì per IgG
Varveri et al. ³⁵ , 1998	114	IMA, MC	MIF	IgG ≥ 32, IgA ≥ 8	IgG ≥ 32: 58.3 (IMA), 42.8 (MC); IgA ≥ 8: 31.9 (IMA) e 33.3 (MC)	IgG: 38, IgA: 22	Sì
Strachan et al. ⁴⁷ , 1999	1773	Nessuna	MIF (TWAR 183)	IgG ≥ 16, IgA ≥ 16	IgG: 36.2, IgA: 20.4	Non inclusi	Sì per IgA (decesso per IMA)
Nieto et al. ⁴² , 1999	246	MC	MIF (TWAR 183)	IgG ≥ 8	IgG ≥ 64: 65	55	No
Nobel et al. ⁴⁶ , 1999	58	IMA o angina instabile	MIF	IgG ≥ 8	37.8	41.4	No
Coles et al. ⁴⁴ , 1999	993	IMA	MIF (TWAR 183)	IgG ≥ 32, IgA ≥ 8	IgG: 61, IgA: 29	IgG: 58, IgA: 33	No
Ridker et al. ³⁸ , 1999	343	IMA	MIF (TWAR183)	IgG ≥ 16	IgG ≥ 16: 69.4	67.4	No per rischio di infarto net successivi 12 anni
Kontula et al. ³⁰ , 1999	50	IMA o MC in pazienti con IF	NS	IgG ≥ 128, IgA ≥ 10	46 (MC)	NS	Sì
Altman et al. ⁴⁵ , 1999	362	MC e PV	MIF (CCDC/CWL-029)	IgG ≥ 32	67.3 (MC), 59.1 (PV)	NS	No
Ridker et al. ³⁹ , 1999	122	Donne sane in menopausa	MIF	IgG ≥ 16	38	35.3	No
Roivainen et al. ³² , 2000	241	IMA	MIF (Kajaani 6)	IgA ≥ 40	NS	NS	Sì (aumento PCR)
Hoffmeister et al. ⁴¹ , 2000	312	Stenosi coronarica	EIA (LPS) e MIF	IgG ≥ 64, IgA ≥ 16	IgG: 87.4, IgA: 38.1	IgG: 86.2, IgA: 35.3	No

EIA = test immunoenzimatico; IF = ipercolesterolemia familiare; IMA = infarto miocardico acuto; LPS = lipopolisaccaridi; MC = malattia coronarica; MIF = microimmunofluorescenza; NS = non specificato; PCR = proteina C reattiva; PV = protesi valvolari.

per ischemia cardiaca. Tale associazione non fu trovata per anticorpi della classe IgG. Una forte risposta immunitaria sia cellulo-mediata che umorale è stata dimostrata in pazienti con aterosclerosi, e sembra che il ceppo di *C. pneumoniae* AR39 possa essere più frequentemente implicato nell'aterosclerosi⁴⁹. Peraltro altri lavori condotti in Finlandia trovarono un'associazione tra aumento di IgG (ma non delle IgA anti-*C. pneumoniae*) e mortalità dovuta a infarto⁵⁰.

Nella maggior parte degli studi riportati, la ricerca di anticorpi anti-*C. pneumoniae* è stata eseguita con la metodica di microimmunofluorescenza che è considerata il *gold standard* per la valutazione della presenza di anticorpi specifici per *C. pneumoniae*. Comunque, per una corretta valutazione della lettura al microscopio a fluorescenza, è necessario un esperto operatore; questa variabilità della lettura operatore-dipendente rende la riproducibilità del test abbastanza critica. Inoltre i vari lavori sulla sieroprevalenza si basano su differenti valutazioni del titolo anticorpale da considerare "positivo" per *C. pneumoniae*, il che rende difficile il paragone tra tutti questi studi. Inoltre vi è discordanza nei titoli considerati positivi dai vari autori per *C. pneumoniae*. Infatti in alcuni studi un titolo in IgG e/o IgA ≥ 64 è utilizzato come indice di infezione cronica; in altri studi gli stessi criteri sono stati utilizzati per stabilire un'infezione pregressa.

In genere la presenza di IgA è indicativa di un'infezione ricorrente/persistente, mentre il titolo in IgG è suggestivo di un'infezione cronica o pregressa. La presenza di IgM anti-*C. pneumoniae* è indicativa di un'infezione acuta. Va detto che in nessuno dei lavori sieroepidemiologici che sono stati precedentemente riportati sono stati ricercati e/o trovati anticorpi di questa classe. Peraltro questi anticorpi (IgM) sono di non frequente riscontro in pazienti con infezioni acute delle vie respiratorie (nella nostra esperienza in meno di 10 pazienti su una casistica di oltre 10 anni). Il paragone tra i diversi studi condotti per trovare l'associazione tra infezione da *C. pneumoniae* e aterosclerosi e/o infarto acuto del miocardio è reso ancora più difficoltoso dal fatto che alcuni autori hanno utilizzato un metodo immunoenzimatico per la ricerca di anticorpi anti-*C. pneumoniae* che, sebbene si correli in oltre il 90% dei casi con i risultati della microimmunofluorescenza e la lettura non sia legata all'esperienza dell'operatore, è considerato meno riproducibile di altre metodiche.

Determinazione di *Chlamydia pneumoniae* o di suoi antigeni nelle lesioni aterosclerotiche

C. pneumoniae ed i suoi componenti (DNA, antigeni) sono stati dimostrati nelle placche aterosclerotiche con varie metodiche.

Il primo studio che dimostrò la presenza di *C. pneumoniae* nelle placche aterosclerotiche presenti a livello delle arterie coronarie si deve a Shor et al.⁵¹ in Sud Afri-

ca nel 1992. Al microscopio elettronico i campioni prelevati dalle placche dimostrarono la presenza di strutture con aspetto piriforme che fecero pensare alla presenza di corpi elementari di *C. pneumoniae*. Alcuni furono esaminati anche con tecnica di immunoperossidasi con anticorpi monoclonali genere-specifici per *C.*, specie-specifici per *C. pneumoniae* e per *C. trachomatis* e risultarono positivi. Da allora altri studi hanno dimostrato che DNA e proteine di *C. pneumoniae* possono essere identificati in varie arterie: coronarie, carotidi, aorta, femorali.

Successivamente Kuo et al.⁵² riportarono ulteriori dati sulla possibile associazione di *C. pneumoniae* con aterosclerosi coronarica. La *C. pneumoniae* fu evidenziata con immunoperossidasi nel 42% dei casi studiati, con reazione polimerasica a catena nel 43% e con microscopia elettronica nel 29%. I tentativi di isolare la *C.* dalle lesioni non furono coronati da successo.

Presenza di *C. pneumoniae* nelle placche aterosclerotiche fu dimostrata da altri studi condotti in Seattle⁵³⁻⁵⁵ e da Ong et al.⁵⁶.

Weiss et al.⁵⁷ esaminarono ateromi di coronarie mediante coltura (tutti risultarono negativi) e mediante reazione polimerasica a catena (un campione positivo su 56 prelevati in 50 pazienti). Altri campioni osservati al microscopio elettronico non evidenziarono strutture riferibili a *C. pneumoniae* ma in tutte furono osservate le tipiche cellule schiumose e accumuli di colesterolo. Esami culturali negativi per *C. pneumoniae* furono riportati da Kuo et al.⁵².

Dopo questi studi ne sono stati condotti numerosi altri (sono riportati 40 lavori tra il 1992 e il 2000) volti ad evidenziare *C. pneumoniae* con vari metodi nelle placche aterosclerotiche (isolamento, reazione polimerasica a catena, immunoistochimica, microscopia elettronica); alcuni hanno riscontrato la *C. pneumoniae* sin nel 50% delle lesioni ateromatose vs il 5% di tessuti non ateromatosi; questi dati sono stati confermati da altre ricerche⁵⁸⁻⁶⁶. Johnson et al.⁶⁷ non hanno evidenziato, mediante reazione polimerasica a catena, presenza di *C. pneumoniae* in 99 campioni di placche (prelevate da carotidi e coronarie) di 68 pazienti con aterosclerosi coronarica e/o malattie cerebrovascolari.

Ancora più recentemente Hoymans et al.⁶⁸ non hanno trovato alcuna associazione tra presenza (valutata mediante reazione polimerasica a catena) di *C. pneumoniae* in leucociti periferici, ed i livelli di PCR e le dimensioni delle placche aterosclerotiche delle coronarie in 203 pazienti sottoposti ad angiografia coronarica.

Queste differenze sono da attribuire probabilmente alle diverse metodiche utilizzate, ai controlli, all'età dei pazienti, alla soggettività dell'interpretazione, al non facile isolamento di *C. pneumoniae* dai vari tessuti, incluse le placche aterosclerotiche, al differente numero di segmenti di arteria valutato.

Recenti lavori segnalano la presenza di *C. pneumoniae* in altri tessuti quali polmoni, fegato, milza, linfonodi e tessuti di granulazione e pertanto secondo l'ipo-

tesi dell'“innocent bystander” la *C. pneumoniae* può semplicemente essere rilasciata dal tratto respiratorio attraverso monociti circolanti (nei quali è stata peraltro dimostrata la presenza di *C. pneumoniae*) a livello della placca dove il microrganismo può risiedere in uno stato dormiente senza intervenire direttamente nell'aterogenesi e nell'aterotrombosi⁶⁹.

Studi sperimentali in animali

Ancora oggi, per stabilire una relazione causale tra un microrganismo e un determinato processo infettivo, devono essere verificati i postulati di Koch, e cioè:

- il microrganismo deve essere sempre presente e coltivabile dai tessuti infetti;
- l'agente infettivo inoculato in un ospite sensibile deve causare quella stessa malattia;
- il microrganismo deve essere isolato dai tessuti dell'ospite infettato.

Già nel 1931 Benson et al.⁷⁰ dimostrarono nei conigli un'associazione tra infezione streptococcica e aterosclerosi e nel 1973 Fabricant et al.⁷¹ riportarono una simile relazione anche in pulcini infettati con herpes virus; più recentemente Fong et al.⁷² riportarono che conigli infettati con *C. pneumoniae* sviluppavano polmonite e che alcuni sviluppavano lesioni aterosclerotiche di grado III a livello dell'aorta.

In vari modelli animali l'infezione sperimentale del tratto respiratorio con *C. pneumoniae* induce la comparsa di lesioni aterosclerotiche o accelera la progressione dell'aterosclerosi nelle aorte^{73,74}. Studi sulla formazione delle placche sia in conigli che in topi hanno dimostrato una relazione tra *C. pneumoniae* ed elevate concentrazioni lipidiche nel siero suggerendo che la dieta e/o fattori genetici possono giocare un ruolo anche nell'aterosclerosi indotta da *C. pneumoniae*⁷⁵⁻⁷⁷.

Negli studi animali, inoltre, è stato dimostrato che un'appropriata terapia antibiotica può ridurre e a volte prevenire la formazione dell'ateroma a livello dell'aorta^{78,79}.

Nei conigli è stato dimostrato che l'infezione sperimentale da *C. pneumoniae* può stimolare la dilatazione dell'aorta attraverso il richiamo e l'attivazione dei macrofagi e una risposta infiammatoria antigene-mediata; questi effetti possono ridursi con il trattamento con azitromicina^{80,81}.

Hu et al.⁷⁵ hanno dimostrato che in topi con riduzione di recettori per le LDL, l'infezione da *C. pneumoniae* AR39 o da *C. trachomatis* non induceva aterosclerosi dell'aorta entro 9 mesi dall'infezione. Invece, in presenza di una dieta ricca di colesterolo, l'infezione da *C. pneumoniae* AR39 incrementava l'aterosclerosi indotta dall'ipercolesterolemia confermando che l'ipercolesterolemia favorisce lo sviluppo di aterosclerosi da *C. pneumoniae*; inoltre il ceppo di *C. pneumoniae* AR39 rispetto a *C. trachomatis* era capace di formare

lesioni aterosclerotiche più estese. Si parlerà in futuro di “ceppi aterogenici” di *C. pneumoniae*?

Va comunque detto che questi studi non sono stati confermati da tutti gli autori. Recenti esperimenti sul topo, infatti, non hanno rilevato la relazione tra *C. pneumoniae* e aterosclerosi^{82,83}.

Ancora più recentemente Blessing et al.⁸⁴ hanno dimostrato che la *C. pneumoniae* non accelera lo sviluppo di aterosclerosi in topi sottoposti ad una dieta ricca in grassi e colesterolo, indicando che la *C. pneumoniae* può rappresentare un co-fattore dell'iperlipidemia per lo sviluppo di malattie cardiovascolari.

Recentemente Muhlestein et al.⁷⁸ hanno valutato 30 conigli che avevano ricevuto un supplemento di colesterolo nella dieta. Dieci furono inoculati con soluzione fisiologica per via intranasale, 10 con 3 inoculazioni successive di *C. pneumoniae* e altri 10 con *C. pneumoniae* seguita da somministrazione di azitromicina. Dopo 3 mesi le loro aorte furono esaminate e fu dimostrato che l'infezione da *C. pneumoniae* accelera lo sviluppo di aterosclerosi nell'aorta rispetto ai controlli e ai conigli protetti dal trattamento con azitromicina.

Usando topi deficienti in apolipoproteina si è dimostrato che l'infezione con *C. pneumoniae* accelera la progressione dell'aterosclerosi nell'aorta⁸⁵.

Campbell et al.⁷⁷ hanno dimostrato che infettando per via respiratoria con *C. pneumoniae* topi C57Bl65, il batterio si replicava nei macrofagi alveolari e peritoneali e che i macrofagi, come il cavallo di Troia, disseminavano il germe per via ematogena e/o linfatica in altri tessuti inclusa l'aorta; inoltre gli autori riuscirono a trasmettere l'infezione ad altri topi mediante il trasferimento di macrofagi infettati da *C. pneumoniae*. Gli autori hanno dimostrato che in topi apolipoproteina E-deficienti, *C. pneumoniae* dissemina, dopo inoculazione intravasale, nella milza, aorta e cute. Inoltre la *C. pneumoniae* persiste nell'aorta e nelle lesioni ateromatose per lungo tempo e inoculazioni ripetute di *C. pneumoniae* risultano in accumulo di cellule schiumose e nella proliferazione di cellule muscolari lisce nell'aorta.

Fong et al.⁸⁶ hanno dimostrato che, in conigli infettati sperimentalmente con *C. pneumoniae*, il trattamento con claritromicina comporta l'eradicazione dell'infezione e riduce la formazione delle lesioni ateromatose. Inoltre una terapia precoce (entro 5 giorni dopo ciascuna infezione sperimentale) risulta più efficace rispetto al trattamento iniziato dopo 2 settimane dall'infezione sperimentale.

In conclusione, studi sugli animali hanno contribuito a far luce sui meccanismi patogenetici dell'aterosclerosi associata a *C. pneumoniae*, sul ruolo dei fattori legati all'ospite (dieta, iperlipidemia, ecc.) e della terapia antibiotica. È stato dimostrato che negli animali la *C. pneumoniae* può persistere a lungo dopo terapia suggerendo che nell'uomo una terapia prolungata potrebbe essere più efficace.

Effetto della terapia specifica

Sono stati condotti numerosi studi al fine di valutare, in soggetti con sierologia positiva per *C. pneumoniae*, l'effetto di una terapia antibiotica mirata su eventi cardiovascolari. Gupta et al.⁴⁸ in Inghilterra hanno studiato 60 soggetti che avevano superato un episodio di infarto acuto del miocardio e con elevati e persistenti titoli anticorpali (IgG \geq 64). Alcuni ricevettero placebo e altri azitromicina (500 mg/die per 3 e 6 giorni). Gli autori dimostrarono, nei pazienti trattati, una riduzione negli eventi cardiovascolari dopo 18 mesi e una riduzione dei marker della risposta infiammatoria e nel titolo delle IgG anti-*C. pneumoniae*.

In un altro studio il trattamento con azitromicina (500 mg/die per 3 giorni seguito da 500 mg/settimana per 3 mesi) non era associato a riduzione di episodi ischemici (morte, infarto, angina instabile). Erano inclusi nello studio soggetti sieropositivi per *C. pneumoniae* a titolo \geq 16. A 24 mesi si osservò una riduzione dei marker dell'infiammazione [PCR, IL-6, fattore di necrosi tumorale (TNF)- α] ma non una riduzione del titolo anticorpale anti-*C. pneumoniae*⁸⁷. Analoghi studi riportati da Jackson et al.⁸⁸ dimostrarono che, sebbene l'azitromicina sia ben tollerata, non riduce il titolo anticorpale (IgG e IgA). Dati analoghi sono stati riportati da Sinisalo et al.⁸⁹ che invece hanno utilizzato la doxiciclina per 4 mesi (100 mg/die). Inoltre questi autori non hanno rilevato alcuna riduzione nei valori di PCR, nei livelli di colesterolo, di lipoproteine ad alta densità e di LDL. Torgano et al.⁹⁰ hanno trattato con claritromicina (500 mg 2 volte al giorno per 14 giorni) soggetti sieropositivi per *C. pneumoniae* (IgG \geq 64) e hanno riscontrato una riduzione sia del titolo anticorpale che dei livelli plasmatici di fibrinogeno. Semaan et al.⁹¹ hanno utilizzato azitromicina (500 mg/die per 3 giorni e quindi 2 volte alla settimana per 3 mesi) senza osservare alcuna riduzione dei livelli plasmatici dei marcatori solubili di attivazione delle cellule endoteliali, delle molecole di adesione intercellulare (ICAM-1), delle molecole di adesione alle cellule vascolari (VCAM-1) e di E-selectina.

Sono stati condotti e sono in corso numerosi studi che utilizzano diversi schemi terapeutici. Gurfinkel et al.^{92,93} (ROXIS Pilot Study, roxitromicina nella sindrome ischemica) hanno trattato con roxitromicina (150 mg 2 volte al giorno per 30 giorni) pazienti ospedalizzati per angina instabile o infarto acuto non Q (i pazienti erano in classe IIIb di Braunwald) riportando, ad 1 mese, una riduzione di angina ricorrente, infarto acuto, morte per ischemia, mentre a 3 e a 6 mesi l'effetto positivo della terapia si riduceva suggerendo la necessità di utilizzare schemi terapeutici di maggior durata. È noto che la *C. pneumoniae* può persistere a lungo anche dopo terapia, pertanto una terapia prolungata potrebbe essere più efficace. La roxitromicina si è rivelata utile nel ridurre la carica batterica nelle lesioni aterosclerotiche⁹⁴ e uno studio su 3315 pazienti e 13 139 controlli,

condotto nel Regno Unito da Meier et al.⁹⁵, ha dimostrato un'associazione tra precedente uso di tetraciclina o chinolonici ma non di macrolidi e riduzione del primo episodio di infarto del miocardio. Un altro studio su 1796 casi ha rilevato come l'uso, in passato, di eritromicina e di tetraciclina non si associ ad un rischio di un primo episodio di infarto acuto del miocardio⁹⁶.

In un secondo studio (ACADEMIC - Azithromycin in Coronary Artery Disease: Elimination of Myocardial Infection with Chlamydia) sono stati studiati 302 pazienti con titoli anticorpali anti-*C. pneumoniae* e malattia coronarica. Alcuni pazienti ricevettero azitromicina per 3 mesi e non fu osservata alcuna differenza sull'esito clinico a 6 mesi e 2 anni mentre si notò una riduzione dei marker dell'infiammazione, quali PCR, IL-1, IL-6, e TNF- α , a 6 mesi^{87,97}. Un terzo studio (ISAR-3 - Intracoronary Stenting and Antibiotic Regimen Trial-3) ha trattato 506 pazienti con roxitromicina (300 mg/die per 28 giorni) e 504 con placebo. Non fu riscontrata alcuna differenza nell'incidenza di stenosi e di mortalità. La roxitromicina riduceva solo la percentuale di ristrenosi dopo stenting coronarico⁹⁸.

Altri studi sono in corso:

- WIZARD (Weekly Intervention with Zithromax in Atherosclerosis-Related Disorders) studia soggetti con IgG \geq 16 trattati con azitromicina 600 mg 4 volte al giorno per 3 giorni e poi 600 mg 1 volta alla settimana⁹⁹;
- MARBLE (Might Azithromycin Reduce Bypass-List Events?): azitromicina 600 mg/die per 3 giorni seguiti da 600 mg/settimana per 3 mesi¹⁰⁰;
- AZACS (Azithromycin in Acute Coronary Syndromes);
- ACES (Azithromycin and Coronary Events Study): terapia con azitromicina 600 mg alla settimana per 1 anno¹⁰¹;
- CLAINF (Chlamydia pneumoniae and Myocardial Infarction) e PROVE-IT (Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy): lo studio è attualmente in corso¹⁰²⁻¹⁰⁴;
- STAMINA (The South Thames Trial of Antibiotics in Myocardial Infarction and Unstable Angina): 325 pazienti con infarto acuto del miocardio o angina instabile furono trattati per 1 settimana con antibiotici attivi su *Helicobacter pylori* e *C. pneumoniae* (amoxicillina o azitromicina + metronidazolo + omeprazolo). Il trattamento con questi regimi terapeutici riduce significativamente (ad 1 anno) l'incidenza di morte o di successivi episodi cardiovascolari ma questo effetto fu indipendente dalla sieropositività per *Helicobacter pylori* o *C. pneumoniae*¹⁰⁵.

I principali studi condotti in questo campo sono riportati nella tabella II^{48,87-92,98-101,105}.

Le discrepanze tra i risultati ottenuti tra i vari studi sono da attribuire a vari fattori quali un inadeguato dosaggio e durata della terapia. Non va sottovalutato anche il rischio che la somministrazione di azitromicina 1 volta alla settimana può comportare il raggiungimento

Tabella II. Trial clinici per la prevenzione di malattie cardiovascolari.

Autori e studio	Patologia	Sierologia	N. pazienti	Terapia	Esito	Risultati trattati vs non trattati	Riduzione del titolo anticorpale
Gupta et al. ⁴⁸	Precedente IMA	MIF IgG ≥ 64	60	Azitromicina 500 mg/die × 3 giorni + 500 mg/die × 6 giorni	Riduzione eventi cardiovascolari e marker della risposta infiammatoria	8 vs 25%, p = 0.03 a 18 mesi	Si
Muhlestein et al. ⁸⁷ (ACADEMIC Study)	Precedente IMA o bypass	MIF ed ELISA IgG ≥ 16	302	Azitromicina 500 mg/die × 3 giorni + 500 mg/settimana × 3 mesi	Riduzione di PCR, IL-6, TNF-α, IL-1, riduzione di IMA	Riduzione dei marker della risposta infiammatoria. Non riduzione di episodi ischemici 14.6 vs 16.4%, p = 0.74 a 24 mesi	No
Jackson et al. ⁸⁸	Rivascolarizzazione coronarica	MIF IgG ≥ 8, IgA ≥ 8	71	Azitromicina 500 mg × 2 giorni + 250 mg × 26 giorni	Riduzione dei titoli anticorpali	Nessun effetto a 6 mesi	No
Siniscalco et al. ⁸⁹	Precedente bypass coronarico	MIF IgG ≥ 32, IgA ≥ 16	34 (17 trattati)	Doxiciclina 100 mg/die × 4 mesi	Riduzione dei fattori di rischio (ossido nitrico, HDL, VES, PCR)	Nessun effetto	No
Torgano et al. ⁹⁰	Ischemia cardiaca	MIF IgG ≥ 64, IgA ≥ 32	43	Claritromicina 1000 mg/die × 14 giorni	Riduzione del fibrinogeno	Si a 6 mesi	Si
Gurfinkel et al. (ROXIS) ⁹²	Angina instabile, IMA	Non considerata	202 (102 trattati)	Roxitromicina 150 mg bid × 1 mese	Malattie cardiovascolari	Riduzione eventi cardiovascolari	Non valutata
Semaan et al. ⁹¹	Malattia coronarica	MIF IgG > 16	40	Azitromicina 500 mg/die × 3 giorni + 500 mg 2 volte alla settimana × 3 mesi	Riduzione ICAM-1, VCAM-1, E-selectina	Nessun effetto	Non valutata
Neumann et al. ⁹⁸ (ISAR-3)	Impianto di stent coronarico	MIF IgG ≥ 32	506 trattati	Roxitromicina 300 mg/die × 28 giorni	Morte, IMA, ristenoosi coronarica	Riduzione di ristenoosi in pazienti con IgG ≥ 512 ad 1 anno	NS
Dunne et al. ⁹⁹ (WIZARD)	IMA	MIF IgG ≥ 16	3500	Azitromicina 600 mg/die × 3 giorni + 600 mg/settimana × 11 settimane	Morte, IMA, angina instabile	In corso	NS
Jackson et al. ¹⁰¹ (ACES)	IMA	MIF IgG ≥ 64	4000	Azitromicina 600 mg/settimana × 1 anno	MC e IMA	In corso	NS
Gupta et al. ¹⁰⁰ (MARBLE)	IMA	Non valutata	1300	Azitromicina 600 mg/die × 3 giorni + 600 mg/settimana × 3 mesi	Riduzione di eventi cardiovascolari	In corso	NS
Stone et al. ¹⁰⁵ (STAMINA)	IMA, angina instabile	Sieropositività per <i>H. pylori</i> e <i>C. pneumoniae</i>	600	Azitromicina × 1 settimana	Riduzione dei marker della risposta infiammatoria (fibrinogeno, PCR, IL-6) e di eventi cardiovascolari	Non osservata riduzione dei marker della risposta infiammatoria a 12 mesi	NS

HDL = lipoproteine ad alta densità; IAC =; ICAM = molecole di adesione intercellulare; IL = interleuchina; IMA = infarto miocardico acuto; MC = malattia coronarica; MIF = microimmunofluorescenza; NS = non specifico; PCR = proteina C reattiva; TNF = fattore di necrosi tumorale; VCAM = molecole di adesione alle cellule vascolari; VES = velocità di eritrosedimentazione.

di livelli plasmatici di azitromicina al di sotto della minima concentrazione inibente con insorgenza di resistenza in *C. pneumoniae* come è stato peraltro dimostrato per *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*¹⁰⁶. Inoltre questi bassi dosaggi possono non essere efficaci nell'eradicare, se presente, un'infezione cronica da *C. pneumoniae*.

La riduzione dei marker dell'inflammatione riportata da alcuni studi⁸⁷⁻⁹³ può essere il risultato dell'attività antinfiammatoria dei macrolidi e delle tetracicline¹⁰⁷. Recenti studi condotti *in vitro* confermano l'azione antinfiammatoria di questo gruppo di antibiotici; in cellule endoteliali umane infettate con *C. pneumoniae* e trattate con macrolidi, l'azitromicina riduce la produzione di IL-6 e di proteine chemiotattiche per i monociti mentre la roxitromicina causa una riduzione della produzione di IL-8¹⁰⁸.

Comunque, se studi condotti su di un esteso numero di soggetti dimostreranno che la terapia antibiotica riduce significativamente l'incidenza di malattie cardiache acute, sarà stato fatto un importante passo avanti nel trattamento di una malattia che colpisce un sempre maggior numero di soggetti nei paesi sviluppati.

Alcuni autori hanno ipotizzato che in futuro si potrebbe pensare ad un vaccino per la profilassi attiva dell'infezione da *C. pneumoniae* al fine di ridurre l'incidenza di malattie cardiovascolari. Il vaccino dovrà stimolare la risposta cellulo-mediata. Inoltre andranno individuati i ceppi di *C. pneumoniae* i cui antigeni dovrebbero essere utilizzati per l'allestimento dei vaccini nonché i soggetti da sottoporre a vaccinazione.

Meccanismi patogenetici

L'aterosclerosi è una malattia su base infiammatoria dovuta ad una risposta innescata da vari stimoli che porta al danno degli epitelii. La stessa infiammazione può portare a rottura della placca con gravi conseguenze sul piano clinico^{6,109}. Negli ultimi anni, come precedentemente detto, è stata avanzata l'ipotesi che agenti infettivi possano giocare un ruolo nell'aterogenesi attraverso eventi infiammatori. Probabilmente gli agenti infettivi interagiscono con altri classici e meglio conosciuti fattori di rischio, accelerando o contribuendo alla formazione della placca aterosclerotica. Vari agenti infettivi quali CMV, *Helicobacter pylori* sono stati chiamati in causa, ma per la *C. pneumoniae* il legame con questa patologia sembra essere stretto.

Il sistema HLA gioca un ruolo importante nella risposta immunitaria nelle malattie infettive. L'analisi del fenotipo HLA in pazienti affetti da angina instabile ha dimostrato che tra i soggetti HLA DR+ il fenotipo B4 è riscontrato più frequentemente in pazienti sieropositivi per *C. pneumoniae* e che sviluppano gravi complicanze ischemiche. L'infezione da *C. pneumoniae* può favorire la formazione dell'ateroma attraverso l'infezione dei monociti-macrofagi richiamati a livello delle vie respiratorie ma anche infettando direttamente le cellule endoteliali. Il processo che porta alla formazione di aterosclerosi ricorda per molti aspetti quello dell'infezione cronica indotta da alcuni microrganismi⁶. I meccanismi con cui la *C. pneumoniae* può contribuire all'aterogenesi sono schematizzati nella figura 1.

La *C. pneumoniae*, ma anche il CMV, possono infettare e moltiplicarsi nelle cellule della parete dei vasi (ma-

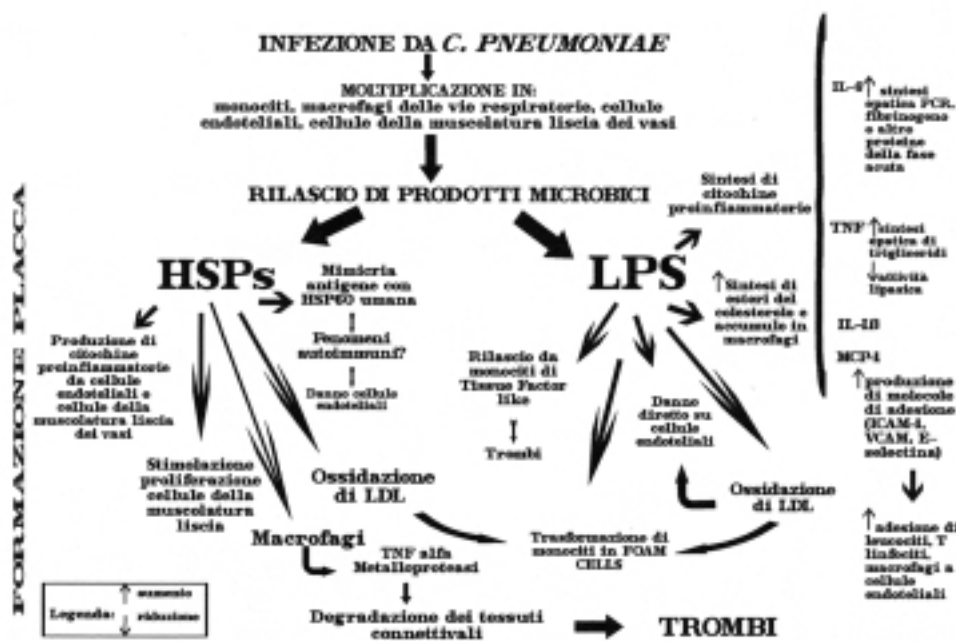


Figura 1. Ruolo della *Chlamydia pneumoniae* nella patogenesi dell'aterosclerosi. HSP = proteine dello shock termico; ICAM-1 = molecole di adesione intercellulare; IL = interleuchina; LDL = lipoproteine a bassa densità; LPS = lipopolisaccaridi; MCP-1 = proteina-1 chemiotattica per i monociti; PCR = proteina C reattiva; TNF = fattore di necrosi tumorale; VCAM = molecole di adesione alle cellule vascolari.

crofagi, cellule della muscolatura liscia e cellule endoteliali, tutte cellule che costituiscono la placca, con conseguenti infezioni persistenti, latenti o ricorrenti¹¹⁰⁻¹¹².

In particolare *C. pneumoniae* può anche essere trasportata, attraverso i monociti o i macrofagi, dalle vie respiratorie a distretti distanti. Corpi elementari di *C. pneumoniae*, attraverso le "major outer membrane proteins", possono favorire l'adesione dei monociti infetti circolanti alle cellule endoteliali delle coronarie e a cellule della muscolatura liscia¹¹³.

Il processo infettivo in sede extravascolare (apparato respiratorio) può indurre la sintesi di citochine infiammatorie quali IL-6, TNF- α , IL-1 β e chemochine quali la proteina-1 chemiotattica per i monociti che stimolano l'espressione di molecole di adesione quali ICAM-1, VCAM-1 ed E-selectina, molecole queste che favoriscono l'adesione dei leucociti alle pareti vasali. Alcuni di questi marker dell'infiammazione sono predittivi di rischio di futuri eventi cardiovascolari¹¹⁴⁻¹¹⁸.

Inoltre la sintesi di TNF- α indotta da *C. pneumoniae* incrementa la sintesi nel fegato di trigliceridi; in tal modo si spiega il pattern lipidico riscontrato in soggetti con malattia coronarica. Il TNF- α inoltre inibisce l'attività lipasica necessaria per la degradazione dei lipidi²⁴.

È stato dimostrato che IL-6 causa l'aumento delle concentrazioni plasmatiche di proteina C e di fibrinogeno, proteine della fase acuta la cui concentrazione, come è noto, aumenta in corso di eventi cardiovascolari¹¹⁹.

Un recente lavoro, condotto su 193 pazienti, ha dimostrato che la sieropositività per *Helicobacter pylori* e *C. pneumoniae* (IgA rivolte contro l'LPS di *C. pneumoniae*) era associata ad elevati livelli plasmatici di TNF- α mentre la sieropositività (IgG anti-LPS) era associata ad elevati livelli plasmatici di fibrinogeno. Tale associazione non fu riscontrata per la sieropositività per *Helicobacter pylori*. Sorprendentemente in soggetti sieropositivi sia per *C. pneumoniae* che per *Helicobacter pylori*, si riscontravano, rispetto ai controlli sieronegativi, più alti livelli plasmatici di TNF- α , PCR e fibrinogeno¹²⁰.

Autori giapponesi hanno dimostrato, studiando 200 soggetti sani non affetti da malattie cardiovascolari, che la sieropositività per *C. pneumoniae* era significativamente associata ad elevate concentrazioni plasmatiche di ICAM-1. Ciò potrebbe rappresentare un rischio per lo sviluppo di aterosclerosi in soggetti sieropositivi per *C. pneumoniae*¹²¹.

Le stesse citochine possono amplificare gli effetti attraverso una seconda ondata (effetto eco) della loro produzione da parte delle cellule (endoteliali e macrofagiche) infette già presenti nella placca in via di formazione⁸.

Le stesse citochine, ed in particolare l'IL-6, prodotte dalla risposta infiammatoria indotta dalla *C. pneumoniae* a livello delle vie respiratorie, stimolano la sintesi a livello epatico di proteine della fase acuta che possono favorire il processo dell'aterogenesi. È noto

che alte concentrazioni di fibrinogeno rappresentano un fattore di rischio per eventi coronarici^{6,9-11}.

Anche prodotti microbici circolanti quali LPS (la *C. pneumoniae* ha una parete cellulare tipo quella dei batteri gram-negativi) possono indurre sintesi di citochine proinfiammatorie. L'LPS (o endotossina) può danneggiare direttamente le cellule endoteliali e aumentare la sintesi di esteri del colesterolo che si accumulano nei macrofagi con formazione di cellule schiumose¹²². Inoltre l'LPS stimola i monociti a rilasciare un fattore procoagulante *tissue factor-like* che contribuisce alla formazione di trombi con ulteriore produzione di altri marker dell'infiammazione quali l'integrina CD11b.

Tutta la serie di eventi porta all'espressione di molecole di adesione che favoriscono l'adesione dei monociti, macrofagi e leucociti alle cellule endoteliali. I monociti ricchi di LDL ed i leucociti (soprattutto linfociti T e neutrofilii richiamati da varie chemochine) penetrano tra le cellule endoteliali, raggiungono gli spazi subendoteliali^{123,124} e qui l'LPS di *C. pneumoniae* può indurre non solo ossidazione delle LDL, che unitamente al rilascio di anione superossido rappresenta un ulteriore insulto tossico sull'endotelio, ma anche la trasformazione di monociti in cellule schiumose¹²⁵. A tal proposito Kalayoglu e Byrne¹²⁶ hanno dimostrato che l'LPS di *C. pneumoniae* (che peraltro è dotato di basso potere endotossico), promuove *in vitro* la formazione di macrofagi ricchi di lipidi.

Oltre all'LPS di *C. pneumoniae* altre molecole ed in particolare le proteine dello shock termico (HSPs) possono contribuire alla formazione delle lesioni aterosclerotiche.

Le HSPs sono proteine altamente conservate prodotte, *in vitro* e *in vivo*, da cellule batteriche e umane in seguito ad insulti quali calore, infezioni acute o croniche, e permettono alle cellule di reagire a questi stimoli avversi. È stato dimostrato, *in vitro*, che le HSPs di *C. pneumoniae* inducono nei macrofagi, nelle cellule endoteliali e della muscolatura liscia dei vasi ossidazione delle LDL: sia le HSPs umane che quelle di *C. pneumoniae* sono state riscontrate nei macrofagi presenti nella placca. Le stesse HSPs stimolano queste cellule a rilasciare citochine infiammatorie^{107,126,127}. In seguito al rilascio, a livello dei vasi, di tutta la serie di mediatori citati e di enzimi citotossici, nonché di LDL ossidate e di mediatori dell'infiammazione, inclusi fattori di crescita tissutali, si realizza, da parte delle cellule della muscolatura liscia delle arterie, una risposta fibroproliferativa che porta alla formazione della placca^{123,128}.

È stato dimostrato *in vitro* che l'infezione da *C. pneumoniae* delle cellule della muscolatura liscia stimola non solo la produzione di IL-6 ma anche di fattori di crescita dei fibroblasti (bFGF), risposta che contribuisce alla formazione della placca fibrosa aterosclerotica; il cloramfenicolo, un antibiotico capace di inibire la sintesi proteica nei batteri, è capace di inibire la produzione di IL-6 e di bFGF da parte di queste cellule infettate¹²⁹.

Ancora di recente è stato dimostrato che la *C. pneumoniae* in toto o la sua HSP60 stimola la proliferazione della muscolatura liscia vasale attraverso l'attivazione del sensore per l'HSP60 e il segnale è mediato dall'attivazione della proteinchinasi p44/p42¹³⁰.

Una volta formata la placca, questa può subire una serie di traumi.

Le HSP60 stimolano i macrofagi a produrre TNF- α e metalloproteine che degradano i tessuti connettivali promuovendo la rottura della placca con formazione di trombi che possono scatenare un evento acuto cardiovascolare. Ancora la *C. pneumoniae*, infettando monociti, macrofagi, cellule endoteliali, cellule della muscolatura liscia dei vasi stimola, da parte di queste cellule, la produzione non solo dei fattori proinfiammatori ma anche di fattori ad attività procoagulante (fattore tissutale, PAI-1, proteina-1 chemiotattica per i monociti) attraverso l'attivazione di fattori di trascrizione nucleare quali il *nuclear factor* (NF)- κ B¹³¹⁻¹³³.

Studi *in vitro* hanno dimostrato che l'aspirina causa una riduzione della moltiplicazione della *C. pneumoniae* in cellule endoteliali. Probabilmente questo effetto è mediato dall'inibizione, operata dall'aspirina, dell'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B da parte della *C. pneumoniae*. Questo effetto unitamente alla riduzione della produzione di IL-6 e di IL-8 da parte delle cellule endoteliali infettate, potrebbe contribuire alla ben nota attività cardioprotettiva dell'aspirina¹³⁴.

Il trattamento con eritromicina blocca la proliferazione delle cellule muscolari lisce stimolata dall'infezione sperimentale da *C. pneumoniae*¹³⁵. Ancora LPS batterici (e probabilmente anche di *C. pneumoniae*) unitamente al rilascio di TNF- α possono alterare il rilascio di ossido nitrico e di prostaciline alterando l'integrità dell'endotelio e causando trombi.

Recentemente è stato proposto che nella formazione della placca possano giocare un ruolo anche fenomeni autoimmuni. È stato dimostrato che le HSP di *C. pneumoniae* sono analoghe alle HSP60 umane^{136,137}. Una reazione autoimmunitaria può essere indotta dalle HSP di *C. pneumoniae* con danno alle cellule endoteliali e può contribuire alla cronicizzazione della risposta infiammatoria. In un recente studio un significativo aumento di anticorpi anti-HSP è stato riscontrato in pazienti con aterosclerosi della carotide¹³⁷.

Conclusioni

L'ipotesi secondo la quale la risposta infiammatoria indotta da batteri o virus possa contribuire direttamente o indirettamente all'aterosclerosi ha aperto nuovi orizzonti sulla patogenesi di questa malattia.

I numerosi studi condotti in varie parti del mondo, anche se con risultati discordanti, sembrano confermare che la *C. pneumoniae* potrebbe giocare un ruolo nella formazione o nella progressione (attraverso i meccanismi precedentemente ricordati) della placca atero-

sclerotica e nelle malattie coronariche che ne conseguono.

Gli studi condotti (anche in modelli animali) o ancora in corso sull'effetto della terapia antibiotica su successivi eventi cardiovascolari hanno dato risultati discordanti e spesso difficilmente comparabili tra di loro per vari motivi (numero di pazienti inclusi nello studio, differenti antibiotici, differenti schemi terapeutici e durata del trattamento, ma soprattutto i differenti criteri di sieropositività per *C. pneumoniae*).

I futuri studi dovranno essere condotti su di un gran numero di pazienti e si dovranno stabilire criteri rigidi per l'inclusione dei pazienti (quale titolo anticorpale considerare indicativo di infezione, l'uso di un'identica metodica per il rilevamento degli anticorpi, l'uso di uno stesso ceppo di *C. pneumoniae* da utilizzare come antigene), quali parametri valutare alla fine dello studio, i dosaggi e la durata della terapia. Se venisse ulteriormente confermato il ruolo della *C. pneumoniae* si potrebbero avere nuove armi terapeutiche per la prevenzione delle patologie a carico del sistema cardiovascolare.

Riassunto

Numerosi studi hanno dimostrato che l'infezione da *Chlamydia pneumoniae* può contribuire all'aterosclerosi e alle patologie che ne conseguono. La presente rassegna fa il punto sulle evidenze sperimentali che legano la *Chlamydia pneumoniae* a queste patologie.

Tali evidenze sperimentali si basano su: 1) studi di sieroprevalenza in soggetti con aterosclerosi e malattie coronariche; 2) dimostrazione di *Chlamydia pneumoniae* o di suoi componenti (antigeni, DNA) nelle lesioni aterosclerotiche; 3) studi in modelli sperimentali animali; 4) protezione delle complicanze dell'aterosclerosi associate a *Chlamydia pneumoniae* con terapia antimicrobica con macrolidi.

Parole chiave: Aterosclerosi; *Chlamydia pneumoniae*; Coronaropatia; Infarto miocardico.

Ringraziamenti

Si ringrazia la Sig.ra Raffaella Di Summa per la collaborazione nella stesura del manoscritto.

Bibliografia

1. Centers for Disease Control and Prevention. Achievements in public health, 1900-1999: decline in deaths from heart disease and stroke - United States, 1900-1999. Hyattsville, MD) US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, 1999: 649-56.
2. American Heart Association. 2001 Heart and stroke statistical update. Dallas, TX: American Heart Association, 2000.

3. Centers for Disease Control and Prevention. Chronic Disease Notes and Reports 1997; 10: 2-15.
4. Reddy KS, Yusuf S. Emerging epidemic of cardiovascular disease in developing countries. *Circulation* 1998; 97: 596-601.
5. Muhlestein JB. Bacterial infections and atherosclerosis. *J Investig Med* 1998; 46: 396-402.
6. Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-26.
7. Davies MJ. Pathology of coronary atherosclerosis. In: Alexander RW, Schlant RC, Fuster V, eds. *Hurst's the heart arteries, and veins*. New York, NY: McGraw-Hill, 1998: 1161-73.
8. Clinton SK, Fleet JC, Loppnow H, et al. Interleukin-1 gene expression in rabbit vascular tissue in vivo. *Am J Pathol* 1991; 138: 1005-14.
9. Gaydos CA, Quinn TC. The role of Chlamydia pneumoniae in cardiovascular disease. *Adv Intern Med* 2000; 45: 139-73.
10. Muhlestein JB. Chronic infection and coronary artery disease. *Med Clin North Am* 2000; 84: 123-48.
11. Kol A, Libby P. Molecular mediators of arterial inflammation: a role for microbial products? *Am Heart J* 1999; 138 (Part 2): S450-S452.
12. Comandini UV, Maggi P, Santopadre P, Monno R, Angarano G, Vullo V. Chlamydia pneumoniae respiratory infections among patients infected with the human immunodeficiency virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16: 720-6.
13. Monno R, De Vito D, Losito G, et al. Chlamydia pneumoniae in community-acquired pneumonia: seven years of experience. *J Infect* 2002; 45: 135-8.
14. Campbell LA, Kuo CC, Grayston JT. Chlamydia pneumoniae and cardiovascular disease. *Emerg Infect Dis* 1998; 4: 571-9.
15. Danesh J, Collins R, Peto R. Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? *Lancet* 1997; 350: 430-6.
16. Karvonen M, Tuomilehto J, Pitkanieni J, Naukkarinen A, Saikku P. Importance of smoking for Chlamydia pneumoniae seropositivity. *Int J Epidemiol* 1994; 23: 1315-21.
17. O'Neill C, Murray LJ, Ong GM, O'Reilly DP, Evans AE, Bamford KB. Epidemiology of Chlamydia pneumoniae infection in a randomly selected population in a developed country. *Epidemiol Infect* 1999; 122: 111-6.
18. Danesh J, Whincup P, Walker M, et al. Chlamydia pneumoniae IgG titres and coronary heart disease: prospective study and meta-analysis. *BMJ* 2000; 321: 208-13.
19. Peeling RW, Wang SP, Grayston JT, et al. Chlamydia pneumoniae serology: interlaboratory variation in microimmunofluorescence assay results. *J Infect Dis* 2000; 181 (Suppl 3): S426-S429.
20. Dowell SF, Peeling RW, Boman J, et al. Standardizing Chlamydia pneumoniae assays: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada). *Clin Infect Dis* 2001; 33: 492-503.
21. O'Connor S. Workshop on the potential role of infectious agents in cardiovascular disease and atherosclerosis. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 186-7.
22. Saikku P, Leinonen M, Mattila K, et al. Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet* 1988; 2: 983-6.
23. Saikku P, Leinonen M, Tenkanen L, et al. Chronic Chlamydia pneumoniae infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *Ann Intern Med* 1992; 116: 273-8.
24. Leinonen M, Linnanmaki E, Mattila K, et al. Circulating immune complexes containing chlamydial lipopolysaccharide in acute myocardial infarction. *Microb Pathog* 1990; 9: 63-73.
25. Linnanmaki E, Leinonen M, Mattila K, Nieminen MS, Valtonen V, Saikku P. Chlamydia pneumoniae-specific circulating immune complexes in patients with chronic coronary heart disease. *Circulation* 1993; 87: 1130-4.
26. Thom DH, Grayston JT, Siscovick DS, Wang SP, Weiss NS, Daling JR. Association of prior infection with Chlamydia pneumoniae and angiographically demonstrated coronary artery disease. *JAMA* 1992; 268: 68-72.
27. Thom DH, Wang SP, Grayston JT, et al. Chlamydia pneumoniae strain TWAR antibody and angiographically demonstrated coronary artery disease. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 547-51.
28. Melnick SL, Shahar E, Folsom AR, 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: 449-504.
29. Puolakkinen M, Kuo CC, Shor A, Wang SP, Grayston JT, Campbell LA. Serological response to Chlamydia pneumoniae in adults with coronary arterial fatty streaks and fibrolipid plaques. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2212-4.
30. Kontula K, Vuorio A, Turtola H, Saikku P. Association of seropositivity for Chlamydia pneumoniae and coronary artery disease in heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Lancet* 1999; 354: 46-7.
31. Leinonen M, Saikku P. Interaction of Chlamydia pneumoniae infection with other risk factors of atherosclerosis. *Am Heart J* 1999; 138 (Part 2): S504-S506.
32. Roivainen M, Viik-Kajander M, Palosuo T, et al. Infections, inflammation, and the risk of coronary heart disease. *Circulation* 2000; 101: 252-7.
33. Lindholt JS, Vammen S, Lind I, Fasting H, Henneberg EW. The progression of lower limb atherosclerosis is associated with IgA antibodies against Chlamydia pneumoniae. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1999; 18: 527-9.
34. Korner I, Blatz R, Wittig I, Pfeiffer D, Ruhlmann C. Serological evidence of Chlamydia pneumoniae lipopolysaccharide antibodies in atherosclerosis of various vascular regions. *Vasa* 1999; 28: 259-63.
35. Varveri A, Sgorbini L, Romano S, et al. Chlamydia pneumoniae infection and cardiac ischemic syndromes. *Cardiologia* 1998; 43: 1053-8.
36. Ossewaarde M, Feskens EJ, de Vries A, Vallinga CE, Kromhout D. Chlamydia pneumoniae is a risk factor for coronary heart disease in symptom-free elderly men, but Helicobacter pylori and cytomegalovirus are not. *Epidemiol Infect* 1998; 120: 93-9.
37. Grayston JT. Background and current knowledge of Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis. *J Infect Dis* 2000; 181 (Suppl 3): S402-S410.
38. Ridker PM, Kundsinn RB, Stampfer MJ, Poulin S, Hennekens CH. Prospective study of Chlamydia pneumoniae IgG seropositivity and risks of future myocardial infarction. *Circulation* 1999; 99: 1161-4.
39. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Kundsinn R, Shih J. Baseline IgG antibody titers to Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori, herpes simplex virus, and cytomegalovirus and the risk for cardiovascular disease in women. *Ann Intern Med* 1999; 131: 573-7.
40. Miettinen H, Lehto S, Saikku P, et al. Association of Chlamydia pneumoniae and acute coronary heart disease events in non-insulin-dependent diabetic and non-diabetic subjects in Finland. *Eur Heart J* 1996; 17: 682-8.
41. Hoffmeister A, Rothenbacher D, Wanner P, et al. Seropositivity to chlamydial lipopolysaccharide and Chlamydia pneumoniae, systemic inflammation and stable coronary

- artery disease: negative results of a case-control study. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 112-8.
42. Nieto FJ, Folsom AR, Sorlie PD, Grayston JT, Wang SP, Chambless LE. Chlamydia pneumoniae infection and incident coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am J Epidemiol* 1999; 150: 149-56.
 43. Colizzi C, Rizzello V, Angiolillo DJ, et al. In vitro hyperreactivity to lipopolysaccharide in patients with history of unstable angina is not associated with seropositivity for Cytomegalovirus, Helicobacter pylori and Chlamydia pneumoniae. *Cardiologia* 1999; 44: 377-80.
 44. Coles KA, Plant AJ, Riley TV, Smith DW, McQuillan BM, Thompson PL. Lack of association between seropositivity to Chlamydia pneumoniae and carotid atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1999; 84: 825-8.
 45. Altman R, Rouvier J, Scazzioia A, Absi RS, Gonzales C. Lack of association between prior infection with Chlamydia pneumoniae and acute or chronic coronary artery disease. *Clin Cardiol* 1999; 22: 85-90.
 46. Nobel M, De Torrente A, Peter O, Genne D. No serological evidence of association between Chlamydia pneumoniae infection and acute coronary heart disease. *Scand J Infect Dis* 1999; 31: 261-4.
 47. Strachan DP, Carrington D, Mendall MA, et al. Relation of Chlamydia pneumoniae serology to mortality and incidence of ischaemic heart disease over 13 years in the Caerphilly prospective heart disease study. *BMJ* 1999; 318: 1035-9.
 48. Gupta S, Leatham EW, Carrington D, Mendall MA, Kaski JC, Camm AJ. Elevated Chlamydia pneumoniae antibodies, cardiovascular events, and azithromycin in male survivors of myocardial infarction. *Circulation* 1997; 96: 404-7.
 49. Movahed MR. Infection with Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis: a review. *J S C Med Assoc* 1999; 95: 303-8.
 50. von Hertzen L, Isoaho R, Kivela SL, Saikku P. Relation of Chlamydia pneumoniae antibodies to ischaemic heart disease. Finnish study finds significant association between raised IgG, but not IgA, titres and mortality. *BMJ* 1999; 319: 1575-6.
 51. Shor A, Kuo CC, Patton DL. Detection of Chlamydia pneumoniae in coronary arterial fatty streaks and atheromatous plaques. *S Afr Med J* 1992; 82: 158-61.
 52. Kuo CC, Shor A, Campbell LA, Fukushi H, Patton DL, Grayston JT. Demonstration of Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic lesions of coronary arteries. *J Infect Dis* 1993; 167: 841-9.
 53. Campbell LA, O'Brien ER, Cappuccio AL, et al. Detection of Chlamydia pneumoniae TWAR in human coronary atherectomy tissues. *J Infect Dis* 1995; 172: 585-8.
 54. Grayston JT, Kuo CC, Coulson AS, et al. Chlamydia pneumoniae (TWAR) in atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation* 1995; 92: 3397-400.
 55. Kuo CC, Grayston JT, Campbell LA, Goo YA, Wissler RW, Benditt EP. Chlamydia pneumoniae (TWAR) in coronary arteries of young adults (15-34 years old). *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 6911-4.
 56. 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.
 57. Weiss SM, Roblin PM, Gaydos CA, et al. Failure to detect Chlamydia pneumoniae in coronary atheromas of patients undergoing atherectomy. *J Infect Dis* 1996; 173: 957-62.
 58. Andreasen JJ, Farholt S, Jensen JS. Failure to detect Chlamydia pneumoniae in calcific and degenerative arteriosclerotic aortic valves excised during open heart surgery. *APMIS* 1998; 106: 717-20.
 59. Apfalter P, Loidl M, Nadrchal R, et al. Isolation and continuous growth of Chlamydia pneumoniae from arterectomy specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 190: 305-8.
 60. Bartels C, Maass M, Bein G, et al. Association of serology with the endovascular presence of Chlamydia pneumoniae and cytomegalovirus in coronary artery and vein graft disease. *Circulation* 2000; 101: 137-41.
 61. Blasi F, Denti F, Erba M, et al. Detection of Chlamydia pneumoniae but not Helicobacter pylori in atherosclerotic plaques of aortic aneurysms. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2766-9.
 62. Farsak B, Yildirim A, Akyon Y, et al. Detection of Chlamydia pneumoniae and Helicobacter pylori DNA in human atherosclerotic plaques by PCR. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4408-11.
 63. Jantos CA, Nesseler A, Waas W, Baumgartner W, Tillmanns H, Haberbosch W. Low prevalence of Chlamydia pneumoniae in atherectomy specimens from patients with coronary heart disease. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 988-92.
 64. Maass M, Bartels C, Engel PM, Mamat U, Sievers HH. Endovascular presence of viable Chlamydia pneumoniae is a common phenomenon in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 827-32.
 65. Siscovick DS, Schwartz SM, Corey L, et al. Chlamydia pneumoniae, herpes simplex virus type 1, and cytomegalovirus and incident myocardial infarction and coronary heart disease death in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Circulation* 2000; 102: 2335-40.
 66. Wald NJ, Law MR, Morris JK, Zhou X, Wong Y, Ward ME. Chlamydia pneumoniae infection and mortality from ischaemic heart disease: large prospective study. *BMJ* 2000; 321: 204-7.
 67. Johnson WD, Moses J, Kipshidze N. Absence of Chlamydia pneumoniae in surgical specimens of coronary and carotid arteries by polymerase chain reaction. *Cardiovasc Radiat Med* 2001; 2: 221-4.
 68. Hoymans V, Bosmans J, Ursi D, et al. Systemic inflammation, Chlamydia pneumoniae DNA in circulating leukocytes and coronary atherosclerosis. *Acta Cardiol* 2002; 57: 213-9.
 69. Ngeh J, Gupta S. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis: causal or coincidental link? *ASM News* 2000; 66: 732-7.
 70. Benson RL, Smith KG, Semenov H. Experimental arteritis and arteriosclerosis associated with streptococcal inoculations. *Arch Pathol* 1931; 12: 924-40.
 71. Fabricant CG, Krook L, Gillespie JH. Virus-induced cholesterol crystals. *Science* 1973; 181: 566-7.
 72. Fong IW, Chiu B, Viira E, Fong MW, Jang D, Mahony J. Rabbit model for Chlamydia pneumoniae infection. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 48-52.
 73. Campbell LA, Rosenfeld M, Kuo CC. The role of Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis - recent evidence from animal models. *Trends Microbiol* 2000; 8: 255-7.
 74. Laitinen K, Laurila A, Pyhala L, Leinonen M, Saikku P. Chlamydia pneumoniae infection induces inflammatory changes in the aortas of rabbits. *Infect Immun* 1997; 65: 4832-5.
 75. Hu H, Pierce GN, Zhong G. The atherogenic effects of Chlamydia are dependent on serum cholesterol and specific to Chlamydia pneumoniae. *J Clin Invest* 1999; 103: 747-53.
 76. Campbell LA, Kuo CC. Mouse models of Chlamydia pneumoniae infection and atherosclerosis. *Am Heart J* 1999; 138 (Part 2): S516-S518.
 77. Campbell LA, Moazed TC, Kuo CC, Grayston JT. Preclinical models for Chlamydia pneumoniae and cardiovascular disease: hypercholesterolemic mice. *Clin Microbiol Infect* 1998; 4 (Suppl 4): S23-S32.
 78. Muhlestein JB, Anderson JL, Hammond EH, et al. Infection

- with Chlamydia pneumoniae accelerates the development of atherosclerosis and treatment with azithromycin prevents it in a rabbit model. *Circulation* 1998; 97: 633-6.
79. Rothstein NM, Quinn TC, Madico G, Gaydos CA, Lowenstein CJ. Effect of azithromycin on murine arteriosclerosis exacerbated by Chlamydia pneumoniae. *J Infect Dis* 2001; 183: 232-8.
 80. Tambiah J, Franklin IJ, Trendell-Smith N, Peston D, Powell JT. Provocation of experimental aortic inflammation and dilatation by inflammatory mediators and Chlamydia pneumoniae. *Br J Surg* 2001; 88: 935-40.
 81. Tambiah J, Powell JT. Chlamydia pneumoniae antigens cause experimental aortic dilatation: an effect counteracted by azithromycin. *Br J Surg* 2001; 88 (Suppl 1): 3.
 82. Aalto-Setälä K, Laitinen K, Erkkilä L, et al. Chlamydia pneumoniae does not increase atherosclerosis in the aortic root of apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 578-84.
 83. Caligiuri G, Rottenberg M, Nicoletti A, Wigzell H, Hansson GK. Chlamydia pneumoniae infection does not induce or modify atherosclerosis in mice. *Circulation* 2001; 103: 2834-8.
 84. Blessing E, Campbell LA, Rosenfeld ME, Kuo CC. Chlamydia pneumoniae and hyperlipidemia are co-risk factors for atherosclerosis: infection prior to induction of hyperlipidemia does not accelerate development of atherosclerotic lesions in C57BL/6J mice. *Infect Immun* 2002; 70: 5332-4.
 85. Moazed TC, Campbell LA, Rosenfeld ME, Grayston JT, Kuo CC. Chlamydia pneumoniae infection accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Infect Dis* 1999; 180: 238-41.
 86. Fong IW, Chiu B, Viira E, Jang D, Mahony JB. Influence of clarithromycin on early atherosclerotic lesions after Chlamydia pneumoniae infection in a rabbit model. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2321-6.
 87. Muhlestein JB, Anderson JL, Carlquist JF, et al. Randomized secondary prevention trial of azithromycin in patients with coronary artery disease: primary clinical results of the ACADEMIC study. *Circulation* 2000; 102: 1755-60.
 88. Jackson LA, Stewart DK, Wang SP, Cooke DB, Cantrell T, Grayston JT. Safety and effect on anti-Chlamydia pneumoniae antibody titres of a 1 month course of daily azithromycin in adults with coronary artery disease. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 411-4.
 89. Sinisalo J, Mattila K, Nieminen M, et al. The effect of prolonged doxycycline therapy on Chlamydia pneumoniae serological markers, coronary heart disease risk factors and forearm basal nitric oxide production. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41: 85-92.
 90. Torgano G, Cosentini R, Mandelli C, et al. Treatment of Helicobacter pylori and Chlamydia pneumoniae infections decreases fibrinogen plasma level in patients with ischemic heart disease. *Circulation* 1999; 99: 1555-9.
 91. Semaan HB, Gurbel PA, Anderson JL, et al. The effect of chronic azithromycin therapy on soluble endothelium-derived adhesion molecules in patients with coronary artery disease. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36: 533-7.
 92. Gurfinkel E, Bozovich G, Daroca A, Beck E, Mautner B. Randomised trial of roxithromycin in non-Q-wave coronary syndromes: ROXIS Pilot Study. ROXIS Study Group. *Lancet* 1997; 350: 404-7.
 93. Gurfinkel E, Bozovich G, Beck E, Testa E, Livellara B, Mautner B. Treatment with the antibiotic roxithromycin in patients with acute non-Q-wave coronary syndromes. The final report of the ROXIS Study. *Eur Heart J* 1999; 20: 121-7.
 94. Melissano G, Blasi F, Esposito G, et al. Chlamydia pneumoniae eradication from carotid plaques. Results of an open, randomised treatment study. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1999; 18: 355-9.
 95. Meier CR, Derby LE, Jick SS, Vasilakis C, Jick H. Antibiotics and risk of subsequent first-time acute myocardial infarction. *JAMA* 1999; 281: 427-31.
 96. Jackson LA, Smith NL, Heckbert SR, Grayston JT, Siscovick DS, Psaty BM. Past use of erythromycin, tetracycline, or doxycycline is not associated with risk of first myocardial infarction. *J Infect Dis* 2000; 181 (Suppl 3): S563-S565.
 97. Anderson JL, Muhlestein JB, Carlquist JF, et al. Randomized secondary prevention trial of azithromycin in patients with coronary artery disease and serological evidence for Chlamydia pneumoniae infection. The Azithromycin in Coronary Artery Disease: Elimination of Myocardial Infection with Chlamydia (ACADEMIC) study. *Circulation* 1999; 99: 1540-7.
 98. Neumann F, Kastrati A, Miethke T, et al. Treatment of Chlamydia pneumoniae infection with roxithromycin and effect on neointima proliferation after coronary stent placement (ISAR-3): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2001; 357: 2085-9.
 99. Dunne MW. Rationale and design of a secondary prevention trial of antibiotic use in patients after myocardial infarction: the WIZARD [weekly intervention with zithromax (azithromycin) for atherosclerosis and its related disorders] trial. *J Infect Dis* 2000; 181 (Suppl 3): S572-S578.
 100. Gupta S. Chlamydia pneumoniae, monocyte activation, and azithromycin in coronary heart disease. *Am Heart J* 1999; 138 (Part 2): S539-S541.
 101. Jackson LA. Description and status of the azithromycin and coronary events study (ACES). *J Infect Dis* 2000; 181 (Suppl 3): S579-S581.
 102. Vergassola R, Mazzoli S, Pazzagli L, et al. Chlamydia pneumoniae and myocardial infarction (CLAINF). Preliminary randomized controlled study with clarithromycin. CLAINF protocol. *Minerva Cardioangiol* 2000; 48: 411-25.
 103. Anand V, Gupta S. Antibiotic therapy in coronary heart disease - where do we currently stand? *Cardiovasc Drugs Ther* 2001; 15: 209-10.
 104. Gupta S, Kaski JC. Infections and coronary heart disease: potential for new therapy? In: Betteridge J, ed. *Lipids: current perspectives*. Vol 2. London: Martin Dunitz, 2000.
 105. Stone AF, Mendall MA, Kaski JC, et al. Effect of treatment for Chlamydia pneumoniae and Helicobacter pylori on markers of inflammation and cardiac events in patients with acute coronary syndromes: South Thames Trial of Antibiotics in Myocardial Infarction and Unstable Angina (STAMINA). *Circulation* 2002; 106: 1219-23.
 106. Gay K, Baughman W, Miller Y, et al. The emergence of Streptococcus pneumoniae resistant to macrolide antimicrobial agents: a 6-year population-based assessment. *J Infect Dis* 2000; 182: 1417-24.
 107. Scaglione F, Rossoni G. Comparative anti-inflammatory effects of roxithromycin, azithromycin and clarithromycin. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41 (Suppl B): 47-50.
 108. Uriarte SM, Molestina RE, Miller RD, et al. Effect of macrolide antibiotics on human endothelial cells activated by Chlamydia pneumoniae infection and tumor necrosis factor-alpha. *J Infect Dis* 2002; 185: 1631-6.
 109. Kuvvin JT, Kimmelstiel CD. Infectious causes of atherosclerosis. *Am Heart J* 1999; 137: 216-26.
 110. Kaukoranta-Tolvanen SS, Laitinen K, Saikku P, Leinonen M. Chlamydia pneumoniae multiplies in human endothelial cells in vitro. *Microb Pathog* 1994; 16: 313-9.
 111. Gaydos CA, Summersgill JT, Sahney NN, Ramirez JA, Quinn TC. Replication of Chlamydia pneumoniae in vitro in human macrophages, endothelial cells, and aortic artery smooth muscle cells. *Infect Immun* 1996; 64: 1614-20.

112. Knoebel E, Vijayagopal P, Figueroa JE II, Martin DH. In vitro infection of smooth muscle cells by Chlamydia pneumoniae. *Infect Immun* 1997; 65: 503-6.
113. Kaul R, Wenman WM. Chlamydia pneumoniae facilitates monocyte adhesion to endothelial and smooth muscle cells. *Microb Pathog* 2001; 30: 149-55.
114. Kaukorata-Tolvanen SS, Teppo AM, Laitinen K, Saikku P, Linnavuori K, Leinonen M. Growth of Chlamydia pneumoniae in cultured human peripheral blood mononuclear cells and induction of a cytokine response. *Microb Pathog* 1996; 21: 215-21.
115. Hwang S-J, Ballantyne CM, Sharrett AR, et al. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation* 1997; 96: 4219-25.
116. Nishiyama K, Ogawa H, Yasue H, et al. Simultaneous elevation of the levels of circulating monocyte chemoattractant protein-1 and tissue factor in acute coronary syndromes. *Jpn Circ J* 1998; 62: 710-2.
117. Ridker PM, Rifai N, Stampfer M, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 2000; 101: 1767-72.
118. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation* 2000; 101: 2149-53.
119. Fryer RH, Schwobe EP, Woods ML, Rodgers GM. Chlamydia species infect human vascular endothelial cells and induce procoagulant activity. *J Investig Med* 1997; 45: 168-74.
120. Schumacher A, Seljeflot I, Lerkerod AB, Sommervoll L, Otterstad JE, Arnesen H. Positive Chlamydia pneumoniae serology is associated with elevated levels of tumor necrosis factor alpha in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2002; 164: 153-60.
121. Kohara K, Tabara Y, Yamamoto Y, Igase M, Miki T. Chlamydia pneumoniae seropositivity is associated with increased plasma levels of soluble cellular adhesion molecules in community-dwelling subjects: the Shimanami Health Promoting Program (J-SHIP) study. *Stroke* 2002; 33: 1474-9.
122. Lopes-Virella MF. Interactions between bacterial lipopolysaccharides and serum lipoproteins and their possible role in coronary heart disease. *Eur Heart J* 1993; 14 (Suppl K): 118-24.
123. Koenig W. Atherosclerosis involves more than just lipids: focus on inflammation. *Eur Heart J* 1999; 1 (Suppl): 19-26.
124. Molestina RE, Miller RD, Ramirez JA, Summersgill JT. Infection of human endothelial cells with Chlamydia pneumoniae stimulates transendothelial migration of neutrophils and monocytes. *Infect Immun* 1999; 67: 1323-30.
125. Palinski W, Rosenfeld ME, Yla-Herttuaala S, et al. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 1372-6.
126. Kalayoglu MV, Byrne GI. Induction of macrophage foam cell formation by Chlamydia pneumoniae. *J Infect Dis* 1998; 177: 725-9.
127. Kol A, Bourcier T, Lichtman AH, Libby P. Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J Clin Invest* 1999; 103: 571-7.
128. Schussheim AE, Fuster V. Antibiotics for myocardial infarction? A possible role of infection in atherogenesis and acute coronary syndromes. *Drugs* 1999; 57: 283-91.
129. Rodel J, Woytas M, Groh A, et al. Production of basic fibroblast growth factor and interleukin 6 by human smooth muscle cells following infection with Chlamydia pneumoniae. *Infect Immun* 2000; 68: 3635-41.
130. Sasu S, LaVerda D, Qureshi N, Golenbock DT, Beasley D. Chlamydia pneumoniae and chlamydial heat shock protein 60 stimulate proliferation of human vascular smooth muscle cells via toll-like receptor 4 and p44/p42 mitogen-activated protein kinase activation. *Circ Res* 2001; 89: 244-50.
131. Kol A, Sukhova GK, Lichtman AH, Libby P. Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase expression. *Circulation* 1998; 98: 300-7.
132. Dechend R, Maass M, Gieffers J, et al. 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* 1999; 100: 1369-73.
133. Molestina RE, Miller RD, Lentsch AB, Ramirez JA, Summersgill JT. Requirement for NF-kappaB in transcriptional activation of monocyte chemotactic protein 1 by Chlamydia pneumoniae in human endothelial cells. *Infect Immun* 2000; 68: 4282-8.
134. Tiran A, Gruber HJ, Graier WF, Wagner AH, Van Leeuwen EB, Tiran B. Aspirin inhibits Chlamydia pneumoniae-induced nuclear factor-kappa B activation, cytokine expression, and bacteria development in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1075-80.
135. Miller SA, Selzman CH, Shames BD, Barton HA, Johnson SM, Harken AH. Chlamydia pneumoniae activates nuclear factor kB and activator protein 1 in human vascular smooth muscle and induces cellular proliferation. *J Surg Res* 2000; 90: 76-81.
136. Leinonen M. Pathogenetic mechanisms and epidemiology of Chlamydia pneumoniae. *Eur Heart J* 1993; 14 (Suppl K): 57-61.
137. Xu Q, Willeit J, Marosi M, et al. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis. *Lancet* 1993; 341: 255-9.