

Anjiyografik Olarak Koroner Arter Hastalığı Gösterilen Olgularda *Chlamydia pneumoniae*'ye Karşı Antikorların Mikroimmünofluoresans Yöntemi ile Belirlenmesi

Neşe Saltoğlu¹, Mustafa Şan², Filiz Kibar³, Berna Fidan³, Fatih Köksal³

Özet: *Chlamydia pneumoniae*'nin, immünohistokimyasal teknikler, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve elektron mikroskopi ile aterosklerotik lezyonlarda varlığının gösterilmesine; doku kültürlerinden izolasyonuna ya da *C.pneumoniae*'ye karşı oluşan antikorların enzim immünoessey (EIA) ve mikroimmünofluoresans (MIF) teknikleri ile gösterilmesine dayanan birçok çalışmada bu bakteri ile ateroskleroz ve koroner kalp hastalıkları arasında etiyolojik bir ilişki olabileceği ileri sürülmüştür. Bu çalışmada, anjiyografik olarak kanıtlanmış 58 koroner kalp hastasında anjiyografi işlemi esnasında alınan kan örneği ile asemptomatik 20 olgunun serum örneği kullanılmış ve MIF yöntemi ile anti-*C.pneumoniae* IgM ve IgG antikorları araştırılmıştır. Hasta ve kontrol grubunda risk faktörleri olarak ayrıca hipertansiyon, sigara, diabetes mellitus ve diğer alta yatan hastalıklar da araştırılmıştır. Her iki grupta da anti-*C.pneumoniae* IgM'si pozitif olgu saptanmamıştır. Anti-*C.pneumoniae* IgG'si $\geq 1/128$ titrede olanlar pozitif kabul edilmiş ve koroner kalp hastalığı olan grupta anti-*C.pneumoniae* IgG antikor pozitifliği %75.9; kontrol grubunda %50 olarak belirlenmiştir ($p<0.05$). Sonuç olarak, koroner kalp hastalığı olan gruptaki antikor prevalansının yüksekliği *C.pneumoniae*'nin ateroskleroz ile ilişkisi olabileceğini düşündürmektedir. Ancak, bu çalışmanın daha geniş vaka-kontrol grubu ve aterosklerotik plaklarında *C.pneumoniae* cisimciklerini gösteren yöntemlerin de kullandığı çalışmaları desteklemesine ihtiyaç vardır.

Anahtar Sözcükler: *Chlamydia pneumoniae*, mikroimmünofluoresans, koroner arter hastalığı.

Summary: *Chlamydiae pneumoniae* antibodies determined by microimmunofluorescence test in patients with angiographically demonstrated coronary artery disease. Recent studies suggested that *Chlamydia pneumoniae* may play a role in the etiology of atherosclerosis and coronary artery diseases. Studies on this association are based on detecting antibodies against *C.pneumoniae* using microimmunofluorescence (MIF) and enzyme immunoassay (EIA), identifying the organism in vascular tissue by electron microscopy, polymerase chain reaction and immunohistochemical staining, and cultivating the organism from vascular tissue. In this study we investigated prevalence of IgM and IgG antibodies against *C.pneumoniae* in 58 patients with coronary artery disease proved angiographically and in asymptomatic control group by MIF. In two groups, risk factors were determined as hypertension, smoking, diabetes mellitus or underlying disease. None of the sera was positive for anti-*C.pneumoniae* IgM. Sera were defined as positive if anti-*C.pneumoniae* IgG antibody titer was $\geq 1/128$, and anti-*C.pneumoniae* IgG seropositivity was 79.5% and 50% in coronary artery disease and control groups, respectively ($p<0.05$). High seropositivity in patients with coronary artery disease suggested that *C.pneumoniae* may be related with atherosclerosis. However, this study should be supported by searching in broader case-control groups and more specific methods showing *C.pneumoniae* bodies in atherom plaques.

Key Words: *Chlamydia pneumoniae*, microimmunofluorescence, coronary artery disease.

Giriş

TWAR olarak adlandırılan *Chlamydia* izolatları yaklaşık 10 yıl önce ilk kez solunum yolu infeksiyonlarından izole edilmiş ve *Chlamydia*'nin pnömoni, bronşit, astım, sinüzit, farenjit ve otitis media'dan sorumlu olduğu bildirilmiştir. Ayrıca sarkoidoz, koroner kalp hastalığı, multipl skleroz etyolojisinde de rol oynayabileceği ileri sürülmüştür. Sürdürülen DNA çalışmaları

- (1) Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Bakterioloji ve Infeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Adana
- (2) Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kardiyoloji Anabilim Dalı, Adana
- (3) Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana

ve elektron mikroskopik incelemeler sonucu bu mikroorganizma *Chlamydia*'ların yeni bir türü olan *C.pneumoniae* olarak adlandırılmıştır (1-5). *C.pneumoniae* ile koroner arter hastalıkları arasında etiyolojik ilişki ilk kez 1988 yılında Saikku ve arkadaşları (6)'nın yaptığı bir çalışma ile ortaya atılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda aterosklerozun kronik inflamatuvar bir hastalık olduğu, damar duvarında yerleşen *C.pneumoniae*'nin neden olduğu kronik arteritin sonucu ortaya çıktığı ileri sürülmüştür (7). Bu kronik infeksiyonların sadece koroner arterlerde değil, diğer arterlerde de görülebileceği ve iskemik hastalıkla ilişkisi bildirilmiştir (7-9). Akut myokard infarktüsünün ise kronik damar infeksiyonunun akut alevlenmeleri sonucu ortaya çıkabileceği ileri sürülmüştür. *C.pneumoniae*

diğer kardiyovasküler sendromlardan da sorumlu tutulmuştur (10).

Toplumda *C. pneumoniae* infeksiyonu insidansının yaşla paralel olarak arttığı; erişkin yaşta oranın %50-60'a ulaştığı bildirilmiştir (11). Primer akut infeksiyonlu çoğu vakada klinik tablo selim seyretmekle birlikte, yaşlı grupta artan mortalite ile birlikte ciddi klinik seyir bildirilmiştir.

Bunun yanı sıra yapılan çalışmalarda *C. pneumoniae* kardiyovasküler sistem hastalıklarında diğer hipertansiyon, sigara içme ve serum lipid seviyelerinden bağımsız bir risk faktörü olarak bildirilmiştir (7,12). Sigaranın ise solunum sisteminde IL-4 sekresyonunu artırarak hümmoral immüniteyi güçlendirirken, hüccresel immüniteyi baskıladığı ve *C. pneumoniae* infeksiyonunun gelişimine zemin hazırladığı öne sürülmüştür (13).

C. pneumoniae'nin akciğerde makrofajları ve monositleri infekte edebildiği, infekte hücrelerde çoğalan *Chlamydia*'nın pulmoner makrofajlarla dolaşıma girerek damar lümeninde yeni mononükleer hücreleri ve endoteli infekte ederek ateroskleroz değişikliklere neden olabileceği ileri sürülmüştür (7,14,15). Lezyonu başlatan *C. pneumoniae* mi olduğu, yoksa afinite nedeniyle zaten var olan lezyona infekte monositlerle birlikte mi geldiği tartışmalıdır. Dolaşımda *C. pneumoniae* elementer cisimleri monositlerden ayrılarak hücre duvar lipopolisakaridlerinin yardımı ile koroner arter duvarına bağlanır. Takiben LDL ve HDL gibi lipoproteinlere bağlanır; immün sistem için hedef hücre haline gelir ve sonuçta ateroskleroz oluşmaya başlar. *C. pneumoniae* lipopolisakarid antijeni tarafından stimüle edilen monositler TNF- α ve - β , IL-1, IL-6 salınımı sonucunda vazodilatasyona ve kemotaksiye, lipoprotein lipazın aktivitesinin inhibisyonuna neden olur. Bu, hiperlipidemini göstergesi olarak HDL'de azalmaya, LDL'de artışa neden olabilir. IL-1 kolajenazı ve kolajen dokunun üretimini artırır; koroner arter duvarında intimadan mediaya düz kas hücrelerinin ve fibroblastların proliferasyonuna ve migrasyonuna neden olur. Bu değişiklikler stenoz ile sonuçlanır. *C. pneumoniae* infeksiyonunda doku faktörleri aktive olur; lokal epitelde lökosit adezyon proteinlerinin ekspresyonu artar; son olarak endotelde nitrik oksid sentezi inhibe edilir ve damar dilatasyonu bozulur (10).

Bu hipotezler nedeniyle *C. pneumoniae* ile arter duvarı arasındaki ilişki elektron mikroskopi, immünohistokimyasal boyama metodları ve PCR gibi tekniklerle araştırılmıştır (3,18). Bu teknikler arasında mikroiimmünofluoresans (MIF) yöntemi *C. pneumoniae* infeksiyonunun tanısında noninvazif, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, serolojik olarak alın standard bir yöntemdir (2,19).

Yapılan vaka-kontrol çalışmaları *C. pneumoniae* infeksiyonunun diğer değişkenlerden bağımsız olarak koroner kalp

hastalıklarına neden olabileceği yönünde sonuçlara işaret etmektedir. Aynı nedenle, bu çalışmada anjiyografik olarak kanıtlanmış 58 koroner kalp hastasında *C. pneumoniae* infeksiyonunun MIF yöntemi ile belirlenmesiyle olası etyolojik ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntemler

Bu çalışma Kardiyoloji Anabilim Dalı'ndan izlenen 58 koroner arter hastası ile asemptomatik sağlıklı 20 kişide yapılmıştır. Hasta grubu, Kardiyoloji Anabilim Dalı Hemodinami Laboratuvarı'nda koroner anjiyografisi ile koroner arter hastalığı saptanan hastalardan oluşmaktadır.

Araştırmaya alınan, koroner anjiyografi ile damar hastalığı kanıtlanmış hastaların 44 (%76)'ü erkek, 14 (%24)'ü kadındı ve 22 (%38)'si 41-50 yaş grubunda yer almakta idi. Kontrol grubundaki olguların 14 (%70)'ü erkek, 6 (%30)'sı kadındı. Hasta grubunda yaş ortalaması 50.2 (33-65 yaş), kontrol grubunda 48.8 (34-60 yaş) olup istatistiksel anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$). Hasta ve kontrol grubunda cinsiyet açısından da anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).

Hastaların 48 (%82)'inin göğüs ağrısı, 10 (%18)'inin ise sırt ağrısı, nefes darlığı gibi şikayetleri mevcuttu. Hastaların 11 (%19)'inde telekardiyografide kardiyomegali saptanmıştı. Koroner anjiyografide, tüm hastalarda en azından bir arterde stenoz belirlenmişti. Koroner anjiyografi sonucunda 1 hastada ana koroner lezyonu, 27 (%46) hastada sol inen arter lezyonu, 22 (%37) hastada sirkumfleks (sol dönen arter) lezyonu, 30 (%51) hastada sağ koroner arter lezyonu ve 25 (%43) hastada diğer arterlerde lezyon vardı. Hastaların 27 (%46)'sinde ventrikülografide duvar hareket bozukluğu mevcuttu. Koroner anjiyografi sonucunda 20 (%34) hastaya tıbbi tedavi, 18 (%32) hastaya balonlu anjiyoplasti ve 20 (%34) hastaya "bypass" ameliyatı kararı verilmişti.

Hastalara Judkins yöntemi ile koroner anjiyografi uygulanarak işlem esnasında 5 ml kan örneği elde edildi. Kontrol grubu olarak asemptomatik sağlıklı kişilerden de 5 ml kan alındı. Hasta ve kontrol grubundan alınan serum örneklerinde Euroimmun-F1 2192-1010 G kiti kullanılarak MIF yöntemi ile anti-*C. pneumoniae* IgM ve IgG antikorları araştırılmıştır. Çalışma kit prosedürüne uygun olarak yapılmıştır. Tek serum örneği için kit prosedürüne uygun olarak anti-*C. pneumoniae* IgG $\geq 1/128$ ise pozitif kabul edilmiştir. Sonuçların değerlendirilmesinde χ^2 ve t testi kullanılmıştır.

Sonuçlar

MIF yöntemi ile elde edilen bulgular değerlendirildiğinde anti-*C. pneumoniae* IgM pozitifliği olan olgu saptanmamıştır. Anti-*C. pneumoniae* IgG pozitifliği ise hasta grubunda erkeklerin 35 (%80)'inde, kadınların 9 (%64)'ünde bulunmuştur.

Tablo 1. *Chlamydia pneumoniae* Seropozitifliği Saptanan Hasta ve Kontrollerin Yaş ve Cinsiyete Göre Dağılımı

Yaş Grupları	Kadın				Erkek			
	Hasta (n=9)		Kontrol (n=3)		Hasta (n=35)		Kontrol (n=7)	
	Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)
<40	-	-	-	-	5	(14)	1	(14)
41-50	3	(33)	1	(33)	11	(31)	2	(29)
51-60	4	(44)	2	(67)	12	(34)	4	(57)
>61	2	(22)	-	-	7	(20)	-	-

Tablo 2. Koroner Kalp Hastalıklarında Risk Faktörü Olarak *Chlamydia pneumoniae*'nin Yeri

	Yaş Grupları				Toplam	
	<40 Sayı	41-50 Sayı	51-60 Sayı	>61 Sayı	Sayı	(%)
Hipertansiyon	1	3	1	1	6	(10)
<i>C.pneumoniae</i>	4	2	15	4	35	(60)
İkisi birlikte	-	3	1	5	9	(16)
Diğer	3	4	0	1	8	(14)

Kontrol grubunda ise erkeklerin 7 (%50)'si, kadınların da 3 (%50)'ü pozitif bulunmuştur. Seropozitiflik en fazla 51-60 yaş grubunda belirlenmiştir. Toplam seropozitivite hasta grubunda 44 (%76) iken kontrol grubunda 10 (% 50) olarak saptanmış, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p=0.03) (Tablo 1).

Hastaların 35 (%63)'ünde tek risk faktörü olarak *C. pneumoniae* infeksiyonu belirlenirken, 9 (%16)'unda hipertansiyon ve anti-*C.pneumoniae* antikor pozitifliği birlikte belirlenmiştir. Tek başına risk faktörü olarak hipertansiyon 6 (%10)'sında bulunmuştur (Tablo 2).

İrdeleme

C. pneumoniae'nin koroner kalp hastalıkları ile olası ilişkisi başka birçok infeksiyon etkenine oranla daha güçlü olarak düşünülmüş bir ilişkidir. Bunlar arasında etyolojik bir ilişki olabileceğine ilişkin kuşku bir çok seroepidemiolojik çalışmanın sonuçları ile desteklenmiştir (8). *C.pneumoniae* elemanter cisim veya genomik DNA'sı atarektomi örneklerinde elektron mikroskopik inceleme, immünoperoksidaz ve PCR yöntemleri ile önemli oranda gösterilebilmiştir (15,18,20-24). *C. pneumoniae* antikor prevalansının, aterosklerozu olan hastalarda ve diğer kardiyovasküler, koroner arter hastalıkları olanlarda yüksek bulunması, *C. pneumoniae* ile ateroskleroz arasındaki ilişkiyi düşündürmektedir. Koroner kalp hastalığı olan kişilerde *C.pneumoniae*-spesifik immün komplekslerin yüksek oranda saptanması, persistan *Chlamydia* infeksiyonunu desteklemektedir (25).

Diğer yandan bu çalışmamıza benzer şekilde aterosklerotik kalp hastalığı olduğu ispatlanmış olguların serum örneklerinde *C.pneumoniae* antijenlerine karşı antikor cevabı, MIF, kompleman bağlama reaksiyonu (KBR) ve enzim immünoessey (EIA) gibi serolojik yöntemler kullanılarak araştırıldığında kontrol grubuna oranla yüksek titrede antikor yanıtı ve yüksek prevalans tespit edilmiştir (21,25-27). Serum örneklerinde MIF yöntemi ile *C.pneumoniae* için $\geq 1/64$ antikor yanıtı, koroner damar hastalığı yönünden riskin 2-7 kat arttığını gösteren; dolaşımında saptanan immün kompleks ve antikor seviyelerinde tespit edilen 2 kat üzeri artışlar, 2-6 ay içerisinde ortaya çıkabilecek bir kardiyak problem için prediktif öneme sahip bulgular olarak ileri sürülmüştür (10). Sonuç olarak, bu çalışmalarla *C. pneumoniae*'nin yaş, sigara içme, hipertansiyon gibi faktörlerden bağımsız olarak ateroskleroza neden olabileceği ileri sürülmüştür (25-27).

C. pneumoniae ile ateroskleroz arasındaki muhtemel ilişkiye işaret eden birçok serolojik çalışma yapılmıştır (7,18,30,31). Özellikle MIF yöntemi duyarlılığının ve özgül-

lüğünün yüksek olması dolayısı ile tercih edilebilir bir metoddur (5,31). Bu çalışmalarda koroner arter hastalıkları olanlarda *C.pneumoniae* antikor prevalansı %80-98 oranlarında gösterilmiştir. Bu oran aterosklerotik hastalarda yaşla paralel olarak artış göstermektedir (4,32).

Bu çalışmanın sonucunda herhangi bir koroner arterle ilgili yakınması olmayan kontrol grubu ile kıyaslandığında hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Hasta grubunda %60 olguda risk faktörü olarak sadece *Chlamydia*'nin saptanması da bu ilişkiyi desteklemektedir. Benzer şekilde Saikku ve arkadaşları (7)'nin çalışmasında *C. pneumoniae* IgG antikorları yüksek oranda saptanmıştır. Linnanmaki ve arkadaşları (25)'nin yaptığı bir çalışmada da MIF yöntemi ile *C. pneumoniae* antikorları hastalarda kontrol grubuna oranla yüksek bulunmuştur. Weiss ve arkadaşları (22)'nin yaptığı çalışmada ise *C. pneumoniae* ile ateroskleroz arasında bir ilişki ortaya konulamamıştır. Campbell ve arkadaşları (18)'nin serisinde ise restenozu olan hastaların anjiyoplasti veya atarektomi örneklerinde primer lezyonları olan gruptakinden daha yüksek oranda *C. pneumoniae* tespit edilmiştir. Ancak anti-*C. pneumoniae* IgG pozitifliği açısından gruplar arasında fark gözlenmemiştir.

C. pneumoniae, konakta solunum sisteminde persistan infeksiyonlara neden olmaktadır (15). Persistan *C. pneumoniae* infeksiyonunun koroner arterlerde ateroskleroz gelişimi ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. *Chlamydia*'lar immüniteyi uyarak oto-immün komplikasyonlara neden olabilirler (25). *C. pneumoniae* infeksiyonlarında monositlerin infeksiyonu neticesinde arter lümeni, endotel, intima ve mediasına gidebilen mikroorganizmaya konak savunmasının yetersizliği immün komplekslerin damar duvarında birikmesine, lokal inflamasyona ve prokoagülan değişikliklere neden olabilmektedir (33). Bu değişiklikler ise ateroskleroz gelişimine; ayrıca immün komplekslerin endotelial, fagositik hücrelere, trombositlere ve eritrositlere bağlanması, hücre proliferatif faktörleri de kapsayan mediyatörlerin salınımına yol açabilmektedir (33). Bu olaylar fibroza, intimal kalınlaşmaya, konstrikasyon sonucu daralmaya, aterosklerotik lezyonlara neden olabilir. Bu lezyonlardan kopan parçalar da yeni trombüslere, sonuçta akut myokard infarktüsü ve anstabil angina pectoris gibi patolojilere yol açabilir (34). Yapılan çok sayıda çalışma ile *C. pneumoniae*'nin koroner "bypass" sonrası gelişen restenozla, akut myokard infarktüsü ve anstabil angina ile ilişkili olabileceği ileri sürülmektedir. Ancak bu hipotezlerin kanıtlanması için etkene yönelik tedavi çalışma sonuçlarının da değerlendirildiği çalışmalara gereksinim vardır. Bu hipotezin doğruluğu halinde bu hastalıkların tedavisinde *Chlamydia*'lara etkili antimikrobiyallerin verilmesi dolayısıyla tedavide değişiklikler de gündeme gelecektir (15,16)

Bu çalışma sonucunda *C. pneumoniae*'nin diğer faktörlerden bağımsız olarak ateroskleroz etyolojisinde rol oynayabileceği düşünülmüştür. Ancak, bu savın doğrulanması için daha fazla sayıda olgu ile yapılacak vaka-kontrol çalışmaları ve aterom plaklarında etkeni göstermeye yönelik daha invazif çalışmalara ihtiyaç vardır. Zira yapılan çalışmalarda hücre kültüründe izolasyon yöntemi ile aterom plakları ve monositlerde canlı mikroorganizmanın gösterilmesi, onun aterom plaklarında çoğalarak arterlerde kronik infeksiyona yol açtığı tezini güçlendirmektedir.

Kaynaklar

1. Kuo C, 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
2. Gaydos CA, Eiden JJ, Oldach D, et al. Diagnosis of Chlamydia pneumoniae infection in patients with community-acquired pneumoniae by polymerase chain reaction enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis* 1994; 19:157-60
3. Grayston JT, Kuo C, Coulson AS, et al. Chlamydia pneumoniae (TWAR) in atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation* 1995; 92:397-400
4. Hahn DL, Dodge RW, Golubjatkinov R. Association of Chlamydia pneumoniae (strain TWAR) infection with wheezing, asthmatic bronchitis, and adult-onset asthma. *JAMA* 1991; 266:225-30
5. Braun J, Laitko S, Treharne J, et al. Chlamydia pneumoniae: a new causative agent of reactive arthritis and undifferentiated oligoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1994; 53:100-5
6. 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
7. Saikku P, Leinonen M, Mattila K, et al. Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and myocardial infection. *Lancet* 1988; 2:983-6
8. Noll G. Pathogenesis of Chlamydia pneumoniae: a possible relation to infection. *Atherosclerosis* 1998; 140(Suppl 1): S3-9
9. Wimmer MLJ, Strupp RS, Saikku P, Haberl RL. Association of chlamydial infection with cerebrovascular disease. *Stroke* 1996; 27: 2207
10. Yamashita K. Distribution of Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic carotid artery. *Stroke* 1998; 29: 773.
11. Köksal F. C. pneumoniae infeksiyonları ile ateroskleroz etiyolojisi arasındaki olası ilişkiler. *Ankem Derg* 1999; 13:341-8
12. Grayston JT, Wang SP, Kuo CC, Campbell LA. Current knowledge on Chlamydia pneumoniae, strain TWAR, an important cause of C. pneumoniae and other acute respiratory diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989; 8: 191-202
13. Moazed TC, Kuo C, Patton DL, Grayston JT, Campbell LA. Experimental rabbit models of Chlamydia pneumoniae infection. *Am J Pathol* 1996; 148 (2): 667-76
14. Herten LV, Surcel HM, Koprio J, et al. Immune responses to Chlamydia pneumoniae in twins in relation to gender and smoking. *J Med Microbiol* 1998; 47:441
15. Ramirez JA, the Chlamydia pneumoniae/Atherosclerosis Study Group. Isolation of Chlamydia pneumoniae from the coronary artery of a patient with coronary atherosclerosis. *Ann Intern Med* 1996; 125:979-82
16. Taylor-Robinson D. Chlamydia pneumoniae in vascular tissue. *Atherosclerosis* 1998; 140: S21-4
17. 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.
18. 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
19. Orfila JJ. Seroepidemiological evidence for an association between Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1998; 140(Suppl) 1: S11-5
20. Kuo C-C, Gown AM, Benditt EP, Grayston JT. Detection of Chlamydia pneumoniae in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain. *Arterioscler Thromb* 1993; 13:1501-4
21. Shor A, Kuo CC, Patton DL. Detection of Chlamydia pneumoniae in coronary arterial fatty streaks and atheromatous plaques. *Am J Med* 1992; 82:158-60
22. Weiss S, 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
23. 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
24. Jackson LA, Campbell LA, Schmidt RA, Kuo C-C, et al. Specificity of detection of Chlamydia pneumoniae in cardiovascular atheroma. *Am J Pathol* 1997; 150:1785-90
25. Linnanmaki F, Leinonen M, Mattila K, et al. Presence of Chlamydia pneumoniae-specific antibodies in circulating immune complexes in coronary heart disease. *Circulation* 1993; 87:1130-4
26. Thom DH, Grayston JT, Siscovick DS, et al. Association of prior infection with Chlamydia pneumoniae and angiographically demonstrated coronary artery disease. *JAMA* 1992; 268:68-72
27. Thomas GO, 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
28. Gupta S, Cumm AJ. Chlamydia pneumoniae and coronary heart disease. *Br J Med* 1997; 314: 1778-9
29. Thom DH, Wang S, Grayston JT, et al. Chlamydia pneumoniae strain TWAR antibody an angiographically demonstrated coronary artery disease. *Arterioscler Thromb* 1991; 11:547-51
30. 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(1): S25-30
31. 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* 1995; 92: 6911-4
32. Chirgwin K, Roblin PM, Gelling M, Hammerschlag MR, Schachter J. Infection with Chlamydia pneumoniae in Brooklyn. *J Infect Dis* 1991; 163:757-61
33. Linnanmaki E, Leinonen M, Mattila K, et al. Chlamydia pneumoniae specific circulating immune complexes in patients with chronic coronary heart disease. *Circulation* 1993; 87:1130-4
34. Gupta S, Leatham EW. The relation between Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis. *Heart* 1997; 77:7-8