

INDICE

1. INTRODUZIONE	3
1.1 <i>CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE</i> : GENERALITÀ	4
1.2 CLASSIFICAZIONE E TASSONOMIA	6
1.3 CICLO BIOLOGICO	8
1.4 GENETICA DEL MICRORGANISMO.....	14
1.5 STRUTTURA ANTIGENICA	17
1.6 MANIFESTAZIONI CLINICHE	19
1.7 EPIDEMIOLOGIA	21
1.8 TRASMISSIONE.....	22
1.9 DIAGNOSI	23
1.10 TERAPIA	25
1.10.1 <i>Tetracicline</i>	25
1.10.2 <i>Chinoloni</i>	29
1.10.3 <i>Macrolidi</i>	32
1.10.3.1 Ketolidi	34
1.10.4 <i>Rifamicine</i>	35
1.11 MULTI-PATOGENICITÀ DI <i>CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE</i>	37
2. <i>CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE</i> NELLE FARINGOTONSILLITI DELL'ADULTO	39
2.1 INFEZIONI ACUTE DELLE VIE RESPIRATORIE	39
2.2 LA FARINGOTONSILLITE	40
2.3 SCOPO DEL LAVORO	42
2.4 MATERIALI E METODI.....	44

2.4.1	<i>Raccolta dei campioni</i>	44
2.4.2	<i>Isolamento ed identificazione di C. pneumoniae</i>	45
2.4.3	<i>Diagnostica molecolare</i>	49
2.4.3.1	Estrazione del DNA.....	49
2.4.3.2	Amplificazione dell'acido nucleico.....	51
2.4.3.3	Sequenziamento del DNA.....	56
2.5	RISULTATI.....	57
2.6	CONCLUSIONI	59
3.	RUOLO DI CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE NELL'EZIOPATOGENESI DELL'ATEROSCLEROSI	63
3.1	L'ATEROSCLEROSI.....	63
3.2	EVOLUZIONE DELLA PLACCA ATEROSCLEROTICA	65
	FIG.15.....	67
3.3	<i>CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE</i> ED ATEROSCLEROSI.....	68
3.4	SCOPO DEL LAVORO	71
3.5	MATERIALI E METODI.....	72
3.5.1	<i>Raccolta dei campioni</i>	72
3.5.2	<i>Saggio di microimmunofluorescenza (MIF)</i>	74
3.6	RISULTATI.....	76
3.7	CONCLUSIONI	80
4.	BIBLIOGRAFIA	83

1. INTRODUZIONE

Chlamydophila pneumoniae è un microrganismo sferoidale, Gram-negativo, immobile, a parassitismo endocellulare obbligato.

Isolata per la prima volta da tampone congiuntivale, è attualmente associata ad una vasta gamma di patologie sia acute che croniche, in virtù della sua capacità di determinare infezione persistente con conseguente danno immuno-patologico ai tessuti dell'organismo ospite.

Il ruolo di *C. pneumoniae* nella eziopatogenesi delle infezioni respiratorie sia delle alte che delle basse vie è ampiamente dimostrato, specialmente nella età pediatrica. Minori riscontri epidemiologici sembrano interessare le infezioni delle alte vie respiratorie nell'adulto.

Inoltre, più recentemente, *C. pneumoniae* è stata sempre più frequentemente coinvolta nella eziopatogenesi di numerosi

quadri patologici, sia come diretto responsabile (es. asma) che indirettamente (es. aterosclerosi).

Il presente lavoro, attraverso due distinti studi sperimentali, ha voluto focalizzare il ruolo di *C. pneumoniae* nell'insorgenza di faringotonsilliti dell'adulto e nella progressione della PAD (Peripheral Artery Disease), processo aterosclerotico che colpisce le arterie periferiche, in particolare quelle degli arti inferiori.

1.1 Chlamydomphila pneumoniae: generalità

Chlamydomphila pneumoniae (dal greco khlamus: mantello e filos: amante) deve il suo nome alla caratteristica struttura superficiale, comune a tutti gli appartenenti alla famiglia delle *Chlamydiaceae*, rappresentata da un “mantello” molto simile alla membrana esterna dei batteri Gram-negativi.

L'incapacità di sintetizzare ATP rende le clamidie dei “parassiti

energetici” che non crescono nei normali terreni di coltura, bensì richiedono cellule viventi per moltiplicarsi e vengono pertanto coltivate in cellule eucariotiche sensibili, HL, HEp-2, o HeLa229.

Questo parassitismo intracellulare obbligato e le piccole dimensioni hanno fatto considerare per molto tempo le clamidie dei grossi virus.

Che non fossero virus è diventato evidente negli anni '60 con l'avvento delle tecniche di coltura di tessuto e della microscopia elettronica, che hanno portato la prova della presenza sia di DNA che di RNA, di rRNA e di strutture batteriche quali, ribosomi e parete cellulare.

La *C. pneumoniae* è stata isolata per la prima volta nel 1965 dal tampone congiuntivale di un bambino di Taiwan ed è stata denominata “TW-183”.

Successivamente è stata isolata nella faringe nel 1983 a Seattle, nello stato di Washington ed è stata classificata come “AR-39” (AR= acute respiratory).

Da successivi studi molecolari, per omologia dell'acido nucleico, questi due distinti ceppi sono stati ritenuti uguali e classificati come "TWAR", dall'unione dei nomi dei due precedenti isolati, TW-183 e AR-39¹. Nel 1989, TWAR è stata riconosciuta come la terza specie di *Chlamydia*, e per la patologia che essa determina, è stata classificata come *Chlamydia pneumoniae* (pneumoniae=polmonite). Nella nuova tassonomia clamidiale, del 1999, la *Chlamydia pneumoniae* è stata inclusa nel nuovo genere *Chlamydophila*.

1.2 Classificazione e tassonomia

L'attuale classificazione delle *Chlamydiae* è basata su criteri fenotipici, morfologici e genetici. Le 4 famiglie correnti sono abbastanza distinte. La famiglia delle *Chlamydiaceae* può essere rilevata con anticorpi anti-LPS gruppo-specifici e presentano identità ribosomiale di sequenza di almeno il 90%. Secondo la

moderna tassonomia le *Chlamydiae* appartengono all'ordine *Chlamydiales*, famiglia *Chlamydiaceae*, divisa nei due generi *Chlamydia* e *Chlamydophila* (Fig.1).

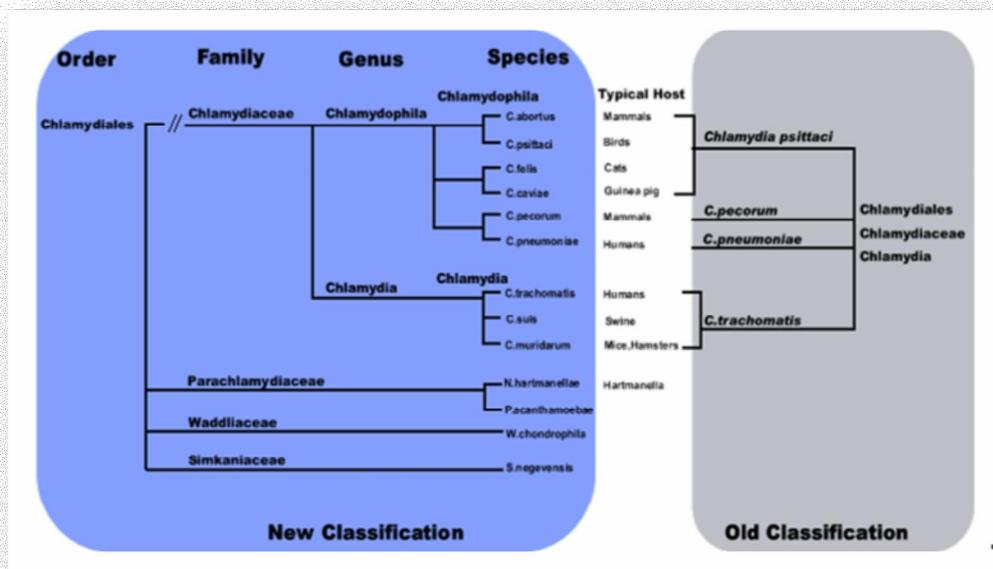


Fig. 1

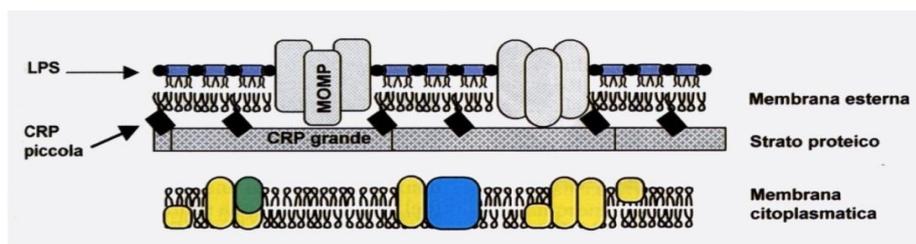
Le specie più patogene per l'uomo sono essenzialmente tre: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae* e *Chlamydophila psittaci*, che si differenziano per la composizione antigenica, per

la morfologia delle inclusioni cellulari, per la sensibilità ai sulfamidici e per la patogenicità. Queste famiglie, generi e specie sono state riconosciute sulla base dell'analisi delle sequenze dei geni ribosomiali 16S e 23S.

1.3 Ciclo biologico

Come tutte le *Chlamydiae* anche la *C. pneumoniae* presenta un ciclo di vita bifasico, che comprende due forme morfofunzionali differenti per poter sopravvivere sia all'esterno che all'interno della cellula ospite (ciclo dimorfico). Distinguiamo una forma infettante extracellulare, metabolicamente inerte, di aspetto piriforme con un diametro di circa 0.3 μm , denominato corpo elementare (Elementary Body=EB); e una forma intracellulare replicativa, e, metabolicamente attiva di circa 0.8-1.5 μm detta corpo reticolare (Reticulate Body=RB). La parete cellulare dell'EB contiene, oltre ai normali costituenti

lipopolisaccaridici (LPS), anche le proteine maggiori di membrana esterna (MOMP=Major Outer Membrane Protein), due proteine di membrana ricche in cisteina (CRP=Cystein Rich Protein) e una forma tronca di peptidoglicano, diverso da quello presente in altri batteri Gram-negativi, non rivelabile dai metodi convenzionali ed è causa della sensibilità in vitro agli antibiotici β -lattamici (Fig. 2).



Schema della probabile organizzazione degli involucri estrni di *Chlamydia*.
 LPS = Lipopolisaccaride (endotossina); MOMP = *major outer membrane protein*;
 CRP = *cysteine-rich protein*.

Fig. 2

Gli EBs possono essere considerate come strutture resistenti alle diverse condizioni ambientali e adattate a sopravvivere nello spazio extracellulare ostile al fine di trasmettere l'infezione alle

nuove cellule ospiti mediante endocitosi.

L'infezione della *C. pneumoniae* inizia con l'adesione degli EBs ai microvilli della cellula bersaglio con un processo temperatura dipendente.

In questa fase giocano un ruolo molto importante sia le cariche elettriche negative degli EBs e della membrana cellulare che l'interazione tra le adesine clamidiali e i recettori sulle cellule ospiti, e la capacità di inibire la fusione lisosomiale. Emerge da studi recenti l'utilizzo di un imitatore molecolare di eparina solfato presente sulla superficie dell'EB per l'adesione ai recettori glicosaminoglicanici (GAG) presenti sulla superficie della cellula.

Avvenuta l'adesione degli EBs, essi entrano per endocitosi e/o fagocitosi, formano delle inclusioni citoplasmatiche e subiscono un cambiamento morfo-funzionale, che comporta la riorganizzazione in RBs, metabolicamente attivi, di dimensioni maggiori, ricchi di ribosomi e con acido nucleico diffuso e reticolare.

Gli RBs presentano due serie di membrane trilaminari, una membrana interna citoplasmatica e un rivestimento esterno, ricoperto di proiezioni e rosette a elevata densità. L'RB presenta una parete cellulare meno rigida, che non gli permette di vivere fuori dalla cellula ospite e si divide per scissione binaria all'interno delle inclusioni. Dopo alcuni cicli di crescita e divisione, l'RB si riorganizza nella forma infettante EB, caratterizzata dalla condensazione del DNA grazie anche alle proteine simil-istoniche, che permettono l'impacchettamento del cromosoma clamidiale. Successivamente si avrà l'incorporazione delle proteine MOMP e CRP nella membrana esterna mediante la formazione di ponti disolfuro. Il ciclo si conclude con la liberazione degli EBs maturi dalla cellula ospite mediante lisi o esocitosi, pronti per una nuova infezione.

In vitro il ciclo ha una durata di circa 48-72 ore dipendente dai sierotipi e dalle cellule ospiti.(Fig.3).

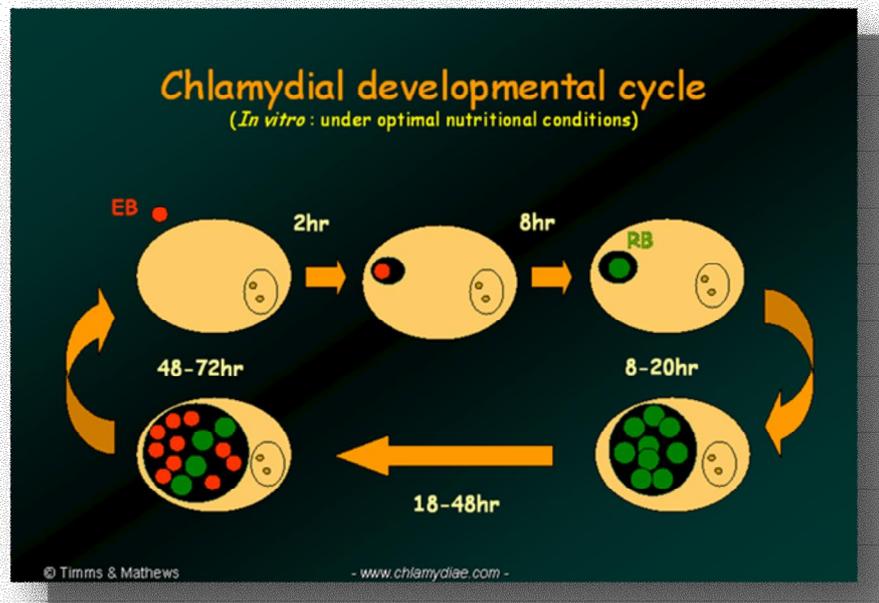


Fig. 3

Alcuni fattori di stress, quali antibiotici, mancanza di nutrienti (triptofano), e fattori del sistema immunitario, interferone- γ in particolare, possono causare l'interruzione del "normale" ciclo di sviluppo e portare alla persistenza della *Chlamydia* nella cellula infettata. Gli RBs smettono di dividersi e si trasformano nei cosiddetti corpi aberranti (Aberrant Bodies=ABs) di dimensioni

maggiori. L'espressione genica clamidiale, confrontata con quella che si osserva nel corso di infezioni acute, è alterata: vengono espressi geni per la sintesi del DNA ma non quelli per la divisione cellulare. Una volta rimossa la fonte di stress *in vitro*, gli ABs si riorganizzano in RBs e successivamente in EBs infettanti. Questo spiegherebbe la persistenza della *Chlamydia* nell'organismo anche dopo terapia, causando delle malattie croniche.(Fig.4)

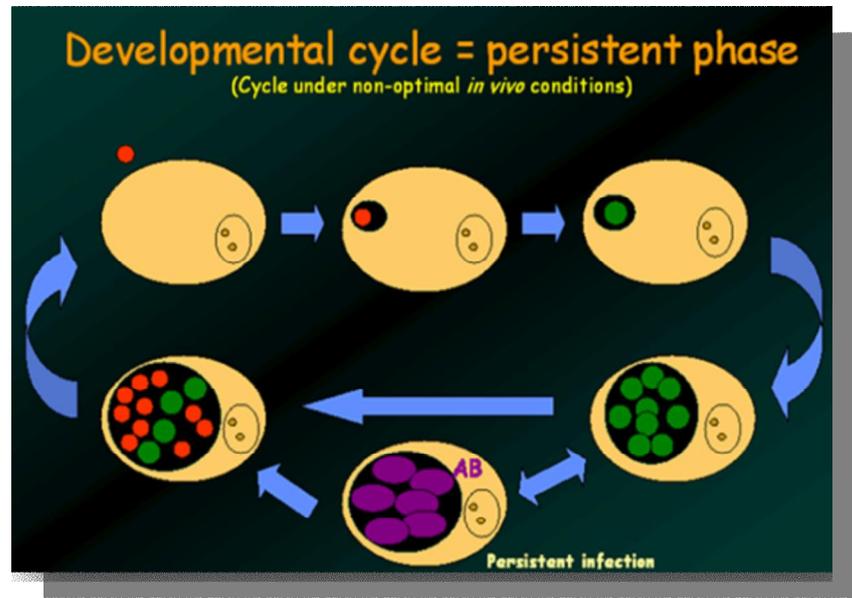


Fig. 4

1.4 Genetica del microrganismo

Nella *Chlamydia* ci sono 850-1020 geni, il numero di operoni (unità traslazionali) è di circa 170 geni regolatori con un numero di unità regolate individualmente di circa 500.

L'analisi della sequenza dei geni di *C. pneumoniae* ha rivelato la similarità con quelli di *C. trachomatis* e *C. psittaci*, codificanti importanti proteine funzionali, strutturali e immunologiche, come per esempio omologhi dei geni ompA, ompB, groEL e dnaK.

Tutte e sette i residui di cisteina coinvolti nella formazione di ponti disolfuro delle altre MOMP's clamidiali sono similmente conservate in *C. pneumoniae*. Ugualmente, i residui di cisteina in ompB sono conservate in tutte le specie clamidiali, suggerendo una funzione strutturale nella formazione dei legami disolfuro.

Due geni, codificanti heat shock protein (HSP, GroEL, e DnaK omologhi), associati con reazioni immunopatologiche e immunoprotettive in *C. trachomatis* sono stati isolati anche da *C.*

pneumoniae. Entrambe le heat shock proteins, HSP60 e HSP70 di *C. pneumoniae* sono riconosciute nel siero di pazienti con anticorpi monoclonali anti-*C. pneumoniae* mediante la microimmunofluorescenza (MIF).

Il primo gene isolato da *C. pneumoniae* è stato l'antigene specifico di 76 KDa, distinto dal gene HSP70, che ha permesso lo sviluppo di un siero iperimmune monospecifico di coniglio, per riconoscere le inclusioni di *C. pneumoniae* e di neutralizzarne l'infettività in colture cellulari.

I tre genomi più conosciuti della *C. pneumoniae*, J138, CWL029 e AR39, hanno una dimensione di 1.23×10^6 paia di basi, presentano circa 200 geni in più rispetto alla *C. trachomatis*. Queste differenze potrebbero essersi sviluppate dalla divergenza da un comune progenitore, o dalla perdita di geni o acquisizione di nuovi. Altri geni codificano per enzimi della sintesi della biotina, per proteine simil-fosfolipasi-D, e per enzimi deputati alla riparazione di purine e pirimidine, infatti in *C. pneumoniae* è stato osservato un meccanismo di riparazione

del DNA per scissione di basi (BER) per sostituzione di uno (short patch BER) o più nucleotidi (long patch BER) nel sito di lesione. La *C. pneumoniae* manca dei geni per la biosintesi del triptofano e presenta geni *inc*, nelle differenti varietà, infatti le proteine *pmp* e *inc* sono ritenute determinanti di specie. Entrambe sono proteine di superficie e giocano un importante ruolo nell'infezione, nella crescita e la sopravvivenza nella cellula ospite, e nella modificazione della nascente inclusione clamidiale.

I geni precoci hanno una funzione predominante all'inizio della sintesi delle macromolecole e nella stabilità intracellulare. Gli enzimi del metabolismo intermedio delle proteine strutturali, che si manifestano dopo 10-12 ore post-infezione, appaiono all'inizio della scissione binaria dell'RB. Mentre la funzione dei geni tardivi appare essere predominante e associata con la differenziazione terminale dell'RB in EB.

1.5 Struttura antigenica

C. pneumoniae è caratterizzata dalla presenza di un antigene di gruppo o genere-specifico e da un antigene specie-specifico. L'antigene di gruppo è di natura lipopolisaccaridica (LPS), ed è composto, in genere, da un lipide A e da una porzione polisaccaridica idrofobica e idrofilica (Fig.5).

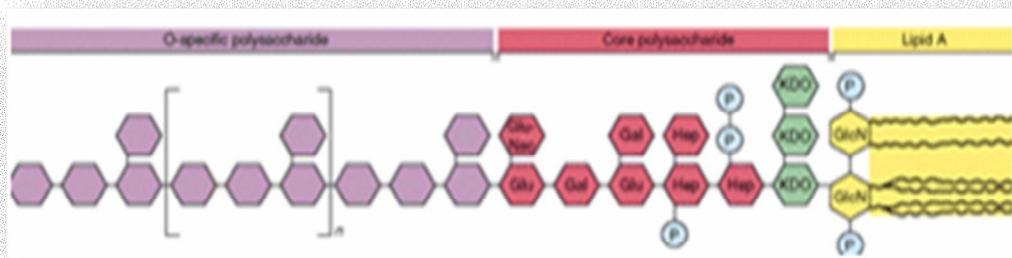


Fig. 5

Quest'ultima è costituita dall'acido 3-deossi-D-manno-2-octulosonico (KDO), il quale contiene i due determinanti antigenici di gruppo genere-specifici.

Il lipopolisaccaride della *Chlamydia* è una endotossina caratteristica ed essenziale per la vitalità del batterio; non induce

tossicità letale o pirogenicità, ma induce una risposta infiammatoria da citochine. L'antigene specie-specifico è rappresentato dalle proteine esterne di membrana (MOMPs). La MOMP di 40 kDa è la proteina più abbondante sia negli EBs che negli RBs e rappresenta circa il 60% della massa proteica totale. La struttura delle MOMPs varia nelle due diverse forme: con ponti disolfuro negli EBs, e completamente ridotta negli RBs. Le MOMPs inducono la formazione di anticorpi che sono diretti agli epitopi lineari e a quelli conformazionali, e, sono generalmente utilizzate sia per l'acquisizione di metaboliti o di nutrienti specifici, che per l'adesione alle cellule ospiti o ai tessuti. Le CRP isolate negli EBs sono due, una di 12 kDa (omp3) e una di 60 kDa (omp2). La prima è una lipoproteina, la cui struttura somiglia a quella delle lipoproteine della mureina trovate in altri Gram-negativi. Le CRPs sono indispensabili per l'integrità strutturale.

Sulla base degli antigeni tipo-specifici si distinguono 15 diversi *serovar* per *C. trachomatis*, un unico *serovar* per *C. pneumoniae*, e più di 100 per *C. psittaci*.

1.6 Manifestazioni cliniche

Polmoniti e bronchiti sono le patologie più frequentemente attribuite a *C. pneumoniae*, sebbene essa venga considerata anche causa di infezioni asintomatiche o di patologie respiratorie in associazione con altri batteri, come i pneumococchi e streptococchi, e virus, come adenovirus e cytomegalovirus, con una sintomatologia più severa.

L' infezione da *C. pneumoniae* non presenta una sintomatologia tipica, sebbene alcune caratteristiche cliniche possano aiutare a distinguerla da altri patogeni. È frequente una fase iniziale subacuta, caratterizzata da faringite con raucedine e tosse, che spesso si risolve prima dello sviluppo di una più tipica bronchite

e polmonite, febbre, spesso non presente al momento dell'osservazione clinica, ed infezione dei seni paranasali. I pazienti affetti da infezione acuta da *C. pneumoniae* presentano una VES (velocità di eritrosedimentazione) e valori di PCR (proteina C-reattiva) elevati, mentre il numero di leucociti rimane nella norma.

Il ruolo di *C. pneumoniae* come patogeno opportunistico tra persone immunocompromesse non è stato ben definito.

È stato invece suggerito che l'infezione da *C. pneumoniae* possa essere più comune tra persone con malattia polmonare ostruttiva cronica sulla base di uno studio che ha trovato una più alta prevalenza di anticorpi anti-*C. pneumoniae*.

Infezioni sistemiche severe, sebbene raramente, possono causare pericarditi e pleuriti.

La risposta al trattamento è più lenta rispetto alle affezioni respiratorie causati da altri agenti eziologici ed i sintomi tendono a recidivare se la terapia è interrotta troppo presto.

1.7 Epidemiologia

La maggior parte delle informazioni sull'epidemiologia di *C. pneumoniae* derivano dalle analisi sierologiche effettuate mediante saggio di microimmunofluorescenza (MIF).

L'infezione da *C. pneumoniae* è molto comune nei bambini in età scolastica, mentre per quelli al di sotto dei 5 anni è meno frequente. Circa il 50% di individui compresi nella fascia di età dai 5 ai 14 anni e superiore ai 20 anni, presentano anticorpi anti *C. pneumoniae* individuabili. La siero-prevalenza continua ad aumentare con l'età, e raggiunge il 75% nell'anziano. Questi tassi di prevalenza esistono nonostante la prima infezione induca una risposta anticorpale tempo-limitata (3-5anni), suggerendo che molte persone sono infettate e reinfettate più volte nel corso della vita.

1.8 Trasmissione

L'uomo è il solo serbatoio conosciuto di *C. pneumoniae*, e la trasmissione avviene per contatto diretto da persona a persona.

Le trasmissioni secondarie da *C. pneumoniae* sono inefficienti come dimostrato da studi sierologici longitudinali.

Questi studi suggeriscono anche che l'infezione può essere trasmessa da portatori asintomatici. Il periodo di incubazione dell'infezione da *C. pneumoniae* è di diverse settimane, ed è più lungo rispetto a quello di altri patogeni respiratori.

Studi di laboratorio hanno indicato che *C. pneumoniae* può sopravvivere in aerosol a temperatura ambiente in condizioni di alta umidità relativa. Sebbene si verifichi un rapido declino di infettività nel tempo, diminuisce della metà in 30 secondi, la sopravvivenza in queste condizioni mantiene la possibilità della diretta trasmissione da persona a persona in un ambiente umido e affollato.

Il microrganismo può sopravvivere per 30 ore su ripiani di formica (laminati) e 12 ore su un tessuto di carta, suggerendo che può avvenire il trasferimento da alcuni oggetti o sostanze.

1.9 Diagnosi

La conferma della presenza di *C. pneumoniae* dipende dal suo reperimento in un appropriato campione clinico del paziente, seguito dal diretto riconoscimento del microrganismo, usando un valido test diagnostico di laboratorio. La ricerca di anticorpi clamidiali è di supporto alla diagnosi mediante MIF.

Per molti anni il metodo migliore è stato rappresentato dall'isolamento di *C. pneumoniae* in colture cellulari, con una sensibilità del 60-80%.

Un vantaggio nei tests di laboratorio è derivato dallo sviluppo di tecniche non dipendenti dalla modalità di trasporto del campione. Il primo di questi è stato il test di riconoscimento

degli antigeni clamidiali (EB), direttamente nei campioni clinici, usando anticorpi monoclonali Chlamydia-specifici marcati con fluorocromi, (immunofluorescenza diretta o MAb-DFA), o la determinazione degli antigeni clamidiali mediante saggio immunoenzimatico (ELISA).

Questi metodi più tradizionali, sono stati superati da altri basati su ricerca ed amplificazione dell'acido nucleico, come la PCR (Polymerase Chain Reaction) e la LCR (Ligase Chain Reaction), o dalla ibridizzazione *in situ* (FISH=Fluorescent In Situ Hybridization). Questi metodi in genere offrono una sensibilità e specificità maggiori rispetto ai tests basati sulla ricerca dell'antigene, anche se richiedono alti costi e uno staff altamente specializzato.

1.10 Terapia

I farmaci di elezione usati nelle infezioni da *C. pneumoniae* sono le tetracicline, i fluorochinoloni, i macrolidi, i ketolidi e le rifamicine, soprattutto quelli di ultima generazione, che presentano un'aumentata attività nei confronti dei patogeni delle malattie respiratorie.

1.10.1 Tetracicline

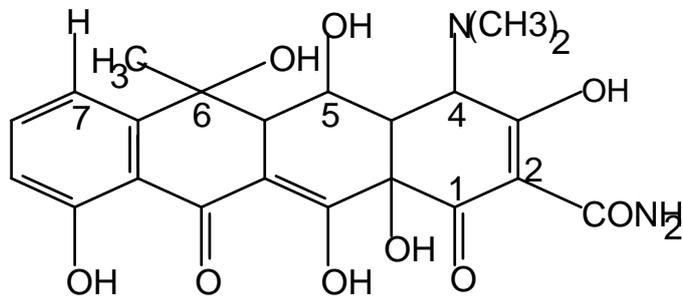
Si legano alla sub-unità ribosomiale 30S in una posizione che blocca il legame dell'aminoacil-tRNA al sito accettore sul complesso mRNA-ribosoma. L'attacco di nuovi aminoacidi alla catena peptidica in crescita risulta quindi ostacolato.

Inibiscono la sintesi proteica dei batteri legandosi alla subunità 30S del ribosoma batterico, impedendo l'accesso dell'aminoacil tRNA al sito accettore (A) presente nel complesso mRNA-ribosoma. L'associazione delle tetracicline con il ribosoma è

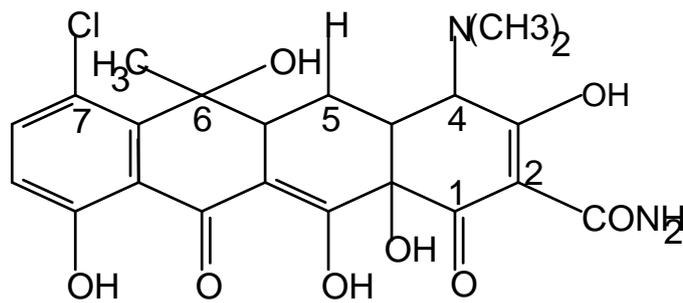
reversibile e ciò spiega gli effetti batteriostatici di questi antibiotici.

Sono classificate in:

- Tetraciline di prima generazione:



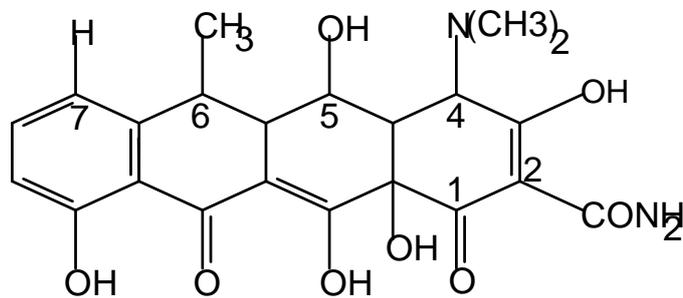
Ossitetraciclina



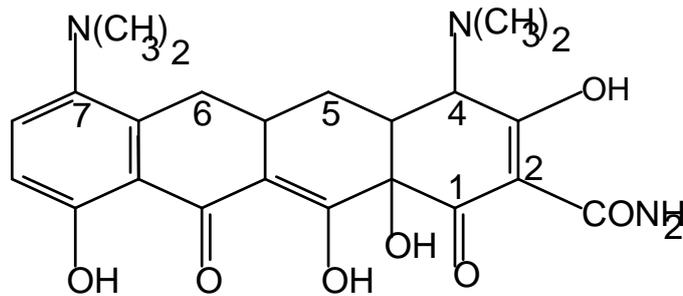
Clorotetraciclina

Richiedono un intervallo di dosaggio breve, e attualmente non vengono più utilizzate nella pratica clinica sia per la comparsa di resistenza che per il non completo assorbimento;

- Tetracicline di seconda generazione:



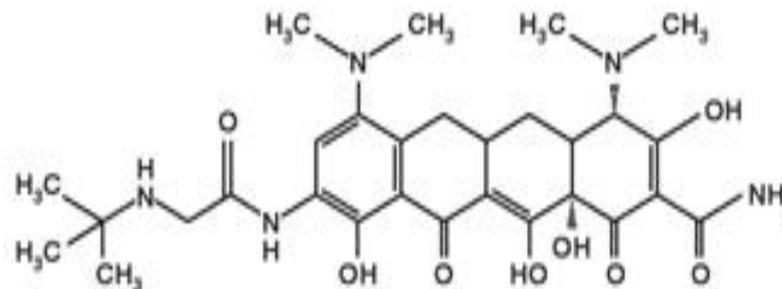
Doxiciclina



Minociclina

Consentono un intervallo di dosaggio più lungo e l'assorbimento è quasi completo (95%);

- Tetracicline di terza generazione:



Tigeciclina

La tigeciclina è l'unica glicilciclina sviluppata per l'utilizzo clinico.

E' un composto attivo contro i batteri contenenti i geni Tet responsabili dell'efflusso delle prime tetracicline [Tet(A)-Tet(D)-Tet(K)] e della protezione ribosomiale [Tet(M)]. La tigeciclina, è uno degli antibiotici ad ampio spettro più recenti.

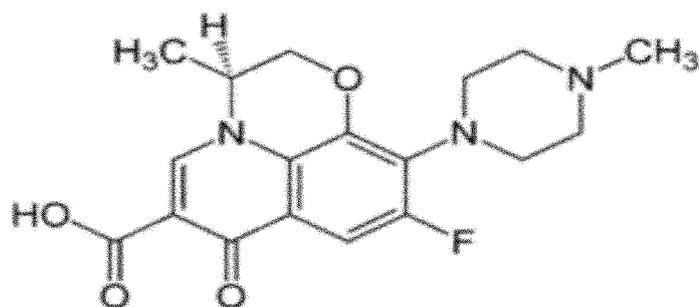
1.10.2 Chinoloni

Inibiscono la DNA-girasi e la DNA-topoisomerasi, con l'alterazione dei processi di replicazione, riparazione e trascrizione del DNA batterico, con il conseguente blocco della replicazione cellulare e dell'espressione genica. Svolgono quindi una azione battericida, dato che il batterio perde la capacità di replicarsi.

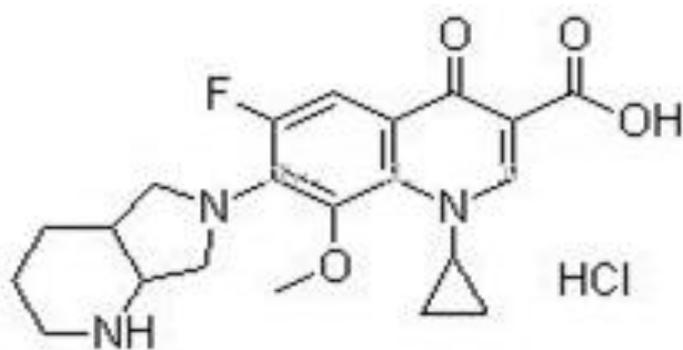
La maggior parte di essi è costituita da una struttura fondamentale rappresentata dall'anello 4-ossichinolonic o da quello naftiridinico. Nel corso degli anni sono state apportate due importanti modificazioni, l'aggiunta in posizione 6 di un atomo di fluoro, con il risultato di uno spettro d'azione più vasto, e l'aggiunta in posizione 7 dell'anello piperazinico, con l'ottenimento di una maggiore distribuzione sistemica, con un complessivo aumento dell'attività di 100 volte rispetto ai chinoloni classici.

Attualmente le molecole più attive contro i patogeni respiratori

sono:



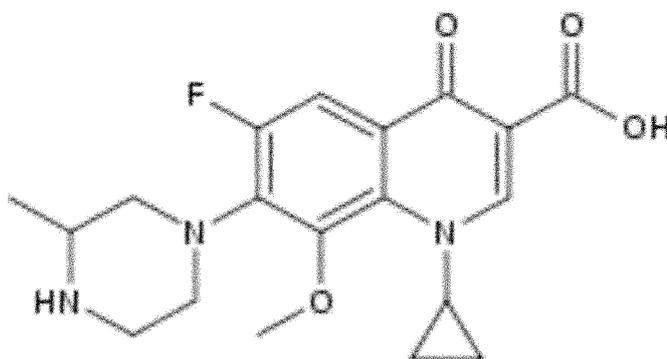
Levofloxacin



Moxifloxacin

La moxifloxacina appartiene a quel gruppo di composti di più recente generazione definiti "a spettro esteso" e "dual-targeting quinolones", in quanto dotato di una affinità intrinseca elevata e molto simile per entrambi i due enzimi batterici bersaglio.

Nei confronti di *C. pneumoniae* possiede una attività maggiore rispetto ai chinoloni meno recenti, ed è simile a quella delle tetracicline.



Gatifloxacin

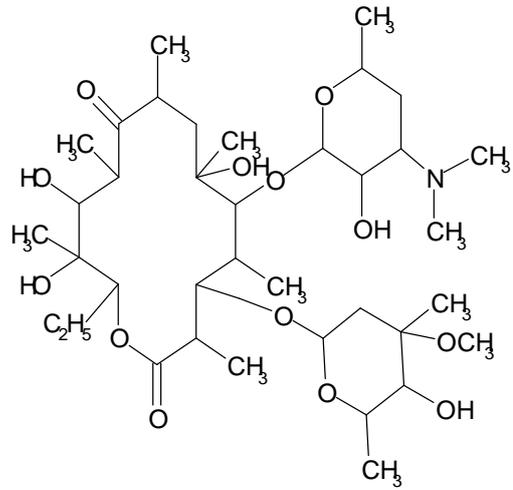
Nei confronti di *C. pneumoniae* la gatifloxacina è più attiva rispetto alla moxifloxacina, per la lunga emivita e l'elevata capacità di penetrazione in molti compartimenti tissutali,

soprattutto nell'apparato respiratorio. I dati microbiologici, insieme a quelli di farmacodinamica e farmacocinetica, ci permettono di stabilire che la gatifloxacina nelle infezioni respiratorie offre una eccellente attività battericida verso i patogeni più comuni e verso quelli atipici, costituendo una valida alternativa ai macrolidi e ai β -lattamici, specie in un periodo in cui il numero di ceppi resistenti aumenta progressivamente.

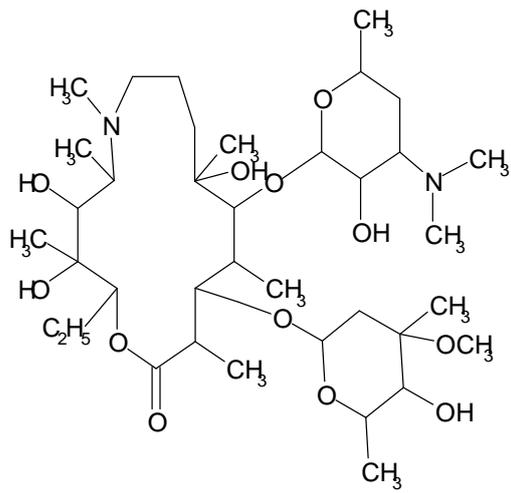
1.10.3 Macrolidi

Agiscono legandosi all'rRNA 23S nella sub-unità 50S dei ribosomi batterici e bloccano la traslocazione o la transpeptidazione nella sintesi proteica, impedendo quindi il rilascio di tRNA.

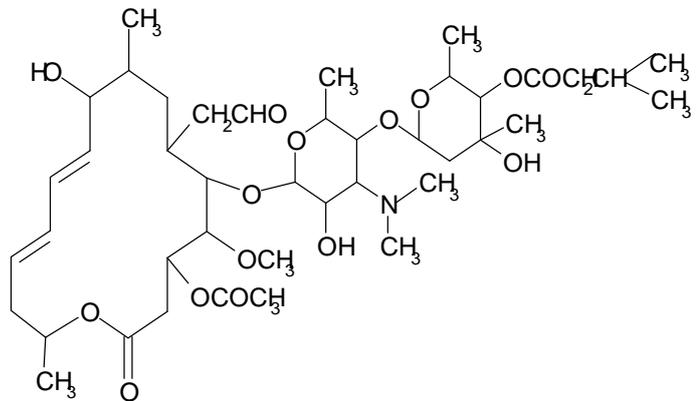
Eritromicina



Azitromicina



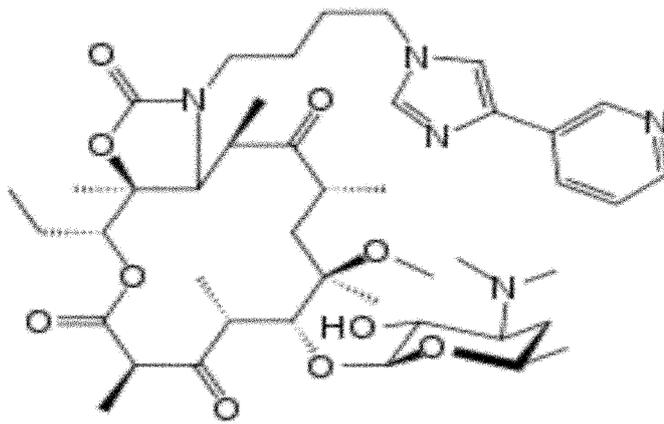
Josamicina



1.10.3.1 Ketolidi

I Ketolidi o 3-ketomacrolidi sono una nuova famiglia di antibiotici strettamente imparentata con quella dei macrolidi.

Il primo di questi antibiotici ad essere stato commercializzato è stato la Telitromicina.



Telitromicina

La telitromicina risponde all'esigenza di curare le infezioni soprattutto comunitarie delle alte e basse vie respiratorie con un'ottima attività in vitro nei confronti di *C. pneumoniae*.

1.11 Multi-patogenicità di *Chlamydomytila*

pneumoniae

C. pneumoniae è stata associata ad una vasta gamma di patologie sia acute che croniche, in virtù della sua capacità di determinare infezione persistente con conseguente danno immunopatologico ai tessuti dell'organismo ospite.

Molte delle infezioni delle basse vie respiratorie, incluse polmoniti ed esacerbazioni delle bronchiti croniche, sono state associate a questo patogeno, ma *C. pneumoniae* sembra essere anche coinvolta nelle esacerbazioni di alcuni tipi di asma acuta e cronica che non rispondono al trattamento terapeutico.

Da circa venti anni molti studi si dedicano al possibile legame tra infezioni da *C. pneumoniae* ed aterosclerosi, poiché varie evidenze suggeriscono che questo patogeno potrebbe giocare un ruolo in vari stadi di sviluppo della patologia aterosclerotica, dalle fasi iniziali alla rottura della placca.

C. pneumoniae è stato associato anche a malattie degenerative del sistema nervoso centrale come la sclerosi multipla ed il morbo di Alzheimer. Neuroni, astrociti e microglia potrebbero fungere da ospiti per il microrganismo il cui DNA è stato ritrovato nel cervello dei malati di Alzheimer e nel fluido cerebrospinale dei soggetti affetti da sclerosi multipla.

Gli studi fino ad ora effettuati in relazione al contributo che l'infezione da *C. pneumoniae* può dare nello sviluppo delle sopracitate patologie, hanno dato risultati spesso discordanti tra di loro; lo stesso dicasi per tutti i trials clinici mirati a valutare l'effetto di terapie antibiotiche e l'eventuale capacità di provocare regressione delle patologie in questione.

L'interpretazione dei risultati ottenuti non può non tener conto della diversità delle metodiche diagnostiche singolarmente utilizzate, va inoltre considerato che nessuna di queste metodiche di uso comune nell'identificazione di *C. pneumoniae* è stata fino ad ora standardizzata, con conseguente variabilità delle procedure impiegate da ogni laboratorio.

2. CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE NELLE FARINGOTONSILLITI DELL'ADULTO

2.1 Infezioni acute delle vie respiratorie

Le infezioni acute delle alte e basse vie respiratorie rappresentano condizioni cliniche ad alta incidenza in tutte le età della vita e sono la causa di una elevata morbilità che può associarsi a notevoli livelli di mortalità nelle polmoniti, e che includono le faringotonsilliti, l'otite media, le sinusiti e le esacerbazioni delle broncopneumopatie croniche ostruttive. L'eziologia di queste infezioni è attribuibile a diverse cause microbiche che spaziano da batteri comuni, quali Gram-positivi, Gram-negativi, sia aerobi che anaerobi, e Micobatteri, a numerosi virus come rhinovirus, adenovirus, influenza virus, parainfluenza virus, ai germi considerati atipici, quali

Micoplasmi, Clamidio, Legionelle, Coxielle e Nocardie, e infine, sebbene raramente in ambito comunitario, ai funghi patogeni od opportunisti e ai protozoi. *Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* e, in minor misura, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, rappresentano i patogeni principali delle malattie che richiedono un pronto intervento terapeutico a base di antibiotici.

2.2 La faringotonsillite

Le infezioni di faringe e tonsille, sono molto frequenti e nella maggior parte dei casi si risolvono da sole. I sintomi della faringotonsillite comprendono febbre di solito elevata, brividi, mal di gola (faringodinia) ed ingrossamento dei linfonodi del collo. Fra le possibili complicanze vi possono essere la cronicizzazione, complicanze immediate come la formazione di ascessi para-retrofaringei e peritonsillari, complicanze tardive di

natura immunologica che si verificano a 15-30 giorni dall'episodio acuto con reumatismo articolare acuto, glomerulonefrite acuta o eritema nodoso.

L'esame clinico evidenzia una faringe arrossata, spesso con chiazze di essudato, soprattutto se sono coinvolte le tonsille, che in tal caso si mostrano edematose ed iperemiche. È possibile riscontrare essudato purulento e una sottile membrana bianca in superficie. Per una diagnosi eziologica più precisa, oltre all'esame clinico può essere effettuata una coltura delle secrezioni raccolte col tampone faringeo.

La reale incidenza dei diversi microrganismi responsabili di faringotonsilliti è attualmente oggetto di rivisitazione alla luce delle sempre più numerose segnalazioni di isolamenti di *Chlamydomphila pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae*.

Studi eziologico-epidemiologici, condotti in massima parte in soggetti in età pediatrica, hanno ridotto al 40% la stima di una reale eziologia virale, lasciando ancora da definire una importante quota percentuale, specialmente per quanto attiene l'età adulta.

2.3 SCOPO DEL LAVORO

Il medico curante, in ambito familiare e sul territorio, non sempre è in grado di sottoporre il paziente ad accertamenti diagnostici che consentano di chiarire la natura dell'agente microbico in causa e le sue scelte sono pertanto orientate dall'esperienza. Tra i criteri che impostano la selezione del farmaco da utilizzare deve essere incluso quello che riguarda la capacità dell'antibiotico non solo di coprire l'ampio spettro dei possibili patogeni, talora in associazione, ma anche di superare la presenza di fenomeni di resistenza, fortemente variabili in funzione non solo del microrganismo considerato, ma anche della zona geografica interessata. La resistenza acquisita agli antibiotici può infatti limitarne l'efficacia clinica, portando talora a netti fallimenti terapeutici.

La possibilità di accedere a dati aggiornati sulla reale incidenza in età adulta di *C. pneumoniae*, il cui ruolo rimane ancora quantitativamente incerto, è importante per effettuare una scelta

terapeutica ragionata. Tali dati, se associati ad una valutazione clinica della sintomatologia dei soggetti esaminati, potrebbero fornire utili indicazioni per una diagnosi differenziale clinica tra faringotonsillite da *C. pneumoniae* e quella da patogeni “convenzionali”. Inoltre, dati aggiornati sulla circolazione di *C. pneumoniae* in età adulta, potrebbero rappresentare un utile dato epidemiologico ai fini della correlazione tra il predetto microrganismo e patologie non respiratorie dell’adulto.

Stante che i dati della letteratura risultano estremamente variabili e talora incerti, si è condotto uno studio epidemiologico per valutare la reale incidenza di questo microrganismo nella faringotonsillite dell’adulto.

2.4 MATERIALI E METODI

2.4.1 Raccolta dei campioni

Sono stati arruolati per lo studio, nell'ambito del progetto promosso dal Consorzio Milano-Ricerche, 94 pazienti adulti, di età compresa tra i 20 ed i 65 anni, sulla base della diagnosi clinica di faringotonsillite. Per tutti i pazienti è stato ottenuto il consenso informato scritto.

Da ogni paziente è stato ottenuto un tampone faringeo che veniva posto in 2 ml di terreno di trasporto 2SP (2-saccarosio fosfato), trattato e conservato in congelatore a -80°C fino al momento del saggio.

2.4.2 Isolamento ed identificazione di *C. pneumoniae*

Per l'isolamento di *C. pneumoniae* sono state utilizzate cellule epiteliali in linea continua HEp-2 (ATCC CCL-23TM), provenienti da carcinoma laringeo, sensibili alla crescita di *C. pneumoniae*, coltivate in terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), addizionato con L-glutamina (2mM), streptomina (100µg/ml), amfotericina B (2,5µg/ml) e 10% di siero bovino fetale (FCS) inattivato. La concentrazione del siero veniva ridotta al 2% per il mantenimento cellulare. Le cellule venivano mantenute in monostrato e sub-coltivate ogni 4 giorni con una concentrazione di $2,5 \times 10^5$ cellule/ml in fiasche da 75 o 25 cm² e poste in incubatore con 5% di CO₂ a 37°C. Per il passaggio veniva utilizzata una soluzione tamponata di tripsina. L'isolamento è stato effettuato in piastre a 24 pozzetti di HEp2 semiconfluenti, infettando il monostrato con 200µl di 2SP del campione patologico. La piastra veniva centrifugata a 1250xg a 35°C per 60 minuti per favorire l'adsorbimento degli EBs,

eventualmente presenti; veniva quindi aggiunto D-MEM completo, con aggiunta di 0,1% di cicloeximide, 1% di glucosio e 2% di FCS. Le piastre venivano quindi incubate in termostato per 72 ore a 37°C con il 5% di CO₂. Dopo tale periodo il liquido colturale veniva raccolto ed utilizzato per i passaggi successivi.

Come controllo positivo è stato utilizzato il ceppo TWAR [TWAR(CDC/CWL-029)](ATCC VR-1310TM) mantenuto nelle stesse condizioni di crescita. L' infezione al quarto passaggio veniva effettuata su HEp2 cresciute in vetrini idonei per l'esecuzione della colorazione di Giemsa e del saggio di immunofluorescenza (IFA).

Nella colorazione di Giemsa i vetrini vengono fissati in metanolo, colorati con una soluzione al 10% di Giemsa in PBS e lasciati al buio per 30 minuti. Successivamente si effettua un lavaggio con una soluzione al 30% di metanolo in PBS e due lavaggi con PBS. Quando i vetrini sono asciutti vengono montati con Entellan ed osservati al microscopio ottico a 400X

e 1000X per determinare la presenza delle tipiche inclusioni clamidiali di colore rossobluastro (Fig.12).

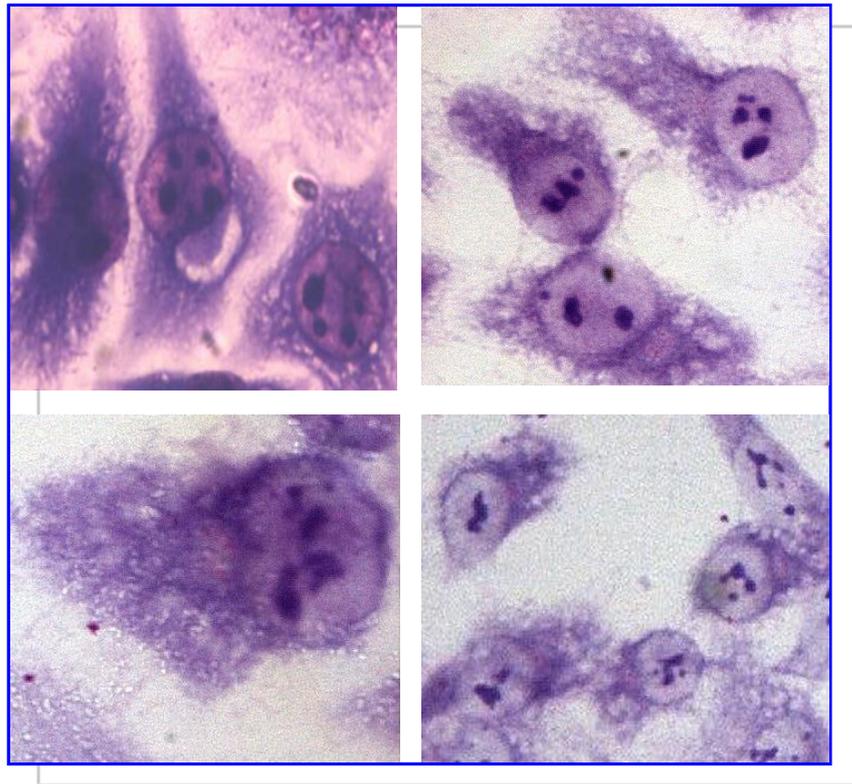


Fig. 12

L'immunofluorescenza (IFA) prevede, dopo la fissazione dei vetrini con acetone, l'incubazione con una diluizione 1:10 in PBS di un anticorpo monoclonale specifico contro *C. pneumoniae* (Monoclonal Mouse Anti-CP, clone RR-402, Dako) per 2 ore a temperatura ambiente. Dopo due lavaggi con PBS si

effettua una seconda incubazione di 1 ora con una diluizione 1:100 di un anticorpo secondario coniugato con fluoresceina isotiocianato (Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/FITC, Dako) in una soluzione 1:10 di Blue Evans in PBS. Terminato il periodo di incubazione si effettuano due lavaggi con PBS ed uno con acqua distillata. Dopo l'asciugatura ed il montaggio con glicerolo tamponato si procede con l'osservazione al microscopio a fluorescenza (Leica DMLB), evidenziando i corpi elementari fluorescenti e/o le inclusioni citoplasmatiche (Fig.13).

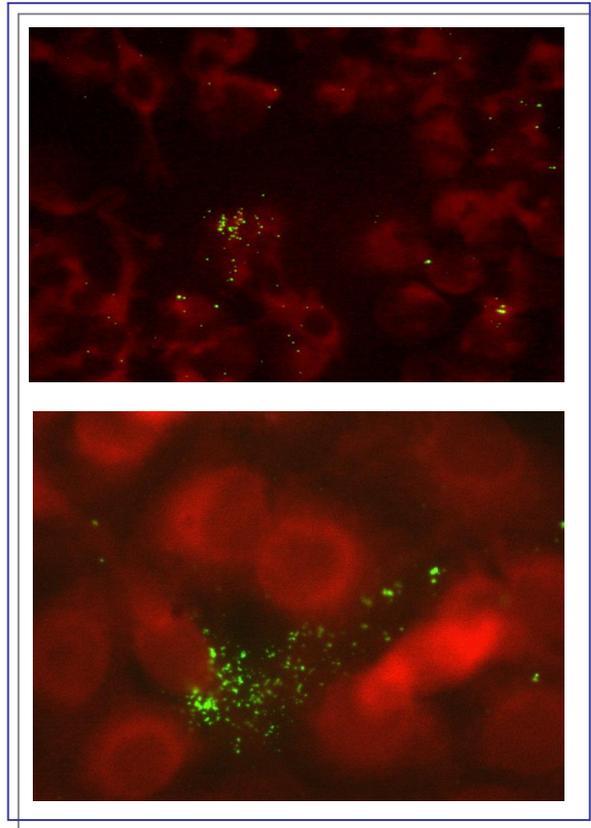


Fig. 13

2.4.3 Diagnostica molecolare

2.4.3.1 Estrazione del DNA

L'estrazione e la purificazione degli acidi nucleici da materiale biologico richiede la lisi della membrana cellulare, l'inattivazione delle nucleasi, la denaturazione delle proteine e la separazione

dell'acido nucleico. A tale scopo è stato utilizzato il kit commerciale High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche). Il protocollo d'estrazione prevede che un'aliquota di campione, pari a 200µl, venga lisata con 200µl di buffer di lisi e 40µl di proteinasi K alla temperatura di 70°C per 10 minuti. Successivamente l'acido nucleico viene precipitato con l'aggiunta di 100µl di isopropanolo in specifiche colonnine di separazione dotate di membrane in silicio, e purificato, in seguito a lavaggi con due diversi tamponi tramite centrifugazioni a 8.000xg per 1 minuto. Infine il DNA legato alla membrana è recuperato, facendo passare attraverso la stessa un tampone a pH alcalino, che, causando un piccolo cambiamento nella struttura tridimensionale del DNA, ne provoca il distacco. Dopo l'aggiunta di 200µl di tampone di eluizione e la centrifugazione per 1 minuto a 8.000xg l'eluito viene conservato a -20°C.

2.4.3.2 Amplificazione dell'acido nucleico

La tecnica della PCR (Polymerase Chain Reaction) è basata sulla ripetizione di un processo a tre fasi: denaturazione del DNA a doppio filamento; fase di appaiamento dei primers al DNA a singolo filamento; e fase di estensione.

La nested PCR è una variante della tecnica che consiste nell'utilizzo di due coppie di primers, una esterna, che genera un normale prodotto di PCR, ed una seconda coppia, che agisce su un segmento interno del primo amplificato.

Per la diagnostica molecolare di *C.pneumoniae* da tampone faringeo sono stati eseguiti tre diversi protocolli di amplificazione: una single step ed una nested PCR, aventi come target il gene codificante 16S rRNA, ed una nested PCR mirata all'amplificazione del gene codificante la proteina di membrana ompA.

Il mix usato in ogni amplificazione è mostrato nella Tabella.1.

REATTIVI	16SrRNA single-step PCR	16s rRNA nested PCR		ompA nested PCR	
		Outer amp	Inner amp	Outer amp	Inner amp
Buffer 10X	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
dNTP	200 μ M	200 μ M	200 μ M	200 μ M	200 μ M
MgCl ₂	2.5 mM	2.5 mM	2.5 mM	1.5 mM	3.5 mM
Primers	(0.5+0.5) μ M	(0.5+0.5) μ M	(0.5+0.5) μ M	(0.4+0.4) μ M	(1+1) μ M
Taq polimerasi	0.75 U	0.75 U	0.75 U	0.625 U	0.625 U
DNA	2 μ l	2 μ l	2 μ l (1:25 del 1°amp)	2 μ l	2.5 μ l (1:25 del 1°amp)

Tab.1

Il volume finale di 50 μ l, è stato raggiunto con acqua distillata sterile.

Il DNA estratto dal ceppo TWAR [TWAR(CDC/CWL-029)] (ATCC VR-1310TM) è stato usato come controllo positivo.

Le sequenze dei primers utilizzati sono mostrate nella Tabella 2.

TARGET	FORMATO	PRIMERS	AMPLICONE	CICLI
16S rRNA	Standard	CpnA 5' TGA CAA CTG TAG AAA TAC AGC 3'	463 bp	40
		CpnB 5' CGC CTC TCT CCT ATA AAT 3'		
16S rRNA	Nested	CpnA 5' TGA CAA CTG TAG AAATACAGC 3'	463 bp	40
		CpnB 5' CGC CTC TCT CCT ATA AAT 3'		
		TW50 5' AGT CCC GCA ACG AGC GCA 3'	270 bp	30
		TW51 5' GCT GAC ACG CCA TTA CTA 3'		
ompA	Nested	CP1 5' TTA CAA GCC TTG CCT GTA GG 3'	333 bp	40
		CP2 5' GCG ATC CCA AAT GTT TAA GGC 3'		
		CPC 5' TTA TTA ATT GAT GGT ACA ATA 3'	207 bp	30
		CPD 5' ATCTAC GGC AGT AGT ATA GTT 3'		

Tab.2.

La PCR single step prevedeva 40 cicli, ognuno composto da: denaturazione a 94°C per 15 secondi, annealing a 55°C per 15 secondi e polimerizzazione a 72°C per 1 minuto e 10 secondi.

Per la 16S rRNA nested PCR la prima amplificazione veniva fatta correre per 20 cicli di 15 secondi a 94°C, 15 secondi a 65°C, meno un grado per ciclo, 1 minuto e 10 secondi a 72°C, più altri 20 cicli di 15 secondi a 94°C, 15 secondi a 45°C, 1 minuto e dieci secondi a 72°C. L'amplificazione interna consisteva in 30 cicli di 15 secondi a 94°C, 15 secondi a 55°C, 1 minuto e 10 secondi a 72°C.

Il protocollo di amplificazione del gene codificante la proteina ompA tramite una nested PCR prevedeva 20 cicli di 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 65°C, meno 0.5°C per ciclo, 1 minuto a 72°C, più altri 20 cicli di 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C, 1 minuto a 72°C. L'amplificazione interna consisteva in 30 cicli di 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C, 1 minuto a 72°C.

Il rilevamento dei prodotti di amplificazione è stato effettuato mediante elettroforesi su gel di agarosio all' 1.8% e osservazione al transilluminatore (Fig.14).

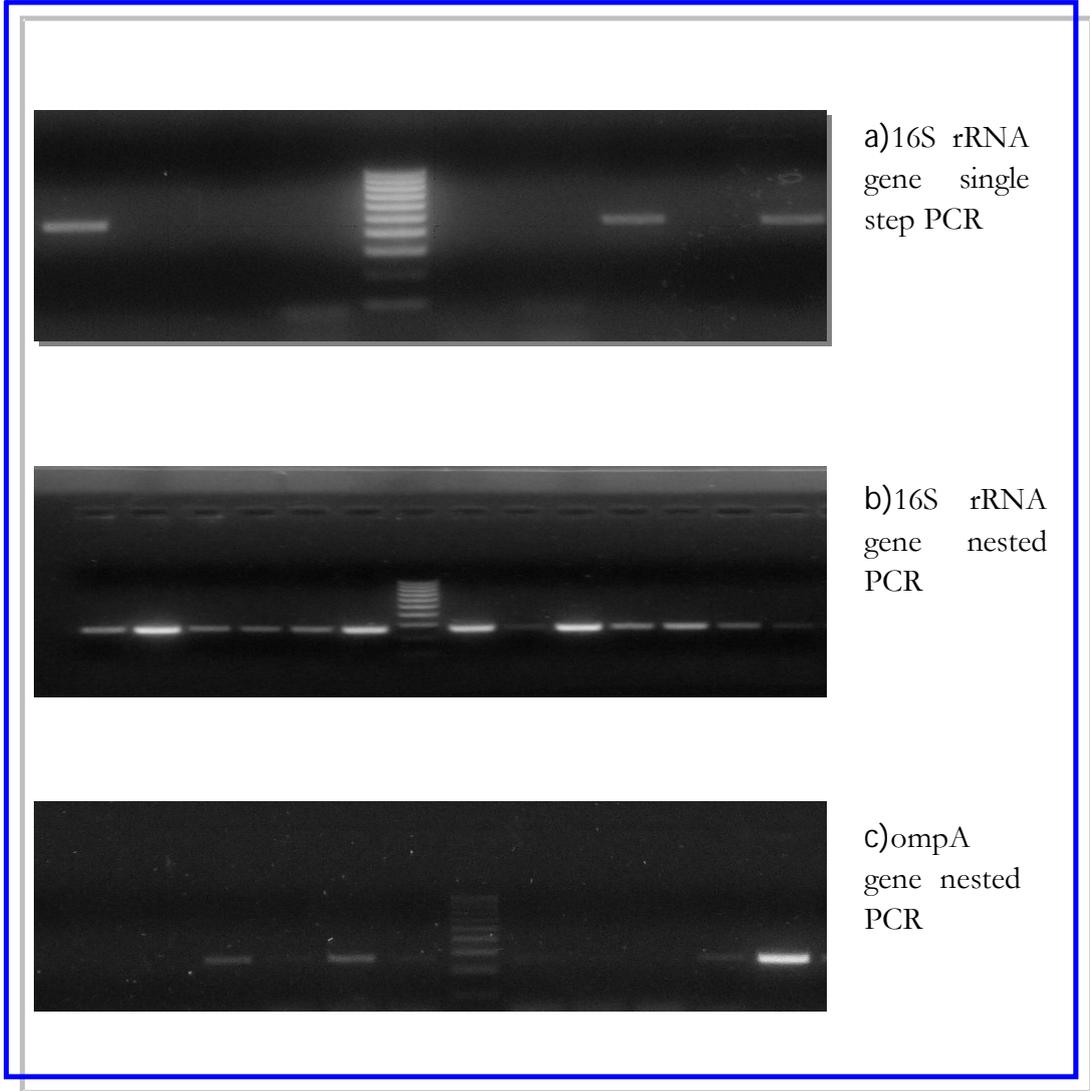


Fig.14

2.4.3.3 Sequenziamento del DNA

I geni isolati mediante PCR sono stati sequenziati mediante un sequenziatore automatico, modello ABI 3730, mostrando un'omologia con le sequenze depositate per *C. pneumoniae* del 99-100%.

2.5 RISULTATI

La percentuale di isolamento di *C. pneumoniae* da tampone faringeo su colture di cellule HEp2 è risultata pari al 15.95% (15/94) con la colorazione di Giemsa e all'11.70% (11/94) con MAb-IFA.

La 16S rRNA nested PCR ha dato una percentuale di positività pari al 12.76% (12/94), mentre solo due di questi campioni sono risultati positivi anche alla single step 16S rRNA PCR.

La percentuale di positività riscontrata con la ompA nested PCR è stata infine del 4.26% (4/94) (Tab. 3).

Queste ultime due metodiche sono state sottoposte a modifiche del protocollo iniziale per quanto riguardava le concentrazioni di alcuni reagenti, la temperatura di annealing, il numero dei cicli e, nel caso della ompA gene nested PCR, la diluizione del primo amplificato da usare come DNA per la seconda amplificazione, al fine di verificare se una percentuale di

positività così bassa fosse da imputare alle condizioni di reazione impiegate, ma l'esito finale è rimasto immutato.

Campioni	Giemsa	IFA	PCR single step	Nested PCR	
				16S rRNA gene	ompA gene
1	+	+	-	+	-
2	+	+	-	+	+
3	+	+	-	+	-
4	+	+	+	+	+
5	+	+	-	+	-
6	+	+	-	+	-
7	+	+	-	+	+
8	+	+	-	+	-
9	+	+	+	+	-
10	+	+	-	+	-
11	+	+	-	+	-
12	+	-	-	+	+
13	+	-	-	-	-
14	+	-	-	-	-
15	+	-	-	-	-

Tab.3

2.6 CONCLUSIONI

Nonostante siano trascorsi più di 20 anni da quando venne suggerito per la prima volta che *C. pneumoniae* potesse causare infezioni acute delle vie respiratorie, la diagnosi rimane ancora difficile e risente della mancanza di un “gold standard”.

La specificità dei saggi basati su metodiche colturali dipende molto dall'abilità dell'operatore nel distinguere le inclusioni clamidiali da artefatti all'osservazione microscopica, quindi dalla buona manualità con tempi di esecuzione piuttosto lunghi. Riteniamo comunque di poter affermare che l'impiego delle colture cellulari rimanga sempre uno standard di riferimento molto importante.

L'utilizzo di metodiche molecolari, permette di rilevare quantità infinitesimali di acidi nucleici in tempi molto brevi. Tuttavia, com'è noto, sebbene siano disponibili diversi protocolli di amplificazione, ognuno di essi presenta vantaggi e svantaggi, ed in molti casi la sensibilità e la specificità rimangono poco chiare.

Nonostante il Center for Disease Control and Prevention (CDC) consideri valida la single-step PCR 16S rRNA per la diagnostica molecolare di *C. pneumoniae*, alcuni dati riportati in letteratura indicano che questa tecnica può mostrarsi poco sensibile.

La nostra esperienza ci porta a concordare con l'opinione di questi ultimi. Questo può spiegare la differenza tra i risultati ottenuti con due protocolli aventi lo stesso target di amplificazione.

L'amplificazione del gene codificante la proteina di membrana ompA non ha dato nel nostro studio risultati soddisfacenti, poiché si è rivelata anch'essa poco sensibile.

Sebbene la nested PCR sia da molti considerata una tecnica troppo inaffidabile, poiché all'elevata sensibilità si associa un più marcato rischio di contaminazione, il sequenziamento del DNA estratto ed amplificato mediante 16S rRNA gene nested PCR ha confermato i dati da noi ottenuti.

Abbiamo quindi utilizzato solo i risultati ottenuti da

quest'ultima metodica nel confronto con le metodiche colturali.(Tab.4).

	PCR +	PCR -
Giemsa +	12/94	3/94
Giemsa -	-	79/94
IFA +	11/94	-

Tabella 4

Dalla valutazione dei dati ottenuti possiamo concludere che, nelle faringotonsilliti dell'adulto, l'incidenza di *C. pneumoniae* è di circa il 13%.

Considerando che, la scelta terapeutica nelle faringotonsilliti da parte del medico, in mancanza di accertamenti diagnostici che ne chiariscano l'eziologia, conduce spesso all'adozione di farmaci su base empirica, il nostro suggerimento è quindi quello di prendere in considerazione, nel trattamento di queste patologie, anche la possibilità d'infezione da *C. pneumoniae*.

Infatti per quest'ultima è necessario l'impiego di un antibiotico che porti alla completa eradicazione del germe per evitare la persistenza dell'infezione.

3. RUOLO DI CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE NELL'EZIOPATOGENESI DELL'ATEROSCLEROSI

3.1 L'aterosclerosi

L'aterosclerosi rappresenta la più importante causa di morte e di invalidità nei paesi industrializzati.

La placca aterosclerotica è stata a lungo considerata come una lesione anatomica statica e non reversibile, per arrivare, in tempi più recenti, al concetto di una lesione ricca di attività cellulare con presenza di linfociti, macrofagi e di cellule infiammatorie.

La progressione delle lesioni aterosclerotiche dalla fase asintomatica a quella caratterizzata dal verificarsi di eventi cardiovascolari acuti è favorita dalla presenza di fattori di rischio (abitudine al fumo, ipertensione arteriosa, dislipidemie, sedentarietà, obesità, diabete, etc.). Tuttavia, in molti individui

affetti da aterosclerosi, non è possibile rilevare questi fattori di rischio “tradizionali”, si è quindi diffuso negli anni l'interesse per l'individuazione di nuovi agenti eziologici.

Alcuni patogeni, sia batterici che virali, in grado di indurre uno stato di flogosi latente e/o evidente, sono stati implicati nell'eziopatogenesi dell'aterosclerosi, ed alcuni di questi sono stati rilevati in maniera chiara all'interno della lesione ateromatica.

Non è ad oggi chiaro se le infezioni costituiscano una causa o abbiano un ruolo complementare nello sviluppo dell'aterosclerosi. Tra i microrganismi considerati potenzialmente coinvolti nell'aterogenesi figura la *C. pneumoniae*, e diversi studi sembrano suggerire che le infezioni croniche causate da questo patogeno possano costituire un fattore di rischio.

Nonostante l'ipotesi che possa esistere una relazione tra processi infiammatori causati da *C. pneumoniae* ed aterosclerosi sia ormai accettata a livello mondiale, il ruolo di questo agente

infettivo risulta ancora controverso, anche a causa delle difficoltà diagnostiche legate alla sua identificazione.

A ciò si aggiunge il fatto di dover stabilire il suo ruolo causale in questa patologia a fronte di una elevata diffusione nella popolazione normale.

3.2 Evoluzione della placca aterosclerotica

La placca aterosclerotica è formata da lipidi, cellule muscolari lisce, cellule infiammatorie e da costituenti della matrice extracellulare.

La prima lesione aterosclerotica rilevabile è la stria lipidica, determinata dall'accumulo di lipidi e particelle lipoproteiche nell'endotelio, che si trasforma successivamente in placca fibrosa, costituita da cellule muscolari lisce intimali circondate da tessuto connettivo e da lipidi intracellulari ed extracellulari. L'aumento delle LDL plasmatiche provoca il loro ingresso nella

parete arteriosa, determinando accumulo di lipidi nelle cellule muscolari lisce e nei macrofagi, con conseguente iperplasia delle cellule muscolari lisce e loro migrazione nella tonaca intima. Le LDL vengono ossidate diventando tossiche per le cellule endoteliali e chemiotattiche per i monociti, che migrano anch'essi nella tonaca intima trasformandosi in macrofagi. Recettori posti sulla superficie dei macrofagi facilitano l'ingresso delle LDL ossidate all'interno di queste cellule, trasformandole in macrofagi carichi di lipidi e cellule schiumose.

Altro fattore coinvolto sembra essere il danno endoteliale cronico, che determina adesione delle piastrine allo strato sottoendoteliale, chemiotassi di monociti e linfociti T e rilascio di fattori di crescita che inducono la migrazione delle cellule muscolari lisce che si replicano e sintetizzano tessuto connettivo, con conseguente formazione della placca fibrosa. La placca aterosclerotica può accrescersi lentamente e dar luogo a stenosi, o determinare occlusione totale dell'arteria.

Alcune placche sono stabili, ma altre, specialmente quelle ricche di lipidi e di cellule infiammatorie possono andare incontro a rottura spontanee determinando trombosi.

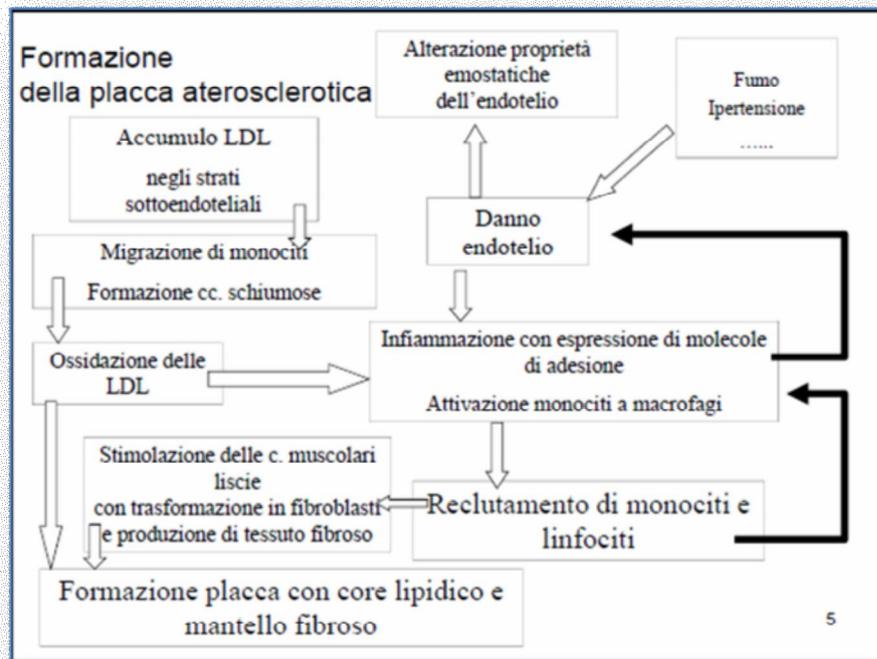


Fig.15

3.3 Chlamydophila pneumoniae ed aterosclerosi

È ormai accertato che *C. pneumoniae* possa essere trasportata, dalle vie respiratorie a distretti distanti, tramite monociti o i macrofagi che svolgono la duplice funzione di ospite dell'infezione e di carrier che ne veicola la diffusione a livello sistemico, ma anche infettando direttamente le cellule endoteliali.

Le MOMP presenti nella membrana esterna dei corpi elementari favoriscono l'adesione dei monociti infetti alle cellule endoteliali delle coronarie e a cellule della muscolatura liscia, evento che induce la sintesi di citochine infiammatorie quali IL-6, TNF- α , IL-1 β e chemochine.

L'IL-6 causa l'aumento delle concentrazioni plasmatiche delle così dette "proteine della fase acuta", proteina C e fibrinogeno, il cui aumento è un marker di evento cardiovascolare.

L'LPS clamidiale può indurre sintesi di citochine pro-infiammatorie e determinare accumulo di esteri del colesterolo

nei macrofagi, con formazione di cellule schiumose.

Altre molecole che possono contribuire alla formazione delle lesioni aterosclerotiche sono le proteine dello shock termico (HSPs). Infatti la *C. pneumoniae*, nel suo stato infettivo esprime una HSP, simile alla proteina da shock termico presente nell'uomo, il quale può sviluppare un anticorpo contro entrambe queste proteine, causando una reazione autoimmune. Anche le HSPs di *C. pneumoniae*, come l'LPS, inducono nei macrofagi, nelle cellule endoteliali e della muscolatura liscia dei vasi l'ossidazione delle molecole di LDL. Sia le HSP umane che quelle di *C. pneumoniae* sono state riscontrate nei macrofagi presenti nella placca, dove stimolano il rilascio di citochine infiammatorie.

Le HSP60 stimolano, inoltre, i macrofagi a produrre TNF- α e metalloproteine che degradano i tessuti connettivali promuovendo la rottura della placca con formazione di trombi.

La *C. pneumoniae*, infettando monociti, macrofagi, cellule endoteliali, cellule della muscolatura liscia dei vasi provoca, da

parte di queste cellule, anche la produzione di fattori ad attività procoagulante attraverso l'attivazione di fattori di trascrizione nucleare quali il *nuclear factor* (NF- κ B).

3.4 SCOPO DEL LAVORO

Ad oggi, diverse ricerche sono state dedicate al tentativo di scoprire una relazione causale tra infezioni batteriche ed aterosclerosi, ma sono ancora pochi i dati riguardanti il possibile legame tra PAD (Peripheral Artery Diseases) ed infezione da *C. pneumoniae*.

Scopo dello studio è stato quello di valutare la sieroprevalenza di anticorpi specifici anti-*C. pneumoniae* in tre categorie di soggetti:

- pazienti affetti da PAD;
- pazienti con fattori di rischio per lo sviluppo di patologie cardiovascolari (CVD);
- soggetti di controllo sani.

3.5 MATERIALI E METODI

3.5.1 Raccolta dei campioni

Sono stati arruolati per lo studio, 80 soggetti affetti da PAD, classificati come gruppo 1, la cui valutazione clinica è stata effettuata mediante misurazione dell'indice $ABI \leq 0.9$ ed esame eco-doppler arterioso degli arti inferiori.

L'indice ABI (Ankle Brachial Index) si basa sulla misurazione della pressione arteriosa massima delle caviglie e delle braccia.

Nei soggetti sani, la pressione arteriosa sistolica della caviglia è maggiore di quella del braccio, quindi il rapporto fra queste due pressioni è superiore all'unità. Se l'ABI è inferiore a 0,9 si deve ipotizzare un restringimento aterosclerotico a carico di una o più arterie che portano sangue agli arti inferiori.

Il gruppo 2 è stato costituito da 80 soggetti a rischio di sviluppo di CVD con $ABI > 0.9$ e fattori di rischio generici come ipertensione arteriosa, iperlipidemia ed abitudine al fumo.

Il profilo sierologico di questi 160 pazienti è stato messo a confronto con quello di 80 soggetti di controllo sani, inseriti nel gruppo 3.

	PAD n (%)	R.F. + ABI>0.9	CONTROLLI
N°	80	80	80
Età	62.74±10.53	62.40±10.25	60.10±11.15
Maschi n° (%)	52 (60.97)	53 (66.25)	52 (65)
Femmine n° (%)	28 (35)	27 (33.75)	28 (35)
Fumatori n° (%)	58 (72.5)	58 (72.5)	10 (12.5)
Non fumatori n° (%)	10 (12.5)	9 (11.25)	58 (72.50)
Ex fumatori n° (%)	22 (27.5)	23 (28.75)	12 (15)
Ipertesi n° (%)	40 (50)	50 (62.5)	2 (2.5)
Dislipidemia n° (%)	40 (50)	55 (50.75)	3 (3.75)
BMI	27.31±3.86	27.61±3.76	25.32±2.66
WHR	97.21±10.35	98.11±9.45	93.09±6.15
Pressione gamba destra (mmHg)	130.94±26	140.85±29	145.15±22.12
Pressione gamba sinistra (mmHg)	123.878±27.59	143.88±28.59	145.28±18.19
ABI	0.81±0.11	1.04±0.10	1.12±0

Tabella 5: Caratteristiche demografiche e cliniche della popolazione testata

3.5.2 Saggio di microimmunofluorescenza (MIF)

L'analisi si è basata sulla microimmunofluorescenza ricercando anticorpi specifici IgG, IgM ed IgA anti-*C. pneumoniae* mediante l'utilizzo di Micro-IF test kit (Labsystem-DASIT).

Diluizioni al raddoppio dei sieri sono state poste nei pozzetti dei vetrini contenenti corpi elementari inattivati ed adsorbiti. La minima diluizione testata è stata per le IgM \geq 1/16, per le IgG \geq 1/32, e le IgA \geq 1/32.

Dopo incubazione in camera umida a 37°C per un tempo variabile dai 30 minuti alle tre ore a seconda della classe di anticorpo da individuare, l'eccesso di campione veniva rimosso mediante lavaggi con PBS, seguiva l'aggiunta di anti-anticorpi umani coniugati con FITC e successiva incubazione in camera umida per 30 minuti. I vetrini venivano lavati, asciugati e montati per la lettura al microscopio a fluorescenza(Fig.16).

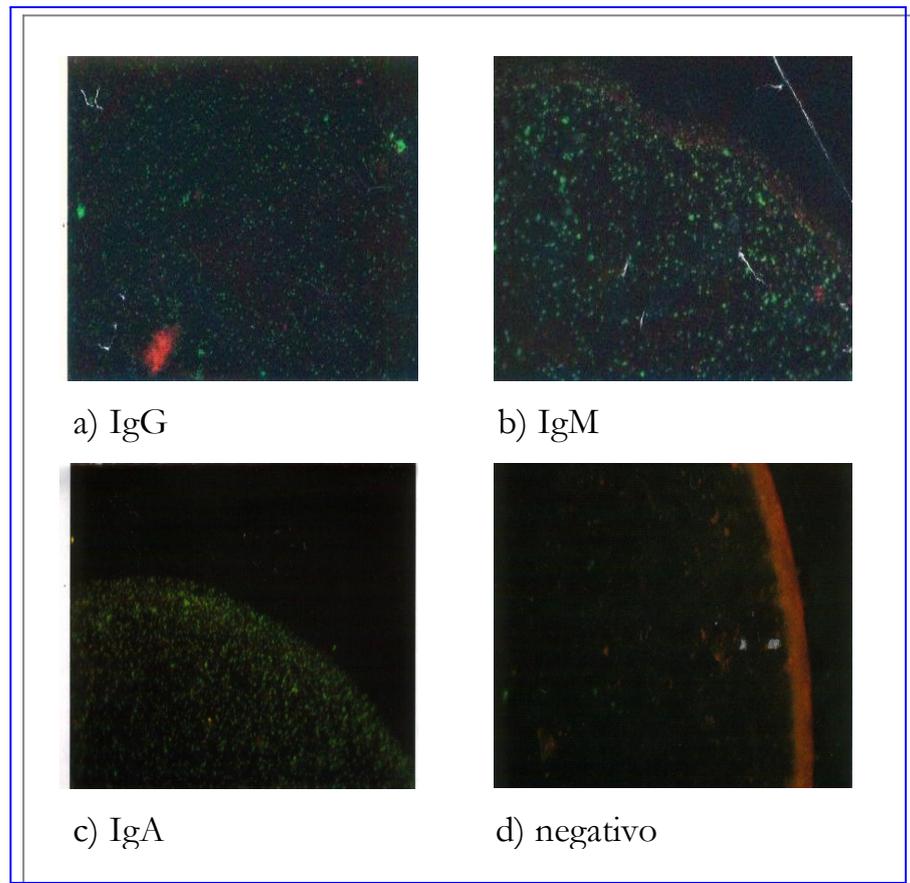


Fig.16

I dati ottenuti sono stati analizzati statisticamente tramite il test del chi quadro (χ^2) e un test non parametrico di segni, utilizzando il programma SPSS 10.1 per Windows. Il valore $P < 0.05$ è stato considerato significativo.

3.6 RISULTATI

I risultati hanno dimostrato una più elevata frequenza di infezione da *C. pneumoniae* in soggetti con PAD rispetto a quelli a rischio di CVD ed ancor più rispetto ai soggetti sani.

Nel gruppo 1, il 55% dei soggetti analizzati (44/80) ha mostrato presenza di IgG anti-*C. pneumoniae* con titoli elevati (1/512, 1/256) (Fig.17).

Nel gruppo 2, il 42.58% dei soggetti (34/80) mostravano sieropositività, con titoli elevati di IgG, anche se in percentuale minore rispetto al gruppo 1.

Nel gruppo 3, la percentuale di sieropositività è risultata del 30% (24/80) con titolo più bassi rispetto a quelli dei gruppi 1 e 2.

In relazione alle IgA, il 45% (36/80) dei soggetti del gruppo 1 ed il 17.5% (14/80) del gruppo 2 hanno mostrato sieropositività, mentre nessuno dei soggetti sani è risultato positivo.(Fig.18).

La presenza di IgM anti-*C.pneumoniae* non è stata rilevata in nessuno dei tre gruppi sottoposti allo studio.

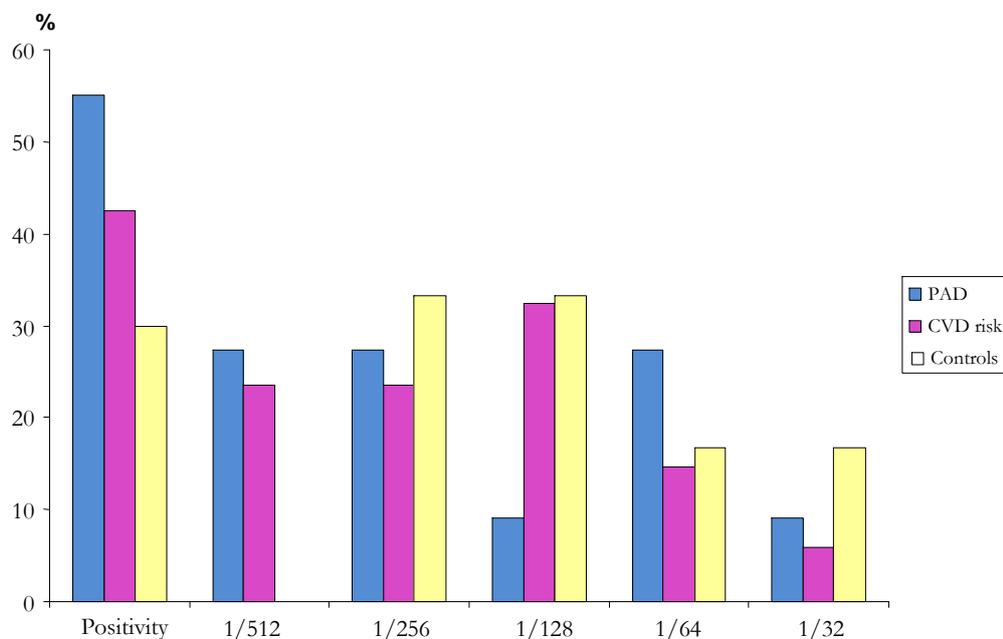


Fig 17 – Sieropositività per infezione da *C. pneumoniae* e titolo delle IgG

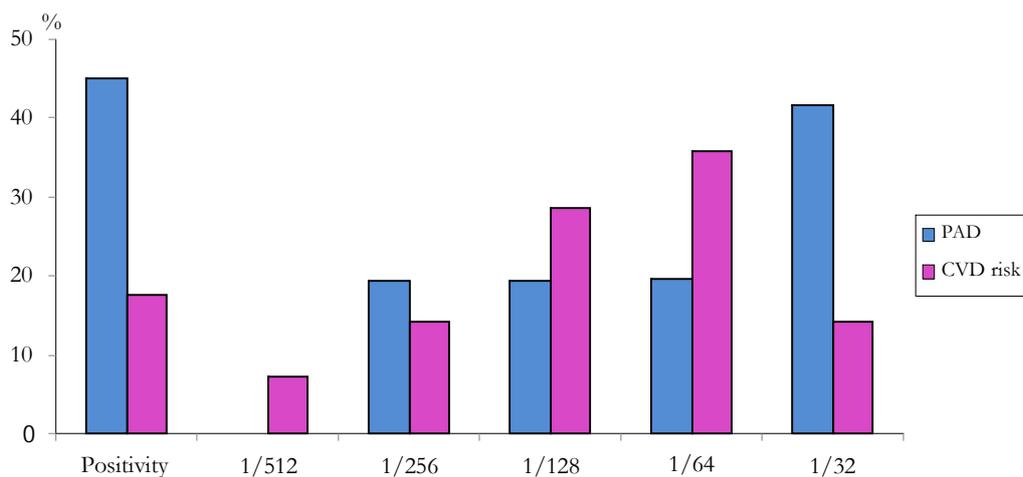


Fig.18 - Sieropositività per infezione da *C. pneumoniae* e titolo delle IgA.

In base all'analisi statistica la differenza tra la prevalenza di sieropositività di IgG del gruppo 1 e quella del gruppo 3 è stata valutata significativa.

La differenza di sieropositività per le IgA tra gruppo 1 e gruppo 2 non è stata considerata statisticamente significativa.

IgG	PAD n (%)	CV Risk n (%)	Control n (%)	PAD vs Control	CV Risk vs Control	PAD vs CV Risk
Positivity	44/80 (55)	34/80 (42.5)	24/80 (30)	p<0.02	ns	ns
1/512	12 (27.3)	8 (23.5)	0	p<0.01	p<0.03	ns
1/256	12 (27.3)	8 (23.5)	8 (33.3)	ns	ns	ns
1/128	4 (9.0)	11 (32.4)	8 (33.3)	p<0.03	ns	p<0.02
1/64	12 (27.3)	5 (14.7)	4 (16.7)	ns	ns	ns
1/32	4 (9.0)	2 (5.9)	4 (16.7)	ns	ns	ns

Tabella 6: Sieropositività per IgG-anti- *C.pneumoniae* e significatività dei risultati.

IgA	PAD n (%)	CV Risk n (%)	Control n (%)	CV Risk vs Control	PAD vs CV Risk
Positivity	36/80 (45)	14/80 (17.5)	0	0.0001	0,0001
1/512	0	1 (7.1)	0	ns	ns
1/256	7 (19.4)	2 (14.3)	0	ns	0,01
1/128	7 (19.4)	4 (28.6)	0	ns	ns
1/64	7 (19.4)	5 (35.7)	0	ns	ns
1/32	15 (41.7)	2 (14.3)	0	ns	0,001

Tabella 7: Sieropositività per IgA-anti- *C.pneumoniae* e significatività dei risultati.

	PAD	CV Risk	Controls	PAD vs Control	CV Risk vs Control	PAD vs CV Risk
IgG (MV±SD)	0.0061±0.0089	0.0058±0.0074	0.0088±0.0098	p<0.01	p<0.01	p<0.01
IgA (MV±SD)	0.0139±0.0116	0.0100±0.0091	/	/	/	p<0.01

Tabella 8: Media geometrica dei differenti titoli di anti-*C. pneumoniae* IgG/IgA e comparazione statistica. (Test del Chi-quadro, p<0.05). MV: Media; SD: Deviazione Standard

3.7 CONCLUSIONI

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

I risultati fino ad ora ottenuti sembrano indicare un legame tra la presenza di elevati titoli anticorpali di IgG anti-*C. pneumoniae* ed i marker dell'infiammazione.

Inoltre, biopsie effettuate su arterie femorali o poplitee di pazienti affetti da PAD hanno mostrato la presenza di *C. pneumoniae* all'interno della placca aterosclerotica.

Nonostante queste evidenze, il ruolo eziologico o patogenetico di *C. pneumoniae* non è ancora stato chiarito.

È noto che *C. pneumoniae* può infettare le cellule che compongono l'endotelio aumentando l'espressione di molecole di adesione e chemochine e provocando migrazione di leucociti e danno endoteliale. Ciò determina proliferazione della

muscolatura liscia vasale e rilascio di molecole pro-infiammatorie, con conseguente progressione del danno endoteliale.

Questa serie di eventi lascia supporre una stretta relazione tra infezione da *C. pneumoniae* e la degenerazione endoteliale che determina aterosclerosi.

In questo studio abbiamo esaminato tre diverse categorie di soggetti: pazienti con PAD, pazienti senza PAD ma con fattori di rischio cardiovascolare e soggetti sani. I nostri risultati mostrano un'elevata frequenza di infezione nei pazienti con PAD, ed un'alta prevalenza di titoli elevati, se confrontati con il gruppo di controllo. Inoltre i livelli di anticorpi anti- *C. pneumoniae* sono risultati più elevati nei soggetti a rischio cardiovascolare che nei soggetti sani. In base a questi risultati possiamo affermare che l'infezione da *C. pneumoniae*, specialmente se rilevata in base alla presenza di alti titoli di IgG specifiche, è più frequente in soggetti con patologie

aterosclerotiche come la PAD, e, di conseguenza, che essa possa rappresentare un fattore di rischio addizionale.

Inoltre, i soggetti a rischio di sviluppo di patologie cardiovascolari presentavano una frequenza di titoli di IgA rilevante rispetto ai soggetti con PAD, spiegabile con la presenza di un'infezione clamidiale persistente. Per questa ragione si ritiene di poter affermare che l'infezione da *C. pneumoniae* sia da considerare come un addizionale fattore di rischio nella patogenesi delle CVD.

Se venisse ulteriormente confermato il ruolo della *C. pneumoniae* nell'aterogenesi, si potrebbero avere nuove armi terapeutiche per la prevenzione delle patologie a carico del sistema cardiovascolare.

4. BIBLIOGRAFIA

1. Grayston JT, Kuo CC, Campbell LA et al. *Chlamydia pneumoniae* sp.nov. for *Chlamydia* sp. strain TWAR. *Int J Syst Bacteriol* 1989; 39: 88–90.
2. Lieberman D, Lieberman D, Printz S et al. Atypical pathogen infection in adults with acute exacerbation of bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 406–410.
3. Cosentini R, Tarsia P, Canetta C et al. Severe asthma exacerbation: role of acute *Chlamydophila pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Respir Res* 2008; 9: 48.
4. Bush, R.M. and Everett,. Molecular Evolution of the Chlamydiaceae. *J Syst Evol Microbiol* 51, 203-220.
5. Everett KD, Bush RM, Andersen AA. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol* 1999; 49: 415–440.
6. Hammerschlag MR. *Chlamydia pneumoniae* and the lung. *Eur Respir J* 2000; 16: 1001–1007.

7. Marrie, T.J., Peeling, R.W., Reid T. et al. Chlamydia species as a cause of community-acquired pneumonia in Canada. *Eur Respir J* 2003; 21:779–784.
8. Matsumoto, A.. Fine structures of cell envelopes of Chlamydia organisms as revealed by freeze-etching and negative staining techniques. *Journal of Bacteriology* 116(3): 1355-1363.
9. Gaydos, C. A., T. C. Quinn, L. D. Bobo, J. J. Eiden. Similarity of Chlamydia pneumoniae strains in the variable domain IV region of the major outer membrane protein gene. *Infect. Immun.* 1992; 60:5319–5323.
10. Oktem, I. , Ellidouz, H., Sevinc, C., Kilinc, O., Absakoglu, G., Sayiner, A., Ucan, ES., Sezgin, S., Ozdemir, H., Yuksel, B. PCR and serology were effective for identifying C. pneumoniae in a lower respiratory infection out break among military recruits. *JPN J Infect Dis.* 2007; 60 :97-101.
11. Melnick, S. L., E. Sharar, A. R. Folsom, J. T. Grayston, P. D: Sorlie, S.-P. Wang, and M. Szklo. Past infection by Chlamydia pneumonia strain TWAR and asymptomatic atherosclerosis. *AM. J. Med.* 1993;95:499-504.
12. Campbell, L. A., C.-C. Kuo, S.-P. Wang, and J. T. Grayston. Serological response to Chlamydia pneumoniae infection. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28:1261–1264.
13. Lijima, Y., N. Miyashita, T. Kishimoto, Y. Kanamoto, R. Soejima, and A. Matsumoto. Characterization of Chlamydia pneumoniae species-specific proteins immunodominant in humans. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(3): 583-588

14. Kalman, S., et al. Comparative genetics of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*. *Nature Genetics*. 1999; 21, 4 :385-389
15. Rockey, D. D., J. Lenart, and R. S. Stephens. Genome sequencing and our understanding of chlamydiae. *Infection and Immunity*. 2000; 68: 473-5479
16. Grayston, J.T. Infection caused by *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. *Infect. Dis*. 1992;15:757-763.
17. Grayston, J. T., M. B. Aldous, A. Easton, S.-P. Wang, C.-C. Kuo, L. A. Campbell, and J. Altman. Evidence that *Chlamydia pneumoniae* causes pneumonia and bronchitis. *J. Infect. Dis*.1993; 168:1231–1235.
18. Aldous, M. B., J. T. Grayston, S.-P. Wang, and H. M. Foy. Seroepidemiology of *Chlamydia pneumoniae*, TWAR infection in Seattle families. *J. Infect. Dis*. 1992; 166:646–649.
19. Theunissen, H. J. H., N. A. Lemmens-den Toom, A. Burggraaf, E. Stolz, and M. F. Michel. Influence of temperature and relative humidity on the survival of *Chlamydia pneumoniae* in aerosols. *Appl. Environ. Microbiol*. 59:2589–2593.
20. Kumar S, Hammerschlag MR. Acute respiratory infection due to *Chlamydia pneumoniae*: current status of diagnostic methods. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 568–576.
21. Apfalter P, Reischl U, Hammerschlag MR. In-house nucleic acid amplification assays in research: how much quality control is needed before one can rely upon the results? *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5835–5841.

22. Falsey, A. R., and E. E. Walsh. Transmission of Chlamydia pneumoniae. *J Inf Dis.* 1993; 168(2):493-6.
23. Thom, D. H., J. T. Grayston, S.-P. Wang, C.-C. Kuo, and J. Altman. Chlamydia pneumoniae strain TWAR, Mycoplasma pneumoniae and viral infections in acute respiratory disease in a university student health clinic population. *Am J Epidemiol.* 132(2):248–256.
24. Seppala H, Lahtonen R, Ziegler T, Meurman O, Hakkarainen K, Miettinen A, Arstila P, Eskola J, Saikku P, Huovinen P. Clinical scoring system in the evaluation of adult pharyngitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1993 Mar;119(3):288-91.
25. Huovinen P, Lahtonen R, Ziegler T, Meurman O, Hakkarainen K, Miettinen A, Arstila P, Eskola J, Saikku P. Pharyngitis in adults: the presence and coexistence of viruses and bacterial organisms. *Ann Intern Med.* 1989 Apr 15;110(8):612-6.
26. Romano Carratelli C, Nuzzo I, Cozzolino D, Bentivoglio C, Paolillo R, Rizzo A. Relationship between Chlamydia pneumoniae infection, inflammatory markers, and coronary heart diseases. *Int Immunopharmacol.* 2006 May;6(5):848-53.
27. Myashita n, Fukano H, Yoshida K, Niki Y, Matsushima T., 2003, Chlamydia pneumoniae infection in adult patients with persistent cough. *J Med Microbiol.* Mar;52 (Pt 3):265-269
28. Kim WJ, Lee HY, Lee ME, Lee SJ., 2006, Serology of Chlamydia pneumoniae in patients with chronic cough. *Respirology.* Nov;11(6): 805-808.

29. Cooper RJ, Hoffman JR, Bartlett JG, Besser RE, Gonzales R, Hickner JM, Sande MA; 2001 *Ann Emerg Med.* Jun; 37(6):711-719 Principles of appropriate antibiotic use for acute pharyngitis in adults: background. Special Report: Principles of Judicious Antibiotic Use - Centers for Disease Control and Prevention. UCLA Emergency Medicine Center, Los Angeles, California 90024, USA.
30. Esposito S, Blasi F, Bosis S, Droghetti R, Faelli N, Lastrico A and Principi N. *Journal of Medical Microbiology* 2004 53: 645–651 Aetiology of acute pharyngitis: the role of atypical bacteria.
31. Mahony JB, Chong S, Coombes BK, Smieja M, Petrich A. Analytical sensitivity, reproducibility of results, and clinical performance of five PCR assays for detecting *Chlamydia pneumoniae* DNA in peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Microbiol.* 2000 Jul;38(7):2622-7.
32. Esposito S, Blasi F, Arosio C et al. Importance of acute *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* infections in children with wheezing. *Eur Respir J* 2000; 16: 1142–1146.
33. Beaty, C. D., J. T. Grayston, S.-P. Wang, C.-C. Kuo, C. S. Reto, and T. R. Martin. *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR, infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis.* 1991;144(6):1408–1410.
34. 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.

35. Black PN, Blasi F, Jenkins CR et al. Trial of roxithromycin in subjects with asthma and serological evidence of infection with *Chlamydia pneumoniae*. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 536–541.
36. Kraft M, Cassell GH, Pak J et al. *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in asthma: effect of clarithromycin. *Chest* 2002; 121: 1782–1788.
37. Esposito S, Bosis S, Faelli N et al. Role of atypical bacteria and azithromycin therapy for children with recurrent respiratory tract infections. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24: 438–444.
38. Richeldi L, Ferrara G, Fabbri LM et al. Macrolides for chronic asthma (Cochrane Review). The Cochrane Library, Issue 1. Oxford: Update Software, 2003.
39. Johnston SL, Blasi F, Black PN et al. The effect of telithromycin in acute exacerbations of asthma: the TELICAST study. *New Engl J Med* 2006; 354: 1589–1600.
40. Monno R, Di Biase M, Costi A, De Nicolò T, Correale M, Bolognese P, Losacco G. *Chlamydia pneumoniae*, aterosclerosi e malattie coronariche *Ital Heart J Suppl* Vol 4, 2003:383-397
41. Watson C, Alp NJ. Role of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerosis. *Clin Sci* 2008; 114: 509–531.
42. Sriram S, Stratton CW, Yao S et al. *Chlamydia pneumoniae* infection of the central nervous system and multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1999; 46: 6–14.
43. Boman J, Roblin PM, Sundström P et al. Failure to detect *Chlamydia pneumoniae* in central nervous system of patients with MS.

Neurology 2000; 54: 265.

44. Ke Z, Lu F, Roblin P et al. Lack of detectable Chlamydia pneumoniae in brain lesions of patients with multiple sclerosis. Ann Neurol 2000;48: 400.

45. Layh-Schmitt G, Bendl C, Hildt U et al. Evidence for infection with Chlamydia pneumoniae in a subgroup of patients with multiple sclerosis. Ann Neurol 2000; 47: 652–655.

46. Kaufman M, Gaydos CA, Sriram S et al. Is Chlamydia pneumoniae found in spinal fluid samples from multiple sclerosis patients? Conflicting results Mult Scler 2002; 8: 289–294.

47. Kroll M. H. Infezione come causa di aterosclerosi. J. Clin. Lig. Assay. 2001, 24: 25-32

48. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. Circulation. 2002; 340: 1135-1143.

49. Ross R. Atherosclerosis as an inflammatory disease. New Engl J Med. 1999; 340: 115-126.

50. Hanson GK. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. N Engl J Med 2005; 352: 1685-95.

51. Blasi F, Cosentini R, Raccanelli R et al. A possible association of Chlamydia pneumoniae infection and acute myocardial infarction in patients younger than 65 years age. Chest 1997; 112: 9.

52. Saikku P, Leinonen M, Tenkanen L, Linnamaki E, Ekman MR, Makela PH. Serological evidence of an association of a novel Chlamydia TWAR with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. Lancet 1988; Oct 29; 2(8618): 983-6.

53. Patel P, Mendall MA, Carrington D, Strachan DP, Leatham E, Molineaux L. Association of *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* infections with coronary heart disease and cardiovascular risk factors. *BMJ* 1995; 311: 711-14.
54. Roivanen M, Viil-Kajander M, Palosuo T, Toivanen P, Leinonen M, Saikku P. Infection, inflammation and the risk of coronary heart disease. *Circulation* 2000; 101:252-57.
55. Sessa R, Di Pietro M, Schiavoni G, Santino L, BenedettiValentini E, Perna R et al. *Chlamydia pneumoniae* DNA in patients with symptomatic carotid atherosclerotic disease. *J Vasc Surg* 2003;37: 1027-31.
56. Gerdes VE, Verkooyen RP, Kwa VI et al. Chlamydial LPS antibodies, intima–media thickness and ischemic events in patient with established atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003; 167: 65-71.
57. Wiesli P, Czerwenka W, Meniconi A, Maly FE, Hoffman U, Vetter W, Schulthess G. Roxithromicin treatment prevents progression of peripheral arterial occlusive disease in *Chlamydia pneumoniae* seropositive men: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Circulation* 2002; 105(22): 2646-52.
58. Karyenbhuell PA, Wiesli P, Maly FE, Vetter W, Schulthess G. Progression of peripheral arterial occlusive disease is associated with *Chlamydia pneumoniae* seropositivity and can be inhibited by antibiotic treatment. *Atherosclerosis* 2005; 79(1): 103.10.
59. Vainas T, Stassen FR, Schurink GW, Tordoir JH, Welten RJ, van den Akker LH, Kurves HA, Bruggeman CA, Kitslaar PJ. Secondary prevention of atherosclerosis through *Chlamydia pneumoniae*

eradication (SPACE trial): a randomized clinical trial in patients with peripheral arterial disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005; 30(3): 334-60. Joensen JB, Juul S, Henneberg E, Thomsen G, Ostergaard L, Lindholt JS. Can long-term antibiotic treatment prevent progression of peripheral arterial occlusive diseases? A large, randomized, double blind, placebo-controlled trial. *Atherosclerosis* 2008; 196(2): 937-42.

61. 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.

62. Kuo CC, Coulson AS, Campbell LA, Cappuccio AL, Lawrence RD, Wang SP et al. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic plaques in the walls of the arteries of lower extremities from patients undergoing bypass operation for arterial obstruction. *J Vasc Surg* 1997; 26: 29-31.

63. Signorelli S, A. Stivala, L. Di Pino, M. Salmeri, G. Tempera, M.A. Toscano and G. Nicoletti. Chronic peripheral arteriopathy is associated with seropositivity to *Chlamydia pneumoniae*. *Journal of Chemotherapy* 2006 February, vol.18 (1): 103-06.

64. Mayr M, Kiechi S, Willer J, Wick G, Xa Q. Infection, immunity and atherosclerotic associations of the antibodies to *Chlamydia pneumoniae*, *Haelicobacter pilori* and cytomegalovirus with immune reactions to heat-shock-protein 60 and carotid or femoral atherosclerosis. *Circulation* 2000; 102: 833-9.

65. Kaperonis EA, Liapis CD, Kakisis JD, Dimitroulis D, Papavassiliou VG, Perrea D, Kostakis AG. Inflammation and

Chlamydia pneumoniae infection correlates with the severity of the peripheral arterial disease. *Eur J Vasc Endovasc* 2006; 31: 509-15.

66. Ustünsoy H, Sivrikoz C, Sirmatel F, Bakir K, Burma O, Kazaz H. Is *Chlamydia pneumoniae* a risk factor for peripheral atherosclerosis. *Asian Cardiovasc Thorac Ann.* 2007; 15(1): 9-13.

67. Grayston JT. Background and current knowledge of *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *J infect Dis* 2000; 181 (suppl.3): 5402-10.

68. Arcari CA, Gaydos CA, Nieto FJ, Krauss M, Nelson KA et al. Association between *Chlamydia pneumoniae* and acute myocardial infarction in young men in the United States military; the importance of timing of exposure measurements. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 1123-30.

69. Hu, H., G. N. Pierce, and G. Zhong. 1999. The atherogenic effects of chlamydia are dependent on serum cholesterol and specific to *Chlamydia pneumoniae*. *J. Clin. Investig.* 103:747–753.

70. Kim, D. N., J. Schmee, K. T. Lee, and W. A. Thomas. 1987. Atherosclerotic lesions in the coronary arteries of hyperlipidemic swine. I. Cell increases, divisions, losses and cells of origin in first 90 days of diet. *Atherosclerosis* 64:231–242.

71. Kuo, C. C., J. T. Grayston, L. A. Campbell, Y. A. Goo, R. W. Wissler, and E. P. Benditt. 1995. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) in coronary arteries of young adults (15–34 years old). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6911–6914.

72. Kuo, C. C., A. Shor, L. A. Campbell, H. Fukushi, D. L. Patton, and J. T. Grayston. 1993. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic lesions of coronary arteries. *J. Infect. Dis.* 167:841–849.
73. Ramirez, J., and the Chlamydia pneumoniae/Atherosclerosis Study Group. 1996. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from the coronary artery of a patient with coronary atherosclerosis. *Ann. Intern. Med.* 125:979–982.
74. Saikku, P., M. Leinonen, L. Tenkanen, E. Linnanmäki, M. R. Ekman, V. Manninen, M. Manttari, M. H. Frick, and J. K. Huttunen. 1992. Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *Ann. Intern. Med.* 116:273–278.
75. Laitinen, K., A. Laurila, L. Pyhälä, M. Leinonen, and P. Saikku. 1997. *Chlamydia pneumoniae* infection induces inflammatory changes in the aorta of rabbits. *Infect. Immun.* 65:4832–4835.
76. Leinonen, M., E. Linnanmäki, K. Mattila, M. S. Nieminen, V. Valtonen, M. Leirisalo-Repo, and P. Saikku. 1990. Circulating immune complexes containing chlamydial lipopolysaccharide in acute myocardial infarction. *Microb. Pathog.* 1:67–73.
77. Linnanmäki, E., M. Leinonen, K. Mattila, M. S. Nieminen, V. Valtonen, and P. Saikku. 1993. *Chlamydia pneumoniae*-specific circulating immune complexes in patients with chronic coronary heart disease. *Circulation* 4:1130–1134.
78. Lopez-Virella, M. F., and G. Virella. 1985. Immunological and microbiological factors in the pathogenesis of atherosclerosis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 37:377–386.