



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA

IMPLICACIÓN DE *Chlamydia pneumoniae* COMO POSIBLE AGENTE ETIOLÓGICO EN ATEROSCLEROSIS E INFARTO AL MIOCARDIO

TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION

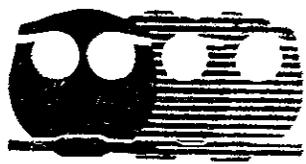
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A:

TANIA HUERTA FLORES

25867





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Prof. RAÚL GARZA VELASCO
Vocal	Profa. Ma. ELSA ESCUDERO
Secretario	Profa. ELDA B. PENICHE QUINTANA
1er. Suplente	Profa. ADRIANA GUADALUPE MEJÍA CHÁVEZ
2o. Suplente	Prof. LUCIANO HERNÁNDEZ GÓMEZ

Sitio donde se desarrolló el tema:

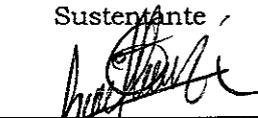
Diversas bibliotecas: Centro Médico Siglo XXI, Instituto Nacional de
Cardiología, Facultad de Química (U.N.A.M.)

Asesor del tema



QFB Elda B. Peniche Quintana

Sustentante



Tania Huerta Flores

A Rosalía...

*Por enseñarme a luchar y a mantener la frente
siempre en alto. Este libro, mamá, es por tí y para tí.
Gracias por ser mi guía y la luz de mi camino.*

Agradecimientos

A Dios.

Gracias por haberme sostenido en tus brazos todos estos años. Gracias por esa paz que tanto me ha ayudado. Sin tí no lo hubiera logrado. Permíteme seguir caminando junto a tí.

A Rosalía Flores.

Mamá... Gracias por ser mi amiga, mi confidente, mi juez, mi ayuda y apoyo constantes. Gracias por tanto amor y confianza. Este triunfo es de las dos. Lo logramos!!!

A Marianita Huerta.

Este logro también es para tí. Gracias por tu apoyo y tus consejos. Te quiero.

A Mario Huerta.

A tí papá, porque fuiste un motivo más para seguir adelante. Ojalá estuvieras aquí y me hubieras visto luchar. También tú estarías orgulloso de mí.

A Guillermo Fabre.

Por ser un pilar muy importante en nuestras vidas. Gracias por tu paciencia y tanta tolerancia. Te quiero.

A mi abuela Luisa.

Dios dice "todo aquel que pide, recibe". Le pedí tanto que llegara este momento, que ahora que finalmente estoy aquí, quiero compartir este momento contigo. Sé que tú ayudaste con tus oraciones. Gracias abuelita. Te quiero.

A mis tíos.

Gracias a todos ustedes por sus palabras de aliento y por patrocinar fragmentos de mi carrera. También por ustedes estoy aquí.

A Alicia.

Gracias por estar siempre ahí y engrandecer mi formación espiritual. Gracias por tanto apoyo, cariño y confianza.

A Norma y Lucy

Están locas!!. Gracias por enseñarme el valor de la amistad. Gracias por todo el apoyo, por llorar y reír conmigo.

A mi familia del Lab. 301 (Génetica).

¿¡Qué habría hecho sin ustedes!? Gracias por el apoyo y la confianza. Rosalinda, Laura, Ricardo, Charlie, Valeria, los quiero y los llevo en el corazón.

A la Q.F.B. Elda Peniche.

Gracias por la paciencia, tiempo, dedicación y consejos que me brindó durante la elaboración de este trabajo. Gracias por permitirme ser parte del episodio final de su estancia en la UNAM.

A mi jurado.

QFB Raúl Garza y QFB Elsa Escudero por dedicar un poco de su tiempo a la revisión del presente trabajo. Prof Raúl, gracias por esas charlas tan breves pero constructivas.

Al Dr. Cho-Chou Kuo.

Por haberme facilitado material suyo para la realización de este trabajo y que aún sin conocerme me brindó su apoyo. Thank you, Doctor.

A los "Jainos" gracias por sus consejos y por compartir sus locuras y tantas cosas buenas conmigo.

A todos mis profesores y compañeros de la Facultad de Química.

A la UNAM

Y muy especialmente a la Facultad de Química por facilitarme sus instalaciones, a ella le debo parte de lo que soy. Gracias Dios por darme la oportunidad de estudiar aquí

Gracias a toda la gente que creyó en mí y me ayudó a salir adelante. También a los que no creyeron en mí, porque su incredulidad fue un motivo más para luchar.

Indice

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	5
I. PRINCIPALES CARACTERISTICAS	
<i>DE Chlamydia pneumoniae</i>	6
Aspectos taxonómicos	6
Características microscópicas	8
Estructura y composición antigénica	9
Ciclo reproductivo	11
Reacción frente a agentes físicos y químicos	14
Aislamiento y propagación	18
Transporte y almacenamiento	18
II. <i>Chlamydia pneumoniae</i> Y ENFERMEDAD	
CARDIOCORONARIA	20
Aspectos anatomo-fisiológicos del corazón	20
Aterosclerosis e infarto al miocardio	27
Aterosclerosis	28
Factores de riesgo	31
Hiperlipidemia y dieta	32
Hipertensión	32

Consumo de cigarrillos	32
Diabetes	33
Otros factores	33
Patogenia de la aterosclerosis	34
Infarto al miocardio	38
<i>Chlamydia pneumoniae</i> y su relación con las enfermedades cardiovasculares	39
Comentarios finales	45
III Diagnóstico de laboratorio	46
Obtención de células clamidiales	50
Técnicas de biología molecular	51
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	51
Electroforesis en geles de poliacrilamida o agarosa	56
Western blot (Inmunotransferencia sobre membranas)	56
Fijación del complemento	57
Inmunofluorescencia	59
IV Tratamiento	61
Conclusiones	66
Bibliografía	68

Introducción

Los miembros del género *Chlamydia* son bacterias intracelulares obligadas. Tienen pared celular similar a la de las bacterias gram negativas, pero con la única diferencia de que las clamidias no tienen capa de peptidoglicanos entre las membranas externa e interna de su envoltura celular. Por el hecho de que se replican por fisión binaria, contienen ADN y ARN, ribosomas y sintetizan algunas proteínas, es por lo que ahora se consideran bacterias, ya que durante muchos años pertenecieron a la denominación de virus (2,15,20).

Las clamidias son de naturaleza ubícuota, inclusive, tienen hábitats acuáticos. Existen hasta la fecha, cuatro especies reconocidas: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae* y *Chlamydia pecorum*, a reserva de que próximamente se incluya un miembro más, que todavía sigue en estudio (20, 60).

Chlamydia trachomatis y *Chlamydia psittaci* fueron las dos primeras especies en integrar la familia. Las enfermedades humanas que generalmente causan estos microorganismos, incluyen el tracoma, conjuntivitis de inclusión, diversas enfermedades del tracto urogenital, tanto masculino como femenino, neumonía infantil, linfogranuloma venéreo. Se menciona también la psitacosis (*C. psittaci*) que afecta a aves y mamíferos. Los seres humanos pueden ser infectados ocasionalmente por clamidias que, por lo general, se asocian con enfermedades animales como la neumonitis felina (20, 90).

Por su parte, *Chlamydia pecorum* y *Chlamydia pneumoniae* son las más recientemente descubiertas y parece ser que la primera afecta a ganado bovino y ovino. En cuanto a la segunda, existen científicos que afirman que se transmite al estornudar o toser, causando variadas enfermedades en el tracto respiratorio humano como faringitis, bronquitis, neumonía e inclusive también sinusitis. Los estudios más recientes la asocian fuertemente con enfermedades coronarias (15,18,25).

La historia de *Chlamydia pneumoniae* es prácticamente reciente, su estudio ha tomado gran velocidad, debido a que las evidencias de su asociación con la aterosclerosis son enormes aunque con grandes dudas. Sin embargo, la bacteria en cuestión es la principal sospechosa, ya que muy frecuentemente se le encuentra en la “escena del crimen”.

Las personas que padecen enfermedades coronarias suelen presentar altos niveles de anticuerpos contra *Chlamydia pneumoniae*, lo que sugiere que han sufrido constantes o repetidas infecciones por esta bacteria. Varios estudios han estimado una prevalencia de anticuerpos contra *Chlamydia pneumoniae* del 40 al 50 % en los habitantes del hemisferio norte y de más del 60% en los países subdesarrollados(14,25).

La primera prueba clínica que despertó la sospecha de que *Chlamydia pneumoniae* era la causa de ataques al corazón, tuvo lugar en 1988 cuando el Dr. Saikku y su equipo de trabajo descubrieron que los enfermos del corazón presentaban un nivel de anticuerpos contra *Chlamydia pneumoniae* más alto de lo normal. A lo largo de los años noventa, se han ido acumulando evidencias que confirman lo anterior.

Grayston y cols. Emplearon la técnica de PCR para estudiar a la bacteria en muestras de ateroma tomadas de enfermos cardíacos. Poco tiempo después, investigadores del Reino Unido, Japón, Finlandia, Italia Y EEUU fueron detectando

la presencia de *Chlamydia pneumoniae* en arterias lesionadas. Desde entonces, en más de un experimento se ha encontrado también ADN de la clamidia en muestras de ateroma (9,10,15,16,19, 25,27,28,31,39,88,89).

Aún con tantos y tan variados datos, hay quienes todavía no creen que la bacteria tenga algo que ver con dicha etiología, así que los investigadores se han dividido en tres grupos, dependiendo del punto de vista que tienen con respecto al papel de *Chlamydia pneumoniae* . El primero de ellos sospecha que la bacteria potencia el proceso que afecta y obstruye las arterias, mejor conocido como aterosclerosis; el segundo grupo afirma que la bacteria es un “pasajero inocente” que no tiene nada que ver con las lesiones, únicamente se encuentra al azar en el lugar dañado; el tercero de ellos, ni siquiera asegura que la bacteria de verdad se localice en los vasos sanguíneos (14).

La aterosclerosis es el principal problema de salud pública de los países industrializados; en los que se encuentran en vías de desarrollo como México, es la primera causa de mortalidad, por lo que resulta urgente y necesario resolver pronto la incógnita. La incidencia de enfermedades coronarias es tan alta, que en caso de que la bacteria efectivamente esté involucrada, aunque sea sólo un poco, podría ser de mucha utilidad para evitar la muerte de muchas personas mediante la pronta administración de antibióticos (9, 25).

Sin embargo, a diez años de su primera aparición, desafortunadamente no se aclara del todo el papel de *Chlamydia pneumoniae* en las lesiones ateromatosas humanas, por el contrario, siguen apareciendo hallazgos que hacen aún más difícil conocer la verdadera relación que existe entre la bacteria y las afecciones mencionadas. Pero en general, una variedad de evidencias seroepidemiológicas, histopatológicas y microbiológicas parecen inculpar a *Chlamydia pneumoniae* como responsable de las enfermedades cardiovasculares citadas.

De este modo, en la presente revisión se tratará de investigar la más reciente posición de *Chlamydia pneumoniae* en aterosclerosis e infarto al miocardio, según el trabajo actual de los investigadores del tema. El tratar de responder la gran pregunta: ¿*Chlamydia pneumoniae*, agente causal o casual?

OBJETIVOS

- Describir las características microbiológicas de *Chlamydia pneumoniae*.
- Describir el papel patógeno de *Chlamydia pneumoniae* en vías respiratorias y su posible intervención como agente etiológico en infarto al miocardio y aterosclerosis.
- Dar a conocer las más recientes investigaciones acerca del posible papel de *Chlamydia pneumoniae* en afecciones cardiocoronarias.
- Mencionar de manera breve las distintas técnicas empleadas en la identificación de *Chlamydia pneumoniae*

I Características principales de *Chlamydia pneumoniae*

Aspectos taxonómicos

Los microorganismos clasificados actualmente en el género *Chlamydia* se describieron por primera vez en 1907, como consecuencia de una infección ocular que afecta al hombre, el tracoma. Mucho tiempo se creyó que el microorganismo causal del tracoma era un protozoo, pero entrada la década de los años veinte, se descubrió la psitacosis y se clasificó como virus. Hacia los años sesenta, los investigadores decidieron lo que hoy en día se acepta, las clamidias son parásitos intracelulares obligados que se multiplican por fisión binaria (20).

De acuerdo a la novena edición del Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey de 1994, las clamidias son microorganismos cocoides, inmóviles, que presentan multiplicación sólo dentro del citoplasma de la célula hospedadora y que presentan un ciclo de desarrollo complejo que caracteriza su crecimiento en las células afectadas (47).

Gracias a los resultados de técnicas de hibridación del ADN, se sabe que el contenido de G-C del genoma clamidial es de aproximadamente 41-44 % mol y su tamaño se encuentra dentro de los más pequeños (15,20,42)

Por lo que respecta a *Chlamydia pneumoniae*, ha sido bien caracterizada por enzimas de restricción y por técnicas de hibridación de ADN y se ha observado que existe al

menos un 94% de homología con otras especies de *Chlamydia pneumoniae*, pero que comparte menos del 10% con otras especies de clamidias. Pero en general, todas las especies de *Chlamydia* presentan plásmidos homólogos que pueden diferenciarse por análisis de Southern blot y por el uso de enzimas de restricción, lo cual pudiera ser de mucha utilidad en caso de presentarse brotes epidémicos (20,56,100).

Tabla 1. Principales especies de *Chlamydia*

Orden	Familia	Género	Especie
<i>Chlamydiales</i>	<i>Chlamydiaceae</i>	<i>Chlamydia</i>	<i>C. trachomatis</i> <i>C. psittaci</i> <i>Chlamydia pneumoniae</i> <i>C. pecorum</i>

Características microscópicas

Chlamydiaceae es una familia de parásitos bacterianos intracelulares obligados que presentan singular tropismo por las células epiteliales que recubren las membranas mucosas y se multiplican en vacuolas citoplásmicas. Son organismos pequeños, generalmente redondeados, que muestran variación morfológica en dos fases durante su complejo ciclo de vida, mediante la transformación de su forma infectante denominada cuerpo elemental (CE), a su forma reproductiva y metabólicamente activa, el cuerpo reticular (CR) (2,15,20,42).

El cuerpo elemental cuyas dimensiones fluctúan entre 0.2 y 0.4 μ es esférico, pequeño y denso. Es la forma infectante, responsable de la fijación a la célula blanco, a través de un ligando, promoviendo de esta manera su ingreso. El CR es la forma intracelular metabólicamente activa; se divide por fisión binaria; es la encargada de la reproducción y tiene entre 0.5 y 1.0 μ de diámetro (2,15,20,42,47,60).

Debido a su parasitismo intracelular mucho tiempo se pensó –como se mencionó anteriormente – que las clamidias eran virus, sin embargo, hoy se sabe que comparten algunas características con las bacterias; poseen una envoltura similar a la de las bacterias Gram negativas, con la diferencia de que las clamidias carecen de ácido murámico y no son sensibles a la lisozima; contienen ADN y ARN, poseen ribosomas, sintetizan proteínas, ácidos nucleicos y lípidos y su crecimiento puede ser inhibido por la acción de antimicrobianos como la tetraciclina y la eritromicina (20,42,106).

Sin embargo, a pesar de ser consideradas como bacterias Gram negativas, carecen de algunos mecanismos productores de ATP, motivo por el cual no pueden multiplicarse fuera de las células del hospedador y reciben el nombre de parásitos energéticos. Al no sintetizar su propia energía (adenosín difosfato) están obligadas a llevar una vida intracelular, obteniendo de su hospedador los nutrientes necesarios para la posterior síntesis de aminoácidos, ATP y las macromoléculas que requerirá durante su ciclo de vida (2,15,20).

Las clamidias carecen de flagelos, no son móviles ni tienen pili. No obstante, poseen unas proyecciones cilíndricas superficiales poco habituales, en promedio 18 de ellas, ordenadas en forma hexagonal. Las proyecciones se fijan a la membrana citoplásmica y salen por orificios en la envoltura. Aunque se desconoce su función, aparentemente no median la adherencia a la célula hospedadora. Hay evidencias que sugieren que estas proyecciones de las clamidias en desarrollo les sirven para la captación de nutrientes del citoplasma de la célula hospedadora hacia ellas (20,47,106).

Estructura y composición antigénica

La pared celular de las clamidias tiene un contenido relativamente alto de lípidos. Es muy similar al de las bacterias Gram negativas, pero carece de un peptidoglicano, el ácido N-acetilmurámico. Presenta además un lipopolisacárido (LPS) termoestable que comparten todas las especies del género. Lleva también unido el ácido 2-ceto-3-desooctanóicosimilar al que se ha observado en el género *Salmonella*. Este antígeno puede detectarse mediante la prueba de fijación del complemento, por

electroforesis en gel de poliacrilamida y por el uso de anticuerpos monoclonales (34,60,79,106).

Mediante técnicas de fraccionamiento celular, se han podido revelar como los principales componentes de la membrana externa, una serie de proteínas denominadas COMC, por sus iniciales en inglés, *Chlamydial* outer membrane complex. Son proteínas de peso molecular de 12 y 60 kDa que muestran un alto contenido en cisteína. Recientemente se demostró que la proteína de 60 kDa tiene una secuencia similar a la de la proteína de 60 kDa de *E. coli* (Gro EL) lo cual induce una reacción de hipersensibilidad retardada en cuyos, caracterizada por un infiltrado celular de linfocitos y macrófagos. Otra proteína muy importante que también forma parte de este complejo, es la proteína 40kDa, conocida como proteína mayor de membrana, MOMP (major outer membrane protein). Esta constituye el 60% de las proteínas de la membrana externa de las clamidias. Existe la posibilidad de que esté involucrada con la patogenicidad del microorganismo, ya que al parecer, reduce la repulsión electrostática que se genera entre el microorganismo y la célula hospedadora (2,5,15,20,32,34,60).

Aunque todas las especies del género presentan este complejo de proteínas, se han detectado variaciones antigénicas entre especies, e incluso entre cepas de la misma especie (5,40).

Se ha sugerido la presencia de otras proteínas de menor importancia como la de 155, 45, 29, 28 y 18 kDa, las últimas detectadas por Western blot, pero aún faltan muchos estudios para determinar su descripción y caracterización (34).

Dada la dificultad del aislamiento de las clamidias, no se tiene aún suficiente información acerca de su estructura antigénica, sin embargo, recientemente se encontró otra proteína más, la de 27 kDa. Después del análisis de su secuencia se

observó una gran similitud con la proteína MIP (macrófago potenciador de la infectividad), localizada en la superficie de la bacteria *Legionella pneumophila*. Se sabe que esta proteína es un importante factor de virulencia para *Legionella pneumophila* y que durante la infección tiene la capacidad de inhibir la fusión lisosomal (34).

Ciclo reproductivo

El ciclo reproductivo de la clamidia, ilustrado en la figura 1., incluye las dos formas del microorganismo, la madura, infecciosa y estable, denominada cuerpo elemental (CE). La otra, como se mencionó, es un poco más grande y frágil; se le denomina cuerpo reticular (CR) (1,2,16,20,42,47,90,106).

El CE es la forma infectante del microorganismo; responsable de la fijación a la célula blanco y de promover su ingreso. La rigidez de la pared celular permite la supervivencia del CE durante su vida extracelular. Se considera que esta rigidez se debe a los puentes disulfuro que existen entre las principales proteínas de la membrana externa. Su ADN está organizado de forma compacta en un nucleoide central que consiste de una molécula circular con un peso molecular de 660kDa, lo que significa que con este tamaño de ADN se puede proporcionar la información para codificar alrededor de 600 proteínas diferentes. El CE también posee ARN ribosómico (1,20,47,89).

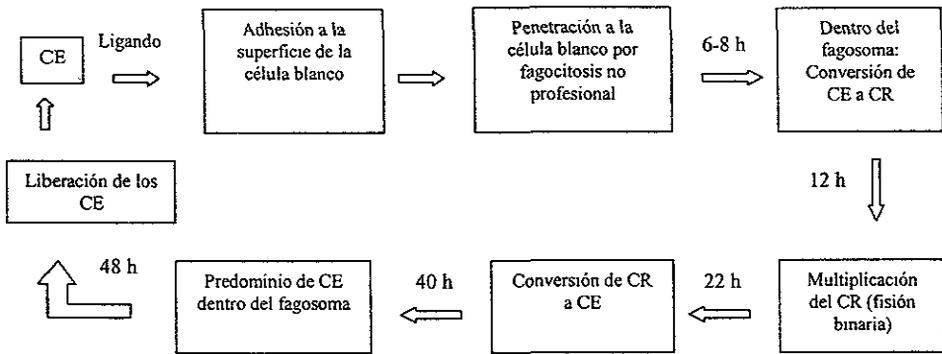
Por otra parte, el CR, es la forma infectante intracelular, metabólicamente activa que lleva a cabo un tipo de reproducción por fisión binaria. Es más grande que el CE. Los CR sintetizan su propio ADN, ARN y proteínas, pero algunas de sus

capacidades metabólicas se ven limitadas. El ATP que adquieren de la célula infectada sirve para el crecimiento del CR. Además, es importante mencionar que no sobreviven fuera de las células y pierden de inmediato, fuera de éstas, su infectividad (23,42,90).

Las clamidias, llevan a cabo un ciclo reproductivo muy complejo, raramente visto en las bacterias. El ciclo único de crecimiento consiste en unos cuantos eventos:

1. Adhesión a la superficie de la célula hospedadora.
2. Penetración del CE por fagocitosis no profesional.
3. Transformación del CE, metabólicamente inerte, en el CR metabólicamente activo y de mayor tamaño.
4. Desarrollo y división del CR. Multiplicación por fisión binaria, con la subsecuente producción de una abundante progenie.
5. Maduración de los CR a CE infecciosos.
6. Conversión de los CR en CE.
7. Predominio de los CE dentro del fagosoma.
8. Liberación de los CE mediante la destrucción de la célula.

Figura 1. Eventos del ciclo de crecimiento de *Chlamydia pneumoniae*



El paso inicial del proceso infeccioso, comienza con la fijación del cuerpo elemental a las microvellosidades de una célula epitelial susceptible. Dado que estas células epiteliales no son fagocitos profesionales, las clamidias tienen sus propias técnicas para inducir su fagocitosis, proceso que se ha denominado endocitosis dirigida por el parásito o fagocitosis no profesional. De esta manera, el CE de la clamidia es captado hacia los fagosomas, que son vacuolas de la célula infectada unidas a la membrana de ésta, pero estas vacuolas (fagosomas) no se unirán a los lisosomas. Las clamidias viables, tienen la capacidad de inhibir la fusión lisosomal y esta inhibición está dirigida por antígenos de la superficie de las clamidias. A las 6 u 8

horas siguientes, una vez dentro de los fagosomas, forman colonias microscópicas conocidas como inclusiones intracitoplásmicas o cuerpos de inclusión, que pueden ocupar más de la mitad del volumen celular. Es entonces que los cuerpos elementales experimentan alteraciones en su pared celular que finalmente culminan en la transformación de la forma de CR. Posteriormente se inicia la síntesis de ADN, ARN y proteínas, lo que permite el crecimiento del CR y su posterior división por fisión binaria. Se ha observado que en algún momento del crecimiento, las mitocondrias de la célula hospedadora migran hacia el endosoma aumentando de tamaño, se ubican junto a él y es cuando el CR parasita ATP. Estos cuerpos de inclusión, pueden contener entre 100 y 500 partículas de progenie (entre las 24 y 48 hrs.), según la especie, con capacidad de infectar a otras células susceptibles cuando se rompa la que las contiene. Se cree que cuando los nutrientes se han agotado, los CR maduran a CE y éstos son liberados de la célula hospedadora (48 – 72 hrs.) (16,69,90,42,106).

Reacción frente a agentes físicos y químicos

Las clamidias son muy sensibles a las condiciones ambientales y sólo sobreviven muy poco tiempo fuera del cuerpo. Son susceptibles a una gran gama de antimicrobianos como las penicilinas y las cefalosporinas, que actúan a nivel de síntesis de pared celular; a las tetraciclinas y eritromicina que han proporcionado una efectividad clínica excelente y que son eficaces inhibidores de síntesis proteica. Se inactivan rápidamente con el calor; dejan de ser infecciosas completamente después de la exposición, durante 10 min. A una temperatura de 60°C (16, 42).

Sin embargo, son infecciosas por años a una temperatura de -50 a -70°C . Durante el proceso de liofilización, pierden mucha de su infecciosidad y por el contrario, desecadas al aire, pueden ser infecciosas por largos periodos. Se inactivan rápidamente con éter (30 min.), con fenol (al 0.5% por 24 hrs.) y con formol (16, 42, 106).

Aislamiento y propagación

Debido a la peculiar naturaleza de *Chlamydia*, su aislamiento y propagación se han logrado mediante la incubación en huevos embrionados, animales de experimentación o con líneas celulares muy seleccionadas. Hasta la fecha se ha visto que todas las especies de *Chlamydia* pueden infectar al embrión de pollo. En saco vitelino, también se han logrado buenos resultados, debido a que en 6 u 8 días se pueden encontrar anticuerpos. Sin embargo, estos procedimientos no son los más convenientes, debido a que su uso no resulta práctico en los laboratorios clínicos; además de ser tediosos, prolongados y menos sensibles que otros métodos como el cultivo de tejidos (20,23,81).

Todavía se considera que el cultivo celular es el método más sensible y específico para el aislamiento y la identificación de las clamidias. Las líneas celulares que normalmente se utilizan para su aislamiento y cultivo son las McCoy (de

fibroblastos de ratón), He-La 229 (células cancerosas de cérvix humano), BHK 21 (línea celular de riñón de crías de hámster), células L-929 y células de riñón de mono verde Buffalo (13,16,42,86,106).

En el método de cultivo estándar empleado para *Chlamydia*, las muestras clínicas se centrifugan y el sedimento se inocula sobre las monocapas celulares. Estas monocapas se hacen crecer sobre cubreobjetos de vidrio colocados dentro de viales herméticos. En general se pretratan con 5-yodo-2-desoxiuridina o con cicloheximida a fin de inhibir la síntesis de macromoléculas de la célula hospedadora y aumentar la replicación de las clamidias. También ayuda a facilitar el reconocimiento de las inclusiones (42,47,106).

El pretratamiento de las células con dietilaminoetil-dextrano (DEAE-dextrano), aumenta el contacto entre las partículas infecciosas de las clamidias y la monocapa de las células hospedadoras, con el subsecuente aumento de la infectividad. Después de la incubación de los cultivos durante 48 – 72 hrs, se observarán los cuerpos de inclusión de las clamidias. Las tinciones empleadas para ayudar a detectar estas inclusiones son Giemsa y yodo. Algunas veces también se ocupan los anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína (20,42,47,86, 106).

Respecto a *Chlamydia pneumoniae*, el cultivo celular probablemente sea el mejor método de cultivo para obtener posteriormente un buen diagnóstico. Los investigadores Kuo y Grayston reportan que para el aislamiento inicial de *C pneumoniae* es mejor utilizar la línea celular He-La 229 y no el McCoy. Cless y Stamm encontraron que las células HL, una línea celular derivada del pulmón humano eran mejores. En otro estudio, Kuo y Grayston confirman lo anterior empleando las cepas TW – 183, AR – 39 y AR – 388 (48, 86).

Recientemente se utilizaron las células Hep – 2, ya que la muestra no requiere del pretratamiento con DEAE – dextrano, el cual por el contrario, sí se usa en este tipo

de línea celular, propicia un efecto adverso puesto que los cuerpos de inclusión se verán más pequeños haciendo más difícil su identificación (86).

En un estudio reciente, Roblin y cols., sugieren que la línea Hep – 2 es la más sensible de las líneas celulares utilizadas para el cultivo, aislamiento y propagación de *Chlamydia pneumoniae*, tanto para cepas provenientes de muestras clínicas, como para las de investigación. Además, afirman que el cultivo celular Hep – 2 resulta de muy fácil acceso (86).

Otra línea celular es la HTED, proveniente de tráquea humana, que ha demostrado ser sensible para la propagación de muchos virus de vías respiratorias, así que se creyó pudiera ser útil para el cultivo de *Chlamydia pneumoniae*. Sin embargo, en términos de sensibilidad, muestra los mismos resultados que las células McCoy (86,106).

A pesar de todos los estudios anteriores, aún falta mucho por descubrir acerca de los medios de cultivo óptimos para *Chlamydia pneumoniae*. Se tienen pocas herramientas que limitan el trabajo del investigador. Por lo tanto, la línea de rutina actual sigue siendo

la Hep – 2, ya que al parecer tiene la posibilidad de ser más útil para el cultivo de *Chlamydia pneumoniae*. Lo que es definitivamente cierto, es que un medio de cultivo eficiente facilitará el diagnóstico y ayudará a engrandecer las investigaciones futuras.

Transporte y almacenamiento

Es bien sabido que para la obtención de muestras clínicas viables, se requiere de las mejores condiciones dentro del contenedor, tales que nos permitan conservar la máxima viabilidad del patógeno. Sin embargo, la preservación de la infectividad de *Chlamydia pneumoniae* ha sido difícil, ya que su recuperación, en la mayoría de los casos, ha resultado con una pérdida considerable de la misma. En un estudio realizado por Maas y Dalhoff, se estudiaron medios de transporte, variando cantidades y composición de medios de cultivo, así como condiciones de temperatura, humedad relativa y tiempos de almacenamiento (58).

Los medios de cultivo utilizados fueron cinco de los más comunes. 1) el medio de glutamina-fosfato-sacarosa (SPG) con un contenido del 75g de sacarosa, 0.52g de H_2PO_4 , 1.22g de Na_2HPO_4 , 0.72 g de ácido glutámico y agua destilada a pH=7.4. 2) Medio SPG con 10% de suero fetal bovino de ternera (FCS). 3) EMEM, medio mínimo esencial de Eagle. 4) EMEM con 10 % de FCS. 5) EMEM con 20% de FCS. Se observó que las mejores condiciones para el almacenamiento de *Chlamydia pneumoniae* fueron bajo refrigeración a 4°C y en el medio de transporte de Eagle adicionado con

suero fetal bovino. El medio SPG también puede utilizarse para las clamidias, así como el EMEM que resultó igualmente efectivo para mantener su viabilidad (58).

Es de hacerse notar, el hecho de que se ha visto que las condiciones mencionadas anteriormente deben modificarse un poco, ya que hay reportes que citan que pueden haber ligeras variaciones de acuerdo a la cepa de *Chlamydia pneumoniae* de que se trate. Así, por ejemplo, la cepa AR-39 en medio SPG presenta un 39% de viabilidad después de 24 hrs a una temperatura de 22°C y una viabilidad de 1% después de un día de almacenamiento. Se demostró también que la cepa TW-183 es demasiado susceptible a los factores tiempo, humedad y temperatura no adecuados y disminuye rápidamente su viabilidad (58).

En general, se reporta que se puede tener una buena recuperación de *C. pneumoniae* después de aproximadamente 4 hrs de almacenamiento a temperatura ambiente sin tener una pérdida considerable de su infectividad. Además, la refrigeración a 4°C, permite un periodo de transporte aceptable de al menos 24 hrs (58).

II. *Chlamydia pneumoniae* y enfermedad cardiocoronaria

Aspectos anatómo-fisiológicos del corazón

El corazón es un órgano hueco que posee una forma cónica, con la base en la parte alta y la punta o ápex dirigida hacia abajo y a la izquierda. Pesa de 220 a 350 gramos y es más grande en el hombre que en la mujer. Está situado casi en el centro del pecho, en la parte media de la cavidad torácica, entre los pulmones y encima del diafragma (17).

Lo forman cuatro cavidades: dos superiores, las aurículas derecha e izquierda y dos inferiores, los ventrículos derecho e izquierdo. La aurícula derecha forma el borde derecho vertical y una pequeña parte de la base; la aurícula izquierda forma casi toda la base; el ventrículo izquierdo forma la mayor parte de las caras inferior e izquierda y toda la punta del corazón; el ventrículo derecho ocupa la mayor parte de la porción anterior del corazón. Cada aurícula comunica con el ventrículo correspondiente, pero en el corazón normal, las aurículas y los ventrículos no comunican entre sí. Estas cavidades están revestidas interiormente de una membrana serosa llamada endocardio. Las paredes del corazón son de un tejido muscular diferenciado, el músculo cardíaco o miocardio. El corazón está envuelto o contenido en un saco seroso formado por dos membranas, una de las cuales se adhiere al miocardio, el saco pericárdico(17,18).

El miocardio es una masa muscular constituida por músculo estriado y forma parte principal del corazón. Es susceptible a hipertrofiarse cuando las demandas de trabajo del corazón aumentan. La inflamación de éste se denomina miocarditis. La

obstrucción de la circulación coronaria al miocardio, puede provocar un infarto al miocardio. Contiene una serie de redes de fibras cilíndricas que se ramifican y son estriadas pero no son voluntarias(17,18).

El endocardio es la cubierta interior de las cavidades cardíacas que se continúa en el endotelio de los grandes vasos. Está constituido por un epitelio plano no estratificado ni queratinizado y por una sustancia intercelular de sostén.

Durante la vida fetal, existe una intercomunicación entre las cavidades cardíacas que se cierra al nacer, pero en ciertos casos puede persistir, ocasionando diversos tipos de enfermedades congénitas del corazón que afectan profundamente la vida del niño.

Los ventrículos poseen orificios que comunican con las arterias de salida de la sangre; las aurículas los tienen para recibir la sangre que viene por las venas. En los orificios ventrículo-auriculares, existen válvulas destinadas a impedir el retroceso de la sangre a la aurícula cuando el ventrículo se contrae; se conoce como válvula tricúspide a la derecha y mitral a la del lado izquierdo. En los orificios arteriales, aórtico y pulmonar, se localizan unas válvulas en forma de nido(válvulas sigmoides) para evitar el reflujo de sangre a la cavidad.

La unidad contráctil del corazón es la miofibrilla y se encuentra en el miocardio. Cada fibra miocárdica estriada está surcada por numerosas miofibrillas que forman los sarcómeros, estructuras que se repiten en serie; es aquí, en los sarcómeros donde se genera la energía necesaria para el impulso de la sangre.

En realidad, en el corazón existen dos bombas de cada lado. La derecha recibe sangre impura del cuerpo y la envía al pulmón. La izquierda recibe del pulmón sangre oxigenada y la envía al resto del cuerpo. Las paredes de las aurículas son más

delgadas que las de los ventrículos y a su vez, la pared del ventrículo izquierdo es más gruesa y fuerte que la del izquierdo, debido a que realiza un trabajo mayor.

Aunque el corazón late constantemente y, en apariencia sin descanso, no es así. Del tiempo que tarda cada contracción o latido, el corazón trabaja un tercio y descansa dos. Su labor es de ocho horas diarias, aunque el descanso no lo toma de una sola vez, sino en el intervalo entre las contracciones. Así, todas las situaciones que tiendan a reducir esta situación de descanso del corazón en forma continua lo perjudica, inclusive la aceleración del ritmo cardíaco conocida como taquicardia. Ésta puede ser transitoria provocada por el ejercicio, una emoción fuerte o la fiebre, o permanente ya sea en lesiones propias del corazón como las enfermedades crónicas del miocardio o en ciertos trastornos del ritmo (arritmias). Por eso es que el reposo es tan importante durante las enfermedades o en la convalecencia.

El corazón puede ser afectado, junto con otros órganos, por una mala alimentación. La desnutrición por falta de alimentos, o por ingestión de alimentos inapropiados, repercute seriamente en el funcionamiento circulatorio.

Ciertas infecciones atacan al corazón, ya sea por la acción directa de bacterias y/o por la acción de sus toxinas. Las primeras pueden unirse a los tejidos, creando focos de infección agudos o crónicos; las segundas impregnan al miocardio o actúan sobre los nervios reguladores de la contractilidad y de la conductibilidad intracardíaca, originando graves consecuencias.

Según el microorganismo y su tropismo, pueden atacar el miocardio (miocarditis), el pericardio (pericarditis), o el endocardio (endocarditis) y aún todos los tejidos (pancarditis). Si el enfermo sobrevive a la infección aguda, suelen quedar lesiones crónicas, especialmente endocarditis valvulares que determinan una estrechez o una

insuficiencia en los orificios y repercuten terriblemente sobre las futuras capacidades de actividad y de trabajo del individuo.

Entre las infecciones crónicas que pueden lesionar al corazón se incluyen la sífilis y la tuberculosis, la primera tiene preferencia por el miocardio y las arterias, la segunda por el miocardio y por el pericardio.

El miocardio puede ser afectado en el curso de los años simplemente por la senilidad o por la aterosclerosis, que es un proceso bastante común y normal después de cierta edad. Puede ser lesionado por el endurecimiento de las arterias, por intoxicaciones crónicas como el saturnismo o intoxicación por el plomo y otras sustancias químicas. Aunque son cada vez más raras, a medida que la medicina preventiva en las industrias emplea mejores sistemas de seguridad para sus empleados. Hoy en día se habla del estrés y de la dureza de vida, que son factores que también afectan a la larga al corazón y aunque esto es un poco difícil de probar, es tan lógico que se acepta.

Si bien es importante proteger al corazón, es igualmente importante no vivir temiendo que falle. El corazón es duro y resistente y con un poco que se le ayude, nos brindará un excelente servicio y por ende, nos dará una larga vida. Pero si nosotros cuidamos en general todo el organismo, entonces el corazón se cuidará a sí mismo.

El riego sanguíneo del corazón está a cargo de las arterias coronarias que son dos: la izquierda, que irriga al ventrículo izquierdo y a la mitad anterior del *septum* ventricular y se divide en descendente anterior y circunfleja. La otra, la derecha irriga al ventrículo derecho y a la porción posterior del tabique interventricular.

Contribuye a irrigar la cara del ventrículo izquierdo del corazón y varias ramas que irrigan la pared aórtica y la aurícula izquierda.

Dicho de otro modo, las paredes del corazón tienen sus propias arterias, que le llevan al músculo sus elementos nutritivos, las arterias coronarias cuya obstrucción total o parcial es causa de muerte o de grave enfermedad cardíaca.

En general, las arterias están situadas profundamente entre los tejidos blandos, a excepción de la muñeca, el dorso del pie, las sienes y el cuello, en donde se les puede sentir latir y donde se puede tomar el pulso.

Como se mencionó anteriormente, las arterias se encargan del riego sanguíneo, así que puede decirse que son pequeños tubos por donde pasa la sangre. Se dividen en tres categorías según su tamaño y ciertas características histológicas:

- * Arterias de grueso calibre o elásticas, entre las que se incluye a aorta.
- * Arterias de mediano calibre o musculares, llamadas arterias distribuidoras.
- * Arterias de pequeño calibre, por lo regular con diámetro menor de 2mm; se conocen como arteriolas y se encuentran, en su mayoría, dentro de los tejidos y órganos.

Todas las arterias se caracterizan por tener tres capas o tunicas: íntima, media y adventicia que se distinguen claramente en los vasos de mayor calibre. Conforme disminuye el calibre vascular, las tres capas se tornan cada vez menos precisas, y por último, en las arteriolas dejan de ser identificables.

Las arterias elásticas de grueso calibre, incluyen la aorta y sus ramas principales; tronco braquiocefálico, subclavia, comienzo de la carótida primitiva y origen de las

arterias pulmonares. La túnica íntima de estos vasos, consiste en una capa lisa de células endoteliales delgadas dispuestas sobre una membrana delicada que se introduce entre el tejido conectivo y el tejido subendotelial y las células del músculo liso subadyacente. Durante toda la vida, la túnica íntima se engruesa por acumulación progresiva de una sustancia de mucopolisacáridos que se va cementando. Así que, de forma poco clara, aparecen en esta capa cementada las células mioíntimas que contribuyen al engrosamiento (por síntesis de colágeno y fibrillas elásticas). Como se revisará más adelante, estas células mioíntimas al parecer son importantes componentes de las lesiones que se presentan en la aterosclerosis.

Por otra parte, la túnica media o capa muscular de las arterias de grueso calibre, es rica en tejido elástico, de ahí el nombre de arterias elásticas. La capa media está formada principalmente por células musculares lisas, circulares o espirales, dispuestas en capas concéntricas.

La túnica adventicia es una capa poco definida de tejido conectivo de envoltura, en la cual se encuentran fibras elásticas y nerviosas y vasos nutricios de pequeño calibre en una pared delgada llamada *vasa vasorum*. La adventicia se parece a la de los grandes vasos, pero contiene mayor abundancia de nervios, reflejando el papel que desempeñan estos vasos en la regulación autonómica del riego sanguíneo.

En las arterias musculares de mediano calibre, las tres capas están bien definidas y proceden de las capas de las arterias elásticas mayores. El límite más externo de la íntima está muy bien definido por una membrana elástica interna, compacta y ondulada. La lámina elástica interna no es una estructura continua, sino que está interrumpida por hendiduras a través de las cuales, células musculares lisas de la media pueden emigrar penetrando la íntima.

En las pequeñas arterias hay desaparición progresiva, primero de la membrana exterior y luego de la interna, de modo que a nivel prearteriolar la diferencia entre las capas prácticamente ha desaparecido. Las arteriolas poseen abundantes conexiones nerviosas del sistema neurovegetativo y son el sitio fundamental de la regulación autónoma del flujo sanguíneo.

Aparte de las arterias, es muy importante describir al endotelio vascular y al músculo liso, que son los principales componentes de la pared vascular y desempeñan papeles muy importantes en todos los tipos de patología vascular.

La capa única del endotelio continuo que reviste arterias y venas forma una capa tromborresistente única entre sangre y tejidos subendoteliales potencialmente trombógenos. La integridad del endotelio es un requerimiento fundamental para conservar la estructura y función normales de la pared vascular. Además de inducir fenómenos trombóticos evidentes la lesión endotelial puede ser causa de, al menos en parte, la iniciación de la aterosclerosis y otras lesiones vasculares como la hipertensión.

El endotelio arterial se parece a otros endotelios continuos por su contenido en organelos y sus abundantes vesículas pinocíticas. De esta forma, el endotelio arterial transporta cantidades relativamente pequeñas de proteínas, como lipoproteínas de baja densidad (LDL), a través de estas vesículas.

Aterosclerosis e infarto al miocardio

Aspectos generales

El término aterosclerosis significa literalmente endurecimiento de las arterias, pero más exactamente, define a un grupo de estados patológicos que tienen en común, el engrosamiento y la pérdida de elasticidad de la pared arterial. Incluye tres variantes morfológicas características:

- **Aterosclerosis**, caracterizada por la formación de ateromas (depósitos de lípidos en la íntima) en las arterias musculoesqueléticas de mediano y grande calibre.
- **Esclerosis calcificada de la media** o de Mönckenberg, caracterizada por calcificación de la media de las arterias musculares.
- **Arteriosclerosis**, caracterizada por engrosamiento proliferativo de las paredes de arterias de pequeño calibre y arteriolas.

Estas tres formas se diferencian con facilidad por su aspecto morfológico. Debido a que la aterosclerosis es la forma más común e importante de arteriosclerosis, en muchas ocasiones estos dos términos se usan como sinónimos, sin embargo no debieran considerarse así.

Tomando en cuenta los objetivos del presente trabajo se estudiará únicamente la aterosclerosis.

La aterosclerosis ocupa definitivamente el primer lugar entre las enfermedades de Occidente, aunque es de distribución mundial. Si bien cualquier arteria puede verse afectada, principalmente lo hacen la aorta y el sistema coronario y cerebral, de forma que las dos consecuencias principales de esta enfermedad son el infarto al miocardio y el infarto cerebral. Así, los infartos miocárdicos (IM) son responsables del 20 al 25% de la mortalidad debida a problemas cardíacos en Estados Unidos y atribuibles casi totalmente a aterosclerosis.

Aterosclerosis

La aterosclerosis puede definirse, como se mencionó anteriormente, como una enfermedad de arterias musculares de grande y mediano calibre (coronarias, carótidas y arterias de extremidades inferiores) y de arterias elásticas de gran calibre como la aorta y arterias ilíacas. La lesión básica es el ateroma. Consiste en una placa focal elevada, localizada dentro de la íntima, compuesta por un núcleo de lípidos, principalmente colesterol, que habitualmente forma complejos de proteínas y una cubierta de revestimiento fibroso. En etapas iniciales, estos ateromas tienen una distribución escasa, pero conforme avanza la enfermedad se vuelven más y más numerosos, pudiendo llegar a cubrir, literalmente, toda la superficie de la íntima de las arterias que se ven gravemente afectadas. Los ateromas comprometen el flujo de sangre arterial y debilitan las arterias afectadas originando aneurismas. A la larga, muchos pacientes experimentan diversas complicaciones entre las cuales se encuentran calcificación, ulceración y formación de trombos. Inclusive, durante la evolución de esta enfermedad vascular, es posible que no se produzcan síntomas durante veinte, cuarenta o más años y, a menos que las lesiones desencadenen

manifestaciones clínicas secundarias en órganos dañados, pueden permanecer totalmente ignorados hasta la muerte. Sin embargo, cuando no se observan este tipo de lesiones orgánicas, la aterosclerosis se puede identificar mediante angiografía o por visualización radiológica de los depósitos de calcio en ateromas muy desarrollados.

El origen de los ateromas no ha sido definido del todo, pero se han planteado algunas teorías que lo tratan de explicar. Tres son las más importantes: la teoría lipogénica, la teoría trombogénica y la teoría monoclonal. La teoría lipogénica ha sugerido que las lipoproteínas de baja densidad (LDL), básicamente el colesterol, reaccionan con receptores específicos provocando la proliferación de células cargadas con lípidos así como de la proliferación de una matriz extracelular. La lesión progresa debido al ingreso constante de lípidos del torrente sanguíneo. Se cree que son importantes para la evolución de este proceso, las alteraciones metabólicas existentes en las células de la pared arterial que interactúan con los lípidos del torrente sanguíneo.

La segunda teoría es la trombogénica, en la que no se conoce con certeza cómo se ha llevado a cabo la iniciación de la placa aterosclerótica, pero se ha aceptado que es un trombo que se adhiere sobre una placa preexistente lo que origina el mecanismo de evolución del ateroma.

La tercera hipótesis –la más recientemente propuesta– es la monoclonal. Esta teoría propone que las placas ateroscleróticas se desarrollan a partir de una única célula precursora que prolifera en forma neoplásica. El origen unicelular de una placa, sugiere que la intervención de algún agente inductor de la transformación como un

virus, un agente químico o un mecanismo físico, o bien la presencia de algún defecto genético preexistente, sean responsables de la aparición del ateroma.

Sin embargo, aunque estas teorías difieren entre sí, no se excluyen una a la otra; lo que se ha establecido y demostrado es el hecho de que son lípidos los que desempeñan el papel importante que podría explicar las lesiones de la íntima, que traen como consecuencia la trombosis y la proliferación de la placa. Inclusive los diversos factores de riesgo que intervienen para la aparición de aterosclerosis, incluyendo la elevación de lípidos séricos, la hipertensión, el consumo de cigarrillos y la diabetes, pueden ser cofactores que alteran las células de la íntima, modificando el metabolismo lipídico, los fenómenos trombogénicos o ambos.

Dentro del mismo proceso aterosclerótico pueden describirse dos lesiones bien aceptadas, la placa ateromatosa, que es la lesión más importante y causa principal de estrechamiento arterial en el adulto; y la estría grasa, la cual se observa en todos los niños incluso en el primer año de vida y es importante porque se cree que es un posible precursor de la placa ateromatosa. Se ha comprobado que las estrías grasas son de producción y distribución universales y casi todas, especialmente las de la aorta, desaparecen o persisten inofensivamente. En ciertos lugares, por ejemplo en arterias coronarias y especialmente en el paciente predispuesto, puede suponerse que evolucionen hasta llegar a la formación de placas fibrosas, pero este último hecho no está plenamente comprobado.

Factores de riesgo

Los estudios epidemiológicos indican que ciertos factores genéticos o adquiridos aumentan el riesgo de aterosclerosis. Algunos de estos como edad, sexo, y predisposición familiar son inalienables del hombre, pero otros más son totalmente evitables.

La edad es un factor muy importante a considerar en el desarrollo de la aterosclerosis. Las incidencias de mortalidad debidas a aterosclerosis sintomática aumentan con la edad hacia los ochenta y cinco años. Un hecho interesante, a pesar de que la aterosclerosis es una enfermedad del envejecimiento, parece ser que las estrías grasas también contribuyen un poco a su desarrollo. Ya se hizo mención de que estos depósitos de grasa se encuentran en las aorta de todos los niños al cumplir su primer año y comienzan a aparecer en las coronarias a los diez años, pero no se consideran los principales responsables del desarrollo de la enfermedad.

En cuanto al sexo, hay notables diferencias en la frecuencia y gravedad de la aterosclerosis. Los datos de incidencia de mortalidad son, por mucho, mayores en varones hasta la edad de setenta y cinco a ochenta y cinco años, cuando se igualan las incidencias. Por ejemplo, el infarto al miocardio es raro en mujeres premenopáusicas; se sabe que entre los treinta y cinco a cincuenta y cinco años, la mortalidad en varones blancos es más de cinco veces superior que las de mujeres blancas. Claro que esta incidencia o frecuencia puede variar, ya que aumenta en

mujeres con antecedentes de gran consumo de tabaco, uso prolongado de anticonceptivos orales o diabetes.

De los diversos factores de riesgo hay cuatro que se consideran de primera importancia: 1) Hiperlipidemia, 2) Hipertensión, 3) Consumo de cigarrillos y 4) Diabetes. Los dos primeros son los responsables principales.

Hiperlipidemia y dieta

Está plenamente comprobado que la hiperlipidemia se acompaña de una incidencia aumentada de cardiopatía isquémica prematura. Aunque se ha levantado mucha polémica acerca de este tema, la mayor parte de los autores están de acuerdo en que el nivel de colesterol plasmático, depende en gran parte del ingreso de calorías totales en forma de colesterol y grasas, es decir, por malos hábitos alimenticios.

Hipertensión

Cuanto mayor es la presión arterial, mayor el peligro de aterogénesis. Después de los cuarenta y cinco años, las escalas indican que la hipertensión es un factor de riesgo mayor que la hipercolesterolemia.

Consumo de cigarrillos

Existe una relación muy clara entre el consumo de cigarrillos y la susceptibilidad a la cardiopatía isquémica. En varones que fumen una o más cajetillas al día, la

mortalidad es 70 a 200% mayor, que la de los no fumadores y el riesgo es particularmente alto en varones jóvenes.

Diabetes

La diabetes se acompaña por un incremento de aterosclerosis, comprobado en autopsias, presentándose una frecuencia doble de infarto al miocardio en diabéticos en comparación con no diabéticos.

Otros factores

Estos se han denominado en algunos casos, factores secundarios de riesgo, que aumentan la gravedad de la aterosclerosis. La actividad física, por ejemplo, está cada vez más involucrada. El sedentarismo contribuye al desarrollo de la aterosclerosis, en una proporción tres veces mayor en relación a personas físicamente activas. Se ha comprobado experimentalmente que el ejercicio favorece a buenas condiciones en el miocardio. La obesidad está básicamente relacionada con mayor riesgo de muerte por complicaciones clínicas de aterosclerosis, aunque se cree que la relación es indirecta. Los individuos obesos tienden a presentar mayor hiperlipidemia, hipertensión y diabetes. En cuanto al estrés, todavía hay muchas especulaciones; se admite, sin embargo, que una persona que vive preocupada y llena de tensiones emocionales tiene cierta predisposición a padecer cardiopatía coronaria, aunque los datos estadísticos no son del todo concluyentes.

Se piensa que en el proceso de aterosclerosis intervienen otros factores tales como reacciones inflamatorias, inmunológicas y otras que aún no se definen. Y es precisamente dentro de las no definidas, que se ha señalado la posible participación de microorganismos tales como virus y bacterias que con mucha frecuencia se han encontrado presentes en lesiones aterosclerosas humanas por lo cual, se supone que el origen de la aterosclerosis tiene alguna relación con la presencia de endotoxinas bacterianas, con la formación de complejos inmunes que pudieran causar daño celular o que los estímulos microbiológicos alteren el metabolismo de los lípidos, lo cual tiene fundamento serológico. Inclusive, un trauma de tipo mecánico o la administración de sustancias tóxicas como la homocisteína, pudieran dar como resultado la formación de un ateroma. Pero aún con todo lo anterior, no se ha determinado qué relación tiene el mecanismo de formación de aterosclerosis o su aceleración.

Se ha considerado que las endotoxinas estuvieran relacionadas con la activación de células endoteliales y por si fuera poco, aumentan la liberación de radicales superóxido, los cuales tienen un alto potencial patógeno que causaría un enorme daño al endotelio celular, lo cual se ha comprobado *in vitro* (6,21,25,55,84).

Patogenia de la aterosclerosis

La búsqueda constante de cualquier indicativo acerca de algún factor de riesgo previsible, de algún tipo de agente reversible o del conocimiento de cómo progresa la aterosclerosis, acerca de cómo pudiera controlarse o limitarse, sería una excelente y muy importante contribución para terminar con esta enfermedad. Sin embargo, lo

único que se tiene son teorías. Lo que sí está claro es que cualquier concepto de la patogenia de la aterosclerosis debe explicar el papel de los factores de riesgo, la naturaleza de las lesiones y su relación con la íntima. La presencia de lípidos en casi todas las lesiones y los mecanismos de proliferación del músculo liso, que al parecer es un proceso típico y temprano en el desarrollo de la aterosclerosis, tratan de explicar adecuadamente todos estos hechos, aunque a la fecha ninguna teoría lo ha logrado, figura 2. A continuación se enunciarán algunas de las teorías planteadas al respecto (84).

Teoría de la incrustación. Indica que la lesión se inicia con la formación de trombos en las paredes vasculares que posteriormente se incorporan a la íntima. La aterosclerosis se desarrolla en tres etapas. En la primera, se presenta la formación de estrías grasas en la íntima, principalmente en las dos primeras décadas de la vida. En la segunda etapa, la conversión de estrías grasas en placas fibrosas, se lleva a cabo en las dos siguientes décadas y, por último en la tercera etapa, en años posteriores, se generan complicaciones locales alrededor de las placas, en las cuales puede haber hemorragia, reblandecimiento y ulceración. La aterosclerosis pudiera ser la reacción del tejido a los lípidos acumulados(16, 21, 84).

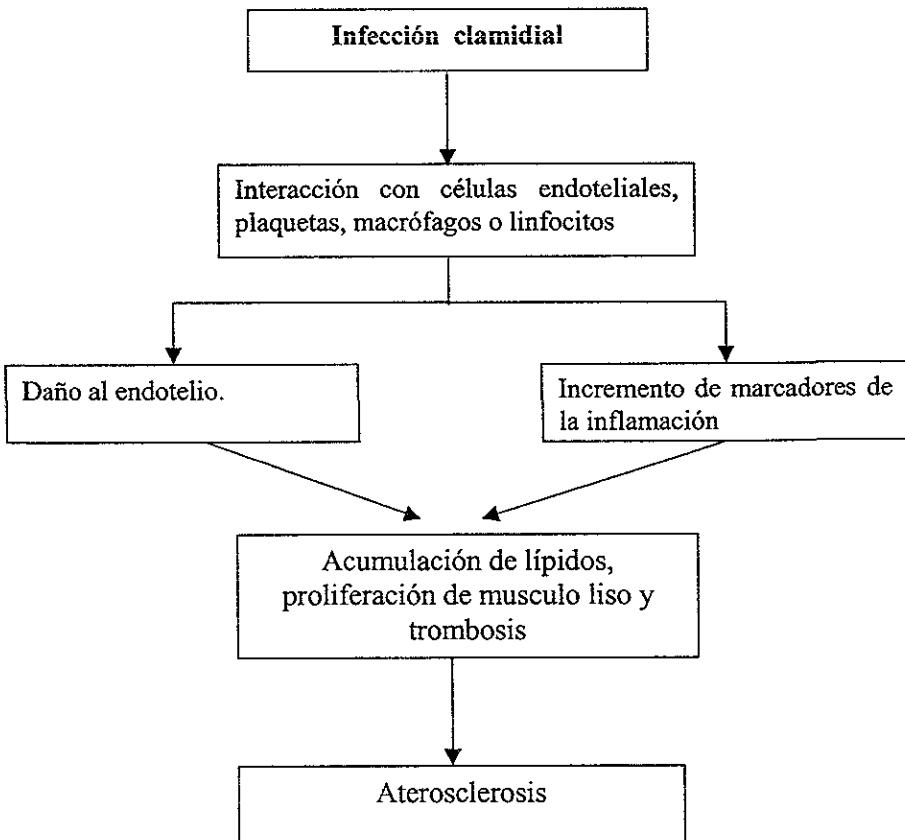
En otra teoría los investigadores consideran que la aterosclerosis es un trastorno del metabolismo de la pared vascular; que las lesiones primarias se originan en la íntima, aunque se desconocen cuáles sean las alteraciones iniciales. Otro grupo más, opina que las lesiones inician con la presencia de células espumosas que se depositan en la capa subendotelial de la íntima. Se ha dado el término de células espumosas a aquellos macrófagos que han fagocitado lípidos.

Existe otra teoría que afirma que cuando se forma el ateroma, depósito de tejido necrosado y degenerativo con lípidos, colesterol y restos celulares se forma un

absceso, por el cual el paso de nutrientes de la luz del vaso hacia la íntima se ve alterado. Esta placa ateromatosa en muchos casos origina un engrosamiento de la pared del vaso y deja la luz muy reducida. Si este ateroma se extiende hacia la superficie, puede abrirse paso a través de la íntima vaciando su contenido a la luz del vaso, produciéndose una úlcera ateromatosa. Comienza entonces a depositarse calcio alrededor de la lesión ateromatosa, así como en las zonas engrosadas de la íntima, se producen grandes placas calcificadas y, en ocasiones, se origina un verdadero tejido óseo. La ruptura de los canales de la íntima, produce hemorragias localizadas que pueden empeorar el proceso aterosclerótico aumentando la insuficiencia circulatoria (1, 5, 17, 21, 25, 54,55).

Sin embargo, existe una teoría que viene a contradecir un poco la anterior. Explica que el proceso de aterosclerosis (AS) se desarrolla a partir de un mecanismo de respuesta frente a algún tipo de agresión al endotelio arterial. La agresión puede ser mínima o puede producir una descamación de las células endoteliales. Las zonas alteradas o lesionadas, conducen a un aumento de la permeabilidad, permitiendo el paso de componentes plasmáticos; es así como plaquetas y monocitos, o ambos, se adhieren al endotelio o tejido conectivo subendotelial. Los factores liberados por la plaquetas y monocitos o algún otro constituyente plasmático, inducen la migración de fibras musculares lisas desde la media hasta el interior de la íntima con su subsecuente proliferación. Conjuntamente se producen grandes cantidades de matriz de tejido conectivo y se acumulan lípidos. Existen mecanismos que se encargan de la reparación del endotelio, sin embargo, una agresión repetida o crónica, probablemente traerá como consecuencia el desarrollo de una placa ateromatosa. Factores de riesgo como hipertensión o consumo de tabaco pueden causar lesión endotelial o ayudar al aumento de la permeabilidad endotelial.

Figura 2. Posible ruta de formación de la aterosclerosis



Infarto al miocardio

Ya se ha mencionado, que el infarto al miocardio (IM) es una de las principales consecuencias de AS grave. Este padecimiento se considera como la destrucción celular, necrosis o muerte de una región del miocardio, que por un escaso riego coronario y una importante disminución de oxígeno, provoca una etapa de isquemia que se agrava. La transición de isquemia a infarto puede ser lenta o brusca. Puede no haberse presentado una isquemia y establecerse un infarto, si es que hubo una oclusión aguda, debida a un trombo en una arteria coronaria aunque sucede pocas veces, por lo general, siempre deberá haber isquemia. Cuando el tejido se comienza a destruir y antes de necrosarse, la zona de isquemia se convierte en una zona de lesión. Esta puede ser reversible, pero si persiste por más tiempo producirá finalmente un infarto(85).

Aunque suele originarse por una oclusión coronaria aguda, el IM también puede producirse sin obstrucción mecánica de una arteria coronaria después de la brusca e intensa disminución del volumen de sangre o del contenido de oxígeno de las arterias coronarias, por trastornos circulatorios o hemáticos(85).

La incidencia de IM fatal se eleva progresivamente con la edad hasta alcanzar un máximo entre los cincuenta y cinco y los sesenta y cuatro años de edad en los varones y en la octava década de la vida en las mujeres. Aunque el IM puede ocurrir en personas muy ancianas, los individuos jóvenes no está, exentos, incluso en la tercera década de la vida, particularmente en presencia de factores de riesgo predisponentes a la AS. En la siguiente década (cuarenta y cinco) la incidencia es de

cuatro veces más. Un dato curioso es que excepto en aquellas con algún proceso aterogénico predisponente, las mujeres están notablemente protegidas frente al IM durante su vida reproductora(85).

Existen diversas variables que contribuyen al riesgo de padecer un IM como el consumo de tabaco, pero aún son consideradas temas de discusión. A la fecha, no hay nada concluyente, aunque sí teorías muy sugestivas.

***Chlamydia pneumoniae* y su relación con las enfermedades cardiovasculares**

Hoy en día, las enfermedades cardiovasculares son la causa más importante de muerte en Occidente. Los estudios realizados para la determinación de factores predisponentes a las enfermedades coronarias, han demostrado una fuerte asociación con factores como el sedentarismo, hipertensión, diabetes y/o consumo de tabaco. No obstante, estudios recientes incluyen el efecto de microorganismos sobre el sistema cardiovascular. Los dos primeros y fuertes sospechosos fueron *Chlamydia pneumoniae* y Citomegalovirus (CMV). Sin embargo el CMV está más estrechamente implicado en un padecimiento denominado estenosis vascular coronaria, que con el infarto al miocardio y AS, dejando como única sospechosa potencial a *Chlamydia pneumoniae* (20, 42,50,98,106).

Chlamydia pneumoniae, es un microorganismo que muchas veces convive el organismo humano. Los síntomas más comunes de su infección son el estornudo y la tos.

En 1980 en pacientes con enfermedad coronaria se hallaron títulos elevados de anticuerpos anticlamidia, lo que posiblemente sea el resultado de infecciones repetidas. En 1986 el Dr. Grayston y sus colaboradores, aislaron una cepa que producía infecciones agudas del aparato respiratorio. Esta cepa se denominó TWAR, por sus primeros aislamientos en Taiwán y por que los casos eran respiratorios agudos. En 1989 se le clasificó como *Chlamydia pneumoniae*.

Chlamydia pneumoniae puede causar una infección relativamente leve en el tracto respiratorio superior, pero hasta ahora, su forma etiológica más característica es una neumonía en el adulto joven. La febrícula y la tos persistente son algunos de los síntomas más comunes. La neumonía asociada con *C. pneumoniae* se transmite de persona a persona sin la presencia de un intermediario, hospedero mamífero o aviario. Los niños con desnutrición crónica pueden verse afectados de forma muy severa.

Sin embargo estudios recientes aseguran que esta misma bacteria pudiera estar íntimamente relacionada con enfermedades vasculares como AS e IM. Algunos expertos opinan que es probable que esta misma bacteria, que vive en el aire, penetre en los pulmones, de ahí pase a los vasos sanguíneos y entonces haga estragos en el corazón.

Científicos especializados en aterosclerosis afirman que el proceso comienza, como se mencionó en algunas teorías al respecto, por alteración del endotelio vascular lesionado debido a los subproductos del tabaco o lipoproteínas de baja densidad, desencadenando un proceso inflamatorio que se ve mayormente afectado si las bacterias se encuentran en la sangre circulante, influyendo desfavorablemente en el proceso.

En 1997 el Dr. Chiu y sus colaboradores publicaron un artículo en el que incluyeron otro tipo de microorganismo como agente causal, el Herpes virus, poco a poco se fue descartando debido a que es muy poco frecuente. Se le encuentra presente en raras ocasiones en estas enfermedades.

Otro microorganismo que se agregó a la lista de sospechosos implicados en estas lesiones fue *Helicobacter pylori*, pero fue el mismo Dr. Chiu, quien tras examinar cuidadosamente varias muestras, determinó que éste no se encontraba en arterias ateroscleróticas.

El Dr. Grayston en Estados Unidos ha encontrado ADN y proteínas de *Chlamydia pneumoniae* en muestras de ateromas provenientes de pacientes que presentan enfermedad cardiocoronaria; esto se observó en el 60 % de las arterias enfermas y en ninguna de las arterias sanas.. Investigadores de Finlandia, Japón, Inglaterra e Italia confirman estos hallazgos. Muchos de ellos se fundamentan en evidencias serológicas. Se han encontrado una y otra vez títulos elevados de Ig G e Ig A en pacientes (masculinos principalmente) que padecen de AS e IM.

Sin embargo, otro investigador, el Dr. Hammerschlag en Nueva York, no logró el cultivo de *C. pneumoniae* en ateromas, pero esto no significa en lo absoluto que el microorganismo se pueda descartar como participante. Muchos científicos se han dado a la ardua tarea de resolver la incógnita que hay detrás de este parásito intracelular obligado, que si bien su naturaleza hace aún más difícil su aislamiento, su estudio tampoco permite resolver dudas al encontrarse, inclusive, en estudios *postmortem* del corazón.

Dado que no hay nada claro acerca del verdadero papel que juega *C. pneumoniae* en la enfermedad cardiocoronaria, se han planteado algunas hipótesis. La teoría más aceptada hasta ahora, sobre la capacidad aterogénica de *C. pneumoniae* es la

planteada por el Dr. Saikku. El microorganismo infecta y destruye macrófagos pulmonares, liberando cuerpos elementales, lipopolisacáridos y sustancias oxidantes. Asevera que la misma infección, por otra parte, incluye la liberación de citocinas y Factor de necrosis tumoral (FNT), los cuales disminuyen la acción hidrolítica de la lipasa lipoprotéica (lipoproteín lipasa) originando un aumento de las lipoproteínas de muy baja densidad que son ricas en triglicéridos y antecesoras de las lipoproteínas aterogénicas de baja densidad. Si el nivel de triglicéridos aumenta, se tendrá una baja en el nivel de lipoproteínas de alta densidad, que son las protectoras. Los lipopolisacárido del microorganismo reaccionan con las lipoproteínas de baja densidad aumentando la afinidad del microorganismo por los complejos inmunes, a la vez que estimulas la acción de sus propios receptores que reconocen lipoproteínas de baja densidad que ya han sido previamente oxidadas y son fagocitadas por el macrófago, que al cargarse de lípidos se convierten en células espumosas, las cuales son la base estructural de las lesiones preaterosclerosas que también se conocen con el nombre de estrías grasas.

Las células espumosas tienden a regresar a la corriente sanguínea para eliminar la capa de material lipídico y para ello están dotadas de una serie de armas bioquímicas histolíticas (lipasas y collagenasas) que alteran la integridad del endotelio y facilitan la entrada a nuevos macrófagos. Promueven además, la agregación plaquetaria y la formación de agentes mitógenos responsables de la disfunción de la colágena que es la base del proceso escleroso de la aterosclerosis.

Por otro lado se ha planteado que a partir de una infección crónica con *C. pneumoniae* pudiera derivarse una enfermedad cardiocoronaria. Esto es porque se ha visto que *C. pneumoniae* se multiplica en los macrófagos alveolares y en las células endoteliales. La clamidia, durante una infección crónica del pulmón puede tener fácil acceso al torrente sanguíneo así como también sus lipopolisacáridos (LPS). Al

parecer, estos polisacáridos tienen elevados efectos sobre la permeabilidad vascular y sobre el mecanismo de la coagulación. Una vez que se encuentra en sangre tal vez origina la formación de complejos inmunes con anticuerpos ya existentes. Este complejo formado por Ac- LPS clamidial se deposita sobre la pared del vaso sanguíneo provocando el inicio del proceso aterosclerótico. La presencia de este vaso genera una inflamación local y problemas plaquetarios. Se cree que la unión LPS clamidial – lipoproteína de baja densidad (LDL), pudiera modificar a la lipoproteína haciéndola inmunogénica o tóxica para las células endoteliales. Se ha observado que, modificada o unida a un anticuerpo, puede dar origen a una célula espumosa in vitro, por tanto, se ha considerado a este tipo de células –como se mencionó anteriormente– precursoras en el proceso de aterosclerosis. Por su parte, parece ser que el lipopolisacárido de clamidia induce de manera importante y muy potente la presencia de la interleucina 2 y del FNT. Si la síntesis de FNT continúa, inhibirá la acción de la lipoproteín-lipasa, provocando una alteración en el metabolismo de los lípidos y, por consiguiente, se obtendrá una acumulación de triglicéridos en el torrente sanguíneo.

Aunque todavía no se cuenta con más datos, se sugiere que si el proceso anterior no cesa, es decir, se continúa la producción de FNT, podría generarse una infección de tipo crónico con *C pneumoniae* y se originaría, de forma inevitable, una enfermedad de las arterias coronarias.

Chlamydia es bien conocida por su capacidad para causar infección crónica con secuelas cardíacas muy severas aún tiempo después de su ingreso al organismo. Se ha comentado que, inclusive, pueden ser varios años. La aterosclerosis avanzada bien pudiera ser el producto de una infección crónica por *Chlamydia*, se calcula que

aproximadamente de unos treinta a sesenta años atrás. Existe la posibilidad de que *C. pneumoniae* puede desencadenar una inflamación crónica en la AS.

Se ha demostrado que en conejos blancos de la cepa Nueva Zelanda, *C. pneumoniae* es capaz de infectar la pared de los vasos sanguíneos, hecho que probablemente dé como resultado lesiones ateromatosas.

Los estudios serológicos apoyen ampliamente la asociación entre *C. pneumoniae* y la enfermedad cardiocoronaria. La presencia y prevalencia de títulos elevados y persistentes de Ig G, Ig A y anticuerpos anti*Chlamydia pneumoniae* se incrementan con la edad. Se ha visto que, de acuerdo a los valores de anticuerpos reportados, toda persona ha tenido o tendrá contacto con *C. pneumoniae* al menos una vez en su vida.

La persistencia de anticuerpos Ig A e Ig G, indican que una infección crónica se asocia con un alto riesgo de desarrollar AS. A partir de un gran número de estudios realizados acerca de la presencia de *Chlamydia pneumoniae* en el corazón, la posibilidad de padecer una enfermedad coronaria es dos veces mayor en aquellos pacientes en quienes no se encuentran estos anticuerpos. Gracias a esto, hoy en día se elaboran estudios y planes de trabajo que confirman la verdadera relación entre anticuerpos anti*Chlamydia pneumoniae* y manifestaciones de AS.

Otra posibilidad es la del papel que pudieran desempeñar las citocinas y los mediadores celulares de los que se hizo referencia anteriormente. Tal vez estos mediadores celulares de la respuesta de fase aguda estén involucrados directamente en la patogénesis de la AS vía inflamación de la pared arterial que tanto se ha mencionado en este padecimiento.

Comentarios finales

A pesar de los enormes esfuerzos realizados para conocer el verdadero papel de este polémico microorganismo, no se tiene aún respuesta clara. No existen bases indudables que den la seguridad para definir el origen de la AS y del IM debidos a la controversial presencia de *C. pneumoniae*. Pistas hay muchas, pero parece ser que entre más datos o evidencias surgen, las dudas se incrementan el doble. Por lo tanto, siguen en pie tres posibles hipótesis acerca de la posición de *C. pneumoniae* en todo este suceso:

Chlamydia pneumoniae es un microorganismo que únicamente pasa por el lugar lesionado con un ateroma.

Chlamydia pneumoniae, si bien es un microorganismo patógeno para el hombre, actúa aquí como patógeno secundario del ateroma.

Chlamydia pneumoniae es en realidad el agente causal de la AS.

Posiblemente surgirán aún más evidencias a favor o en contra de *Chlamydia pneumoniae*. Evidencias que pudieran incluso, negar participación alguna en este caos cardiocoronario. Sin embargo, muchos investigadores desean, de alguna manera, que efectivamente tenga que ver algo en estos padecimientos, debido a que podrían ser tratados con la ayuda de antibióticos. Podrían prevenirse, y de ser posible, generarían la creación de programas para su control, evitando la elevada incidencia de AS e IM ante la población mundial.

III Diagnóstico de laboratorio

Así como en otros padecimientos infecciosos, la utilidad de cualquier procedimiento diagnóstico para la detección de clamidias depende de la recolección apropiada de muestras (22,42).

Dado que *Chlamydia pneumoniae* es bien conocido como un agente etiológico de numerosas enfermedades del tracto respiratorio superior, tales como neumonía, bronquitis, sinusitis y faringitis, entre otras, y se piensa que del pulmón migra al área cardiovascular, algunas muestras se recolectan del tracto respiratorio superior como el esputo, secreciones y lavado broncoalveolar. En el caso de sitios cardiovasculares, la mayoría de las muestras empleadas para el diagnóstico son sueros de pacientes sanos (que se utilizan como control), sueros de pacientes con alguna enfermedad cardiocoronaria y pacientes a quienes se les ha diagnosticado endocarditis clamidial; otras más, son muestras de tejido ateromatoso o de pacientes que han sufrido de ataque al miocardio. Por último, cabe mencionar que también muchas de las muestras utilizadas para la investigación se obtienen de autopsias de pacientes que perecieron de infarto al miocardio o de alguna otra enfermedad cardiocoronaria (8,9,15,24,42,54,57,60,61,71,104).

Muchos son los factores que contribuyen a la dificultad del diagnóstico de *Chlamydia pneumoniae*. Uno de los más importantes es que se desconoce el mejor sitio para la toma de muestras. Su sitio anatómico de colonización aún no está totalmente definido, así que la toma de la muestra se lleva a cabo de diferentes zonas anatómicas (9).

Una vez que las muestras han sido recolectadas, se someten a diferentes tratamientos según las diversas metodología. El diagnóstico de laboratorio de las infecciones de *Chlamydia* puede lograrse de las siguientes formas: 1) el examen directo a muestras clínicas. Se lleva a cabo con la finalidad de encontrar inclusiones clamidiales, antígenos y ácidos nucleicos; 2) por aislamiento del microorganismo; 3) mediante la detección de anticuerpos específicos contra clamidias (22,42,61,75).

Por ejemplo, las muestras tomadas de autopsias se analizan por inmunocitoquímica, PCR y microscopía electrónica, otras más, se someten a inmunofluorescencia o a microinmunofluorescencia (8,9,10,42,60).

Debido a la dificultad de su cultivo, el diagnóstico de las clamidias no puede llevarse a cabo mediante los métodos tradicionales de cajas con agar, sin embargo, se emplean técnicas muy novedosas de biología molecular como la de la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*) y, que de no ser por técnicas como ésta, hace algunos años no podría haberse logrado un estudio más detallado (8,9,10,22,24,71,75).

Para dicho diagnóstico de las infecciones por clamidias, se utilizan también la prueba de fijación del complemento (*FC*) y la técnica de microinmunofluorescencia. La prueba de FC utiliza un antígeno específico de género (un lipopolisacárido LPS) y es aplicable para el diagnóstico de infecciones causadas por *Chlamydia pneumoniae*, *C. psittaci*, y para las cepas LGV de *Chlamydia trachomatis* (42).

El diagnóstico de *Chlamydia pneumoniae* se basa más que todo en técnicas serológicas. Dos pruebas que se han utilizado ampliamente para la detección de *Chlamydia pneumoniae* son la microinmunofluorescencia (*MIC*) y la fijación del complemento; mencionadas en el párrafo anterior. Siendo que la MIF es específica

para mientras que FC nos sirve para la detección de todas las *Chlamydia pneumoniae* especies del género *Chlamydia*, pero a menudo resulta negativo en caso de reinfección o reactivación de una infección latente. Se han descrito, además pruebas con anticuerpos fluorescentes (FA) que usan anticuerpos monoclonales específicos para *Chlamydia pneumoniae*, pero la MIF sigue siendo, por mucho, la prueba más sensible (9,15,45).

La prueba del MIF, es considerada ampliamente como una técnica de elección. Utiliza cuerpos elementales o cuerpos reticulados como antígenos. Aunque esta técnica es un poco tardada, es sensible y específica de especie y permite diferenciar IgM de IgG (15).

Sin embargo, debe tenerse mucho cuidado con la interpretación de los resultados serológicos, ya que siempre se corre el riesgo de presentarse algún tipo de reacción cruzada con otro microorganismo, sin olvidar que incluso puede suceder entre especies del mismo género (61).

Se ha visto que en pacientes con endocarditis se presenta reacción cruzada entre *Bartonella quintana* y especies de género *Chlamydia*. La adsorción de un suero con antígenos de *Bartonella quintana* y antígenos de *Chlamydia pneumoniae* remueven los anticuerpos anticlamidia, mientras que la adsorción con los antígenos de *Chlamydia pneumoniae* no cambia los títulos de *Bartonella quintana*. *Bartonella quintana* es el agente de la linfadenopatía coronaria de desórdenes neurológicos y como los anticuerpos monoclonales de *Chlamydia pneumoniae* reaccionan con antígenos de *Bartonella*, es común que se diagnostique endocarditis debido a *Chlamydia pneumoniae* siendo que la verdadera causante pudiera ser *Bartonella quintana*. No obstante, ahora esta reacción cruzada está bien definida. *B. quintana*

presenta además, otra reacción cruzada con *Coxiella burnetii*, agente causal de la endocarditis de la fiebre Q (61).

Otra técnica de diagnóstico frecuentemente empleada es la de la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*), la cual es una buena alternativa para agentes etiológicos de difícil detección, aislamiento o cultivo. La PCR se utiliza para facilitar la detección aplicando cantidades mínimas de ADN viral o bacteriano en muestras clínicas y con frecuencia permite identificar estos microorganismos con mayor rapidez que las técnicas convencionales de cultivo (9,15,24,60,96).

La técnica de PCR para *Chlamydia pneumoniae* puede detectar 10-16 de ADN, aproximadamente lo que equivale a un cuerpo elemental clamidial. Se ha utilizado exitosamente en la detección sensible y específica de *Chlamydia pneumoniae* Las muestras que se han empleado han sido sueros de pacientes con AMI y enfermedades cardiocoronaria (15,24,71).

Básicamente, lo que se logra con la técnica de PCR es amplificar secuencias de genes que codifican para las proteínas de la membrana externa, *omp1* y *omp2* y que se encuentran en muchas de las cepas de *Chlamydia Pneumoniae* (8,10,71,104).

El cultivo celular es otra técnica utilizada para el diagnóstico de *Chlamydia pneumoniae* Este proceso de cultivo es muy tardado y requiere de gran cantidad de materiales, equipo e instalaciones especiales que en un laboratorio convencional o de rutina, no posee. No se hacen cultivos de rutina, sin embargo, sí se tienen dos líneas celulares preferidas, las células HEP-2 y las McCOY (fibroblastos de ratón). Posteriormente se realiza una inmunofluorescencia utilizando anticuerpos monoclonales para la detección de inclusiones clamidiales (8,15,24).

Como ya se mencionó, se han descrito pruebas de anticuerpos fluorescentes (FA), pero la técnica más sensible para la identificación de cuerpos de inclusión, después de un activo celular primario, es la inmunofluorescencia (42).

Obtención de células clamidiales

Los cuerpos elementales de *Chlamydia pneumoniae* se purifican mediante la remoción de LPS de género, debido a que los anticuerpos contra dicho LPS son los primeros en aparecer en el curso de la infección primaria aguda, debida a *Chlamydia pneumoniae* así que son muy importantes en un estudio serológico de *Chlamydia*. En algunas pruebas de tipo serológico, los cuerpos elementales son los que se utilizan como anticuerpos (8,60).

En general, la evaluación serológica sigue siendo la principal herramienta de diagnóstico. No obstante, en algunas ocasiones es necesario realizar técnicas de confirmación como Western blot que pueden identificar plenamente al agente etiológico (61).

Igualmente, otra técnica que se ha empleado para el diagnóstico de *Chlamydia Pneumoniae* es el Inmunoblot. Aparte de la confirmación de la presencia de agentes infecciosos, se han utilizado básicamente para secuenciar y diferenciar cepas de *Chlamydia pneumoniae* para su posterior uso de ensayos inmunológicos (104).

Técnicas de biología molecular

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En los últimos 5 años esta técnica ha venido a enriquecer el diagnóstico molecular de muchas enfermedades infecciosas en los laboratorios. Así, los nuevos métodos aprovechan las ventajas de las propiedades químicas de los ácidos nucleicos, así como de enzimas muy especializadas que pueden reparar y replicar ADN *in vitro*.

El método de PCR se ha empleado exitosamente para la detección de ADN de especies de *Chlamydia* en nuestras clínicas. Mediante el uso de primers que reconocen determinadas secuencias de los genes de la proteína mayor de la membrana externa de la *Chlamydia* o de la proteína rica en cisteína 60 K Da, la PCR se usa para la diferenciación de *Chlamydia spp.* De este modo, la amplificación de secuencias del ADN de *Chlamydia pneumoniae* por PCR se ha podido llevar a cabo sin dificultad (9).

Comenzando con una muestra de ADN de un número pequeño de células, la PCR se puede usar para sintetizar copias múltiples de un gen o un segmento de gen en particular. Sin embargo, hay que mencionar que dicha técnica, por sí misma, no es un método diagnóstico (71,96).

Para muestra clínica, el proceso general asociado a la detección del agente causal con base en el reconocimiento de su ADN, consta de tres pasos básicos:

- 1.-Procesamiento de la muestra
- 2.-Amplificación del ADN por PCR
- 3.-Identificación del ADN amplificado

La exactitud y precisión del diagnóstico molecular, se fundamenta en dos factores generales: La consistencia de la secuencia nucleotídica en los segmentos “blanco” de ADN y la posibilidad de establecer en forma rápida y confiable la procedencia de los ácidos nucleicos.

La PCR es una técnica relativamente fácil de elaborar. Requiere solamente un tubo de reacción, unos pocos reactivos y un aparato automatizado de ciclos térmicos donde se efectúa la reacción mediante distintas temperaturas. El ADN que se desea copiar puede encontrarse puro o puede constituir una pequeña porción de una mezcla de materiales biológicos (104).

Una vez que se ha llevado a cabo la amplificación del ADN “blanco”, su identificación se puede establecer mediante diferentes métodos que comprenden desde una electroforesis en gel de agarosa, hasta ensayos inmunogenéticos que involucran el empleo de marcadores. No obstante, la técnica mayormente empleada para la confirmación de productos amplificado es el Western blot (104).

La amplificación de ADN por la PCR se basa en una reacción enzimática realizada por la enzima conocida como ADN polimerasa. Cada molécula de ADN de una hebra tiene dos extremos llamados 5' y 3' cuyas propiedades químicas y biológicas difieren. En el ADN de doble hebra o tira éstas son antiparalelas, es decir, sus extremos 3' y 5' mantienen orientación opuesta entre sí. La enzima polimerasa alarga estas tiras durante la replicación del ADN y sólo puede efectuarse lo anterior

al agregar nuevas bases de nucleótidos en el extremo 3' de una tira preexistente, que actúa como cebador o iniciador (75,95).

- La amplificación del ADN se logra mediante ciclos repetitivos de PCR, cada uno de los cuales presenta tres etapas a diferentes temperaturas:
- Desnaturalización del ADN molde (entre 94° y 96°C).
- Aislamiento de los iniciadores al molde (entre 42° y 60°C)
- Elongación de los iniciadores por la ADN polimerasa (entre 60° y 72°C)

Cada una de las etapas anteriores tiene una duración de apenas unos minutos, por ello es muy importante que el laboratorio cuente con un termociclador que permita programar tiempos y temperaturas durante todo el proceso.

La reacción de amplificación contempla la participación de los iniciadores (primers o cebadores), que se hibridan (uniéndose por complementariedad de bases) a cadenas opuestas del segmento “blanco”; cada iniciador se orienta de forma tal que la elongación se lleva a cabo a partir de su extremo 3'-OH, a través de la zona delimitada entre ambos iniciadores y hasta la región homóloga al otro iniciador. Como cada producto de la amplificación incluye la secuencia complementaria a la del otro iniciador, prácticamente todos los productos de cada reacción sirven de molde para el siguiente ciclo de la PCR (24,71,75,96,104).

En la primera etapa del ciclo se provoca la desnaturalización del ADN molde, entre 94° y 96°C. En la segunda etapa, la mezcla de reacción se somete a la temperatura óptima de alineamiento entre el iniciador y su molde (de 42° a 60°C). En la tercera, la temperatura se modifica a 72°C, que es ligeramente inferior a la óptima de una

ADN polimerasa termoestable. De esta manera, los iniciadores se elongarán hasta producir nuevas hebras de ADN, incorporando nucleótidos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) que corresponden por complementariedad, mediante la participación de la enzima (9,71,104).

La hibridación inespecífica de los iniciadores, puede inducir a la acumulación de productos inespecíficos o a la ausencia de amplificación. Cabe señalar que la reacción concluye cuando la cantidad de enzima se reduce hasta niveles insuficientes (por la inactivación), pero también existe el hecho de que la efectividad del alineamiento de los iniciadores va disminuyendo paulatinamente (al irse disminuyendo su concentración e incrementando en forma exponencial el número de secuencias “blanco”) (9,71,96,104).

Para la identificación del ADN amplificado, una vez incluida la técnica de la PCR, el siguiente paso consistirá en seleccionar un método adecuado para dicha detección, dado que los más comunes varían significativamente en cuanto a sensibilidad, dificultad, confiabilidad y costo.

Los productos de la PCR se pueden analizar por electroforesis en un gel de agarosa con bromuro de etidio; el corrimiento de las muestras se observa a través de U.V.

De acuerdo a los resultados obtenidos y objetivos de cada proyecto, los investigadores han recurrido a la modificación de las técnicas. En este sentido, la técnica de la PCR tiene una modificación, la RT-PCR, que es la transcriptasa reversa en la reacción en cadena de la polimerasa. Del ARN, más la enzima transcriptasa reversa, se obtiene cADN (ADN complementario) verificándose esta reacción si existe o no transcripción (45).

Otra modificación, es la de PCR-EIA, inmunoensayo enzimático en la reacción en cadena de la polimerasa, que ha resultado ser una muy buena herramienta para el análisis de los fragmentos de ADN amplificados (24).

En casos como los anteriores, cada investigador modifica las técnicas de acuerdo a sus necesidades particulares; en algunas ocasiones sólo modifican temperaturas o tiempos, todo esto con la única finalidad de obtener la mejor amplificación de ADN para cada muestra (9).

Como el producto primario de la PCR es una molécula doble de ADN lineal, de longitud y secuencia definida, el método de detección ideal debe permitir una determinación precisa del tamaño y de la pureza del producto amplificado.

De este modo, existen técnicas que van desde el uso de geles de poliacrilamida hasta aquellos en los que se obtiene la secuencia del ADN.

Una técnica a la que se recurre con frecuencia es la electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida. La técnica denominada Western blot es un método de transferencia en membranas de nylon o nitrocelulosa que se emplea mucho para la confirmación de los resultados obtenidos mediante la PCR. Existen otras técnicas como las de inmunofluorescencia y fijación del complemento que se explicaron en breve.

Electroforesis en geles de poliacrilamida o agarosa.

El corrimiento electroforético de los productos de la PCR, representa el método más frecuentemente empleado en los laboratorios, ya que aporta resultados confiables con una sensibilidad de 1.0 a 5.0 ng de ADN.

El procesamiento simultáneo de marcadores de peso molecular y de controles positivos provenientes de microorganismos caracterizados con anterioridad, permite realizar comparaciones correspondientes y, por lo tanto, establecer la procedencia del ADN amplificado por la PCR.

Evidentemente el uso de geles de agarosa a los que se han incorporado un tinte fluorescente como bromuro de etidio, el cual se intercala entre las bases apiladas del ADN facilita las lecturas con solo exponer las placas correspondientes a la luz U:V: Las terminales de la fuente de poder deben concentrarse de tal manera que el ADN emigre hacia el ánodo, una vez concluido el corrimiento, el sistema se puede fotografiar, colocándolo en un transiluminador U:V:, utilizando filtros rojo o naranja y película en blanco y negro.

Western blot (Inmunotransferencia sobre membranas).

En este método, las mezclas complejas se separan en geles de separación analítica y luego, las moléculas se transfieren a membranas de nylon o de nitrocelulosa para la identificación de los antígenos individuales mediante sueros específicos. Con el empleo de geles de SDS (dodecil sulfato de Sodio) o de un gel de enfoque

isoelectrico en la separación inicial, es posible obtener datos sobre el tamaño, el punto isoelectrico y las reacciones moleculares de los antígenos investigados.

El fundamento del Western blot consiste en que las muestras del antígeno se separan en un gel analítico, por ejemplo en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio. Las moléculas se transfieren electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se trata secuencialmente con anticuerpos frente al antígeno específico, se lava y luego se fija con un conjugado radiomarcado para detectar anticuerpos. El principio en que se basa es similar al del radio-inmunoensayo. Después de un nuevo lavado, la membrana se pone en contacto con una placa radiográfica; se revela la autorradiografía unido al anticuerpo. La técnica puede modificarse con un conjugado unido a enzimas y el material fijado puede detectarse mediante el tratamiento con un cromógeno, que deposita un reactivo soluble directamente sobre la membrana secante.

Fijación del complemento.

La fijación de complemento se presenta durante la interacción del antígeno y los anticuerpos. De esta manera la prueba se basa en que el consumo del complemento in vitro se puede usar para medir y detectar anticuerpos, antígenos o ambos. La prueba depende de un sistema de reacción en dos etapas. En la etapa inicial, antígeno y anticuerpo reaccionan en presencia de una cantidad conocida de complemento y éste se consume. En la segunda etapa, se mide la actividad hemolítica del complemento fijado y, de esta manera, la cantidad de antígeno o anticuerpo presente en la mezcla inicial.

Los resultado se expresan como la mayor dilución sérica que muestra fijación para la estimación del anticuerpo, o la concentración de antígenos que es limitante para las determinaciones de éste.

En los casos, en os que se emplea esta técnica para la detección de anticuerpos, se realizan, como primer paso, diluciones dobles de suero problema y se añade una cantidad fija de antígenos a cada pocillo de la placa o en cada tubo. Si hay anticuerpos en el suero problema, se formarán complejos inmunes. Después se añade complemento a la muestra. Si hay completos, éstos fijarán el complemento y lo consumirán. En el paso final se añade a la mezcla células indicadoras (eritrocitos) junto con una cantidad subaglutinante de anticuerpo (EA, anticuerpo antieritrocito). Si quedan restos de complemento, las células serán lisadas; si el complemento fue consumido por los complejos inmunes, no quedará el suficiente para lisar los eritrocitos. Se emplea una cantidad de complemento justo la suficiente para lisar las células indicadoras si no ha sido consumido por los complejos.

La prueba suele realizarse en placas de plástico, empleando cantidades constante de anticuerpos y titulaciones del antígeno, es posible aplicar este técnica a la determinación de los antígenos.

Algunos antígenos pueden tener también actividad anticomplemento. Así pues, los controles deben incluir anticuerpo solo y antígeno solo para comprobar que ninguno de ellos fija por sí mismo el complemento.

Inmunofluorescencia

Dado que los colorantes fluorescentes tales como la fluoresceína y la rodamina se acoplan o conjugan a los anticuerpos sin destruir su especificidad, pueden combinarse los conjugados con antígeno presente en un corte de tejido y visualizarse a través del microscopio de luz fluorescente. De este modo, se demuestra la distribución del anticuerpo en el tejido y dentro de las células. Desde otro punto de vista, también puede utilizarse el método para detectar anticuerpos en un corte determinado de tejido o preparado celular.

La inmunofluorescencia se puede aplicar como una técnica histoquímica o citoquímica para la detección y localización de antígenos en células o tejidos.

El anticuerpo específico se conjuga con compuestos fluorescentes, sin alterar su reactividad inmunitaria, dando como resultado un excelente indicador para antígenos presentes en tejido. El anticuerpo conjugado se añade a las células o tejidos y se fija a los antígenos, formándose de este modo un complejo inmunitario estable. El anticuerpo no fijado se elimina por lavado, y la preparación resultante se observa en un microscopio de fluorescencia.

El microscopio de fluorescencia que es una adaptación de un microscopio regular contiene una fuente de luz de alta intensidad, filtros de excitación para originar una longitud de onda que pueda activar la fluorescencia y filtros de barrera para eliminar longitudes de onda de luz que pueda interferir.

Cuando se observa en el microscopio de fluorescencia contra un fondo oscuro, los antígenos unidos específicamente a anticuerpos fluorescentes se pueden detectar por su color brillante.

La fluorescencia, es la emisión de luz de un color, es decir, una longitud de onda, mientras que la sustancia se radia con luz de un color diferente.

Los fluorocromos como la rodamina o fluoresceína utilizados en los laboratorios clínicos, tienen espectros característicos de emisión y absorción. El isotiocianato de fluoresceína (FITC) es un tipo químico de fluoresceína que se une covalentemente con rapidez a las proteínas en un pH alto, en principio a través del aminoácido lisina y grupos aminoterminales. Su absorción máxima es de 490 a 495 nm y emite un color verde característico a 517 nm. El isotiocianato de tetrametil rodamina, que emite en rojo, tiene un máximo de absorción a 550 nm y una emisión máxima a 580 nm (para conjugado de rodamina y proteína).

IV Tratamiento

Debido a la naturaleza intracelular de *Chlamydia pneumoniae* se han requerido tratamientos antimicrobianos largos para la eliminación de la bacteria que se encuentra en los macrófagos y células endoteliales de las arterias afectadas.

Hoy en día, numerosos investigadores se han dado a la tarea de hacer pruebas con medicamentos tales como la tetraciclina, eritromicina, ofloxacina, ciprofloxacina, azitromicina, clindamicina y doxiciclina (66, 74, 84).

En un estudio realizado por investigadores del Hospital St. George en Inglaterra se trataron, con azitromicina, 46 pacientes que habían sufrido de ataque al corazón. Seis meses después se observó un decremento considerable en el daño inflamatorio, aunque nunca se llegó a una conclusión definitiva (74).

Desafortunadamente, la mayoría de los tratamientos convencionales utilizados contra *Chlamydia pneumoniae* fallan, causando una elevada incidencia de enfermedad cardiocoronaria y en muchos casos, mortalidad.

Desde que *Chlamydia pneumoniae* ha demostrado sensibilidad a diversos antibióticos, constantemente se llevan a cabo estudios para tratar de eliminarla de las lesiones ateroscleróticas, Si bien es cierto que *Chlamydia pneumoniae* es un patógeno intracelular obligado con un cuerpo elemental infeccioso extracelular y un cuerpo reticular intracelular no infecciosos, es importante mencionar que los resultados deben estar correlacionados a la fase de crecimiento de la bacteria y,

entonces el término de concentración terapéutica será, por mucho, más difícil de establecer que para una bacteria extracelular (72, 74, 84).

Uno de tantos esquemas de tratamientos que se han elaborado contra las infecciones por *Chlamydia pneumoniae* han comprendido el uso de tetraciclina y eritromicina. Sin embargo, nuevas quinolonas (fluoroquinolonas) y macrólidos han presentado muy buena acción *in vitro* contra las infecciones clamidiales (66, 72, 74, 84).

Estudios realizados acerca de la susceptibilidad de *Chlamydia pneumoniae* a un antibiótico, midiendo su MIC (concentración mínima inhibitoria) y su MBC (concentración bactericida mínima), arrojan datos que reflejan el posible éxito de estos antibióticos aplicados a los humanos (74).

De entre los estudios realizados para probar susceptibilidad, destaca el uso de diferentes condiciones de trabajo. Se ha probado con cepas recién incubadas y cepas preincubadas.

Cuando se ocupan diferentes tiempos de preincubación, las concentraciones del antibiótico (doxiciclina) se mantienen alrededor de 16 mg/ml. Se ha observado que con 32 mg/ml de azitromicina las células hospedadoras mueren.

Cuando se trabaja con células preincubadas a diferentes tiempos, de hasta una hora y se adiciona el antibiótico (azitromicina y doxiciclina) se han logrado valores de MIC y MBC más altos que en las células las que se les agrega el antibiótico desde el inicio de la incubación.

También se ha visto que el valor de la MIC baja cuando las células se exponen al antibiótico durante un tiempo prolongado, lo que hace notar la importancia de agregar únicamente la cantidad suficiente de antibiótico durante el ciclo completo de crecimiento de *Chlamydia pneumoniae*, mínimo de 72 horas, para lograr mejores resultados (74).

Aunque mediante microscopía electrónica se observa el antibiótico en las células, habrá que hacer, todavía otros estudios para evaluar la importancia de los componentes clamidiales residuales contenidos en los cultivos celulares después del tratamiento con el antibiótico. Estudios recientemente realizados por Gnarpe et al., mostraron que *Chlamydia pneumoniae* puede quedar viable aún después del tratamiento con altas concentraciones del antibiótico indicando que, lo que pudieran ser restos de *Chlamydia pneumoniae* son , en realidad, células de *Chlamydia pneumoniae* viables (74).

Por otro lado, la eficacia de la eritromicina, un macrólido recientemente aprobado por FDA (Administración de alimentos y medicamentos), ha sido comprobada por *Chlamydia pneumoniae*, aunque su efectividad in vivo no es siempre la misma. Al respecto se hizo un estudio comparativo con la eritromicina, observándose que la actividad de la diritromicina in vitro es 32 veces menor que la actividad de la eritromicina (84).

Recurriendo una vez más a técnicas moleculares como la PCR con la que se detectaron y determinaron propiedades antigénicas de *Chlamydia pneumoniae*, se ha podido tener una idea más amplia de la susceptibilidad que presenta esta bacteria a determinados antibióticos. Se encontró entonces que la doxiciclina y la tetraciclina son los agentes más activos seguidos por la eritromicina y la ciprofloxacina.

Los aislamientos de *Chlamydia pneumoniae* son sensibles a la eritromicina y a la tetraciclina, aunque los resultados clínicos del tratamiento con estos agentes no han sido completamente evaluados. La eritromicina se evaluó junto con la claritromicina y resultaron equivalentes para erradicar a *Chlamydia pneumoniae* pero sólo del tracto respiratorio de niños (42, 87).

La actividad contra *Chlamydia pneumoniae*. Es similar, por otro lado, a la que se ha reportado para *C. Trachomatis*. Por ejemplo, particularmente la azitromicina, se ha reconocido ampliamente para el tratamiento efectivo de una infección por esta última. Se ha visto, en general, que este antibiótico no actúa directamente sobre el cuerpo elemental, sino que rápidamente inhibe la síntesis de proteínas del cuerpo reticular. Tanto la azitromicina como la claritromicina presentan una excelente penetración intracelular, especialmente en el epitelio bronquial y en los macrófagos alveolares. Ambos son muy activos contra *Chlamydia pneumoniae* in vitro (15, 87).

Inclusive se han hecho estudios que demuestran que los esteroides incrementan el crecimiento de *C. trachomatis* in vitro. Para *Chlamydia pneumoniae* se han empleado líneas celulares Hep-2 con la finalidad de observar el efecto del succinato de hidrocortisona. Los resultados de estos estudios demuestran que los esteroides ayudan al desarrollo de algunas cepas de *Chlamydia pneumoniae* en Hep-2. No se ha establecido aún el efecto dosis-respuesta. Sin embargo, con cantidades mínimas de esteroides aumenta considerablemente el desarrollo de *Chlamydia pneumoniae* aunque se desconoce cómo y dónde es que el succinato de hidrocortisona actúa. Se sugiere que esto es el resultado de cambios que se generan en el metabolismo celular de la bacteria y que influyen en el cuerpo elemental dentro de las células tratadas con cortisol (103).

Tsumura et al., observaron una situación similar con la cepa TWAR-183 de *Chlamydia pneumoniae*. Agregaron succinato de hidrocortisona 12 horas después de la inoculación observando un incremento considerable en la cuenta de inclusiones. Al parecer, se presenta una inhibición de la fusión fagolisosomal. El cortisol tiene un efecto estabilizante ante la membrana lisosomal suprimiendo, de esta manera, la liberación de partículas infecciosas, por lo tanto aumenta la cuenta de inclusiones (103).

La adición del succinato de hidrocortisona no interfiere con la infectividad de la eritromicina, azitromicina y doxiciclina contra *Chlamydia pneumoniae in vitro*.

Sin embargo, a pesar del gran número de estudios realizados en busca del o los mejores y más eficaces antibióticos contra *Chlamydia pneumoniae*, todavía no están totalmente clara la idea de cuál es el mejor para tratar una infección crónica causada por *Chlamydia pneumoniae* (95).

No obstante lo mencionado acerca de los estudios llevados a cabo por un gran número de investigadores hay muchas preguntas aún sin respuesta: ¿Cuál es la dosis idónea?. ¿Qué duración debe tener el tratamiento?, que aunque se sabe, debe ser prolongado...¿Cuán prolongado debe ser?. Aún no se sabe.

Conclusiones

1. Han surgido diversa teorías, hipótesis que tratan de explicar el papel patógeno de *Chlamydia pneumoniae* antes, durante y después del proceso ateroscleroso, sin embargo, su alta incidencia en arterias coronarias dañadas, hace pensar que verdaderamente juega un papel etiológico durante dicho proceso.
2. Existen algunos argumentos a cerca de la patogénesis de la *Chlamydia pneumoniae* en la aterosclerosis:
 - a) Se ha encontrado muy a menudo en ateromas de diferentes tipos de pacientes, por un buen número de investigadores, mediante distintas técnicas y se ha logrado aislar con éxito.
 - b) Se ha reportado serología frente a *Chlamydia pneumoniae* durante la aterosclerosis.
 - c) Las especies de *Chlamydia* se conocen bien por su capacidad de causar infecciones crónicas en animales.
 - d) *Chlamydia pneumoniae* infecta al endotelio, macrófagos, linfocitos y células del músculo liso.
3. Por su naturaleza intracelular, *Chlamydia pneumoniae* es prácticamente inaccesible al sistema inmune del hospedador, siendo por esto, que no se ha podido establecer aún su verdadero papel en el proceso de la aterosclerosis.

4. Se considera un reto la optimización de técnicas como la PCR, para que en un futuro, el examen diagnóstico para la *Chlamydia pneumoniae* pueda llevarse a cabo rutinariamente en los laboratorios.

5. Las propuestas de tratamiento antimicrobianos para las enfermedades de tipo cardíaco y respiratorio, siguen avanzando e, incluso, se tiene en mente la producción de vacunas para su prevención, pero para esto, si es que es posible, se requiere de muchos años más.

6. No obstante lo estudiado y publicado, sobre todo, las valiosas participaciones del Dr. Kuo, del Dr. Pekka, del Dr. Summersgill, entre muchos que han dedicado gran parte de su vida a estudiar a *Chlamydia pneumoniae* y su relación con las enfermedades cardiocoronarias, falta mucho más por explorar, investigar y por encontrar.

Bibliografía

1. Anestad G., O Scheel and O. Hungnes. Chronic infections and coronary heart disease. *The Lancet*. 350: 1028-1030 (1997).
2. Beatty W., G Byrne and R Morrison. Repeated and persistent infection with *Chlamydia* and the development of chronic inflammation and disease. *Trend of Microbiol.* 2(3): 94-98 (1994).
3. Belda R, A Caliz. Infección por *Chlamydia pneumoniae* asociada con anemia hemolítica autoinmune por anticuerpos calientes. *Arch Bronconeumol.* 32: 251-252 (1996).
4. Black C, J Johnson, C Farshy, T Brown and B Berdal. Antigenic variation among strains of *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 29(7): 1312-1316 (1996).
5. Blasi F, R Cossentini, R Raccaneli, F Massari, C Arosio, P Tarsia and L Allegra. A possible association of *Chlamydia pneumoniae* infection and acute myocardial infarction in patients younger than 65 years of age. *Chest* 112(2): 309-312 (1997).

6. Blasi F, F Denti, M Erba, R Cosentini, R Raccaneli, A Rinaldi L Fagetti, A Rinaldi, G Esposito, U Ruberti and L Allegra. Detection of *Chlamydia pneumoniae* but not *Helicobacter pylori* in atherosclerosis plaques of aortic aneurysms. *J Clin Microbiol.* 34(11): 2766-2769 (1996).
7. Boman J, A Allard, K Persson, M Lundborg, P Juto, and G Wadel. Rapid diagnosis of respiratory *Chlamydia pneumoniae* infection by nested touchdown polymerase chain reaction compared with culture and antigen detection by EIA. *J Inf Dis.* 175: 1523-1526 (1997).
8. Campbell L, E O'Brien, A Cappuccio, CC Kuo, SP Wang, D Stewart, D Patton, P Cummings and T Grayston. *J Inf Dis.* 172:585-588 (1995).
9. Campbell L, M Perez-Melgosa, P Hamilton, CC Kuo and T Grayston. Detection of *Chlamydia pneumoniae* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 30(2): 434-439 (1992).
10. Casadevall A. Antibody mediated protection against intracellular pathogens. *Trends in Microbiol.* 6(13): 102-107 (1998).
11. Chiu B, E Viira, W Tucker and I Fong. *Chlamydia pneumoniae*, Cytomegalovirus and Herpes simplex virus in atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation.* 96(7): 2144-2147 (1997).
12. Cles L and W Stamm. Use of HL cells for improved isolation and passage of *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 28(5): 938-940 (1990).

13. Coles A, D Reynolds, A Harper, A Devitt and J Pearce. Low nutrient induction of abnormal *Chlamydial* development: A novel component of *Chlamydial* pathogenesis? FEMS Microbiol Letters. 106: 193-200 (1993).
14. Cook P and H Bourne. *Chlamydia pneumoniae*. J Antim Chemother. 34:859-873 (1994).
15. Danesh J. Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? The Lancet 350(9075): 430-436 (1997).
16. Espino Vela
“ Introducción a la cardiología”
Primera edición
Editorial Mendez Oteo
México 1990
17. Finegold M, E Baron and L Peterson.
Bailey and Scott “Diagnostic Microbiology”
9th Edition
Mosby Year book Inc.
St Louis Missouri 1994.

18. Fong I, B Chiu, E Viira, M Fong, P Jang and J Mahony. Rabbit model for *Chlamydia pneumoniae* infection. J Clin Microbiol. 35(1): 48-52 (1997).

19. Freeman B
“Microbiología de Burrows”
22ª. Edición
Editorial Interamericana- Mc GrawHill
México 1985.

20. Friedberg C. Enfermedades del corazón
3ª. Edición
Editorial Interamericana
México 1969.

21. Garza R, E Peniche y S Manero. El diagnóstico de laboratorio de las enfermedades ocasionadas por *Chlamydia trachomatis*. LAB-acta 5(1):29-35 (1993).

22. Gaydos C, P Roblin, M Hammerschlag, C Hyman, J Eiden, J Schachter and T Quinn. Dx utility of PCR- Enzime immunoassay, culture and serology for detection of *Chlamydia pneumoniae* in symptomatic and asymptomatic patients. J Clin Microbiol. 32(4): 903-905 (1994).

23. Gaydos C, J Summersgill, N Sahney, J Ramirez and T Quinn. Replication of *Chlamydia pneumoniae* in vitro in human macrophages endothelial cells and aortic artery smooth muscle cells. Inf and Imm. 64(5): 1614-1620 (1996).

24. Gloria F, E Meaney y A Vela. The relationship between *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerotic lesions of the aorta. Arch. Inst Cardiol Mex. 67: 17-23 (1997).
25. Godzik K, E O'brien, SP Wang and CC Kuo. In vitro susceptibility of human vascular wall cells to infection with *Chlamydia pneumoniae*. J Clin Microbiol. 33(9): 2411-2414 (1995).
26. Grayston T, CC Kuo, A Coulson, L Campbell , R Lawrence, M Jong, E Strandness and SP Wang. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) in atherosclerosis of the carotid artery. Circulation. (12): 3397-3400 (1995).
27. Gupta S. *Chlamydia pneumoniae* and coronary heart disease. BMJ 1314(7097): 1778-1779 (1997).
28. Gupta S. and A Camm. Chronic infection in the etiology of atherosclerosis –the case for *Chlamydia pneumoniae*. Clin Cardiol. 20(10): 829-836 (1997).
29. Gupta S, E Leatham, D Carrington, M Mendall, J Kaski, J Camm. Elevated *Chlamydia pneumoniae* antibodies, cardiovascular events and azithromycin in male survivors of myocardial infarction. Circulation. 96(2): 404-407 (1997).
30. Gupta S and E Leatham. The relationship between *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. Heart 77(1): 7-8 (1997).

31. Hackstadt T, E Fischer, M Scidmore, D Rockey and R Heisen. Origins and functions of the *Chlamydial* inclusion. Trends on Microbiol. 5(7): 288-293 (1997).
32. Hahn D. *Chlamydia*, smoking and heart disease. Ann Int Med. 117(2): 171 (1992).
33. Herring A. The molecular biology of *Chlamydia* –a brief overview. J Infect 25. Supplement I: 1-7 (1992).
34. Herrman B, O Winqvist, J Mattsson and L Kirsebom. Differentiation of *Chlamydia* spp by sequence determination and restriction endonuclease cleavage of Range P RNA genes. J Clin Microbiol 34(8): 1897-1902 (1996).
35. Holland S, C Gaydos and C Quinn. Detection and differentiation of *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia pneumoniae* by DNA amplification. J Inf Dis. 162: 984-987 (1990).
36. Hurst W.
Heally B. El corazón, arterias y venas
3ª. Edición en español
Editorial Interamericana Mc GrawHill
México 1988

37. Iijima 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. 32(3): 583-588 (1994).
38. Jackson L. L Campbell, CC Kuo, D Rodríguez, A Lee and T Grayston. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from a carotid endarterectomy specimen. J Clin Microbiol. 176: 292-295 (1997).
39. Jantos C, S Heck, R Roggenndorf, M Sen-Gupta and J Hegemann. Antigenic and molecular analysis of different *Chlamydia pneumoniae* strains. J Clin Microbiol 35(3): 620-623 (1997).
40. Jauhiainen T, T Tuomi, M Leinonen J Kark and P Saikku. Interference of immunoglobulin G (IgG) antibodies indetermination for *Chlamydia pneumoniae* by microimmunofluorescence test. J Clin Microbiol. 32(2): 839-840 (1994).
41. Joklik W.H Willet and D Amos.
Chlamydiae
20ª Edición
Editorial Médica Panamericana
Buenos Aires 1997.
42. Juvonen J, A Laurila, T Juvonen, H Alakärppä, H Surcel, K Lounatmaa, J Kuusisto and S Pekka. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in human nonrheumatic stenotic aortic valves. J Am Clin Cardiol (JACC). 29(5): 1054-1059 (1997).

43. Kazuyama Y, S Lee, K Amamiya and F Tagucgi. A novel method for isolation of *Chlamydia pneumoniae* by treatment with trypsin or EDTA. J Clin Microbiol. 35(6): 1624-1626 (1997).
44. Khan M, C Potter and R Sharrard. A reverse transcriptase- PCR based assay for in vitro antibiotic susceptibility testing of *Chlamydia pneumoniae*. J Antim Chemother. 37(4): 677-685 (1996).
45. Knoebel E, P Vijayagopal, J Figueroa II and D Martin. In vitro infection of smooth muscle cells by *Chlamydia pneumoniae*. Inf and Imm. 65(2): 503-506 (1997).
46. Krieg N and Holt J.
Bergey's Manual of systematic Bacteriology
Williams and Williams Press
USA 1984
47. Kuo CC and T Grayston. A sensitive cell line, HL cells for isolation and propagation of *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. J Inf Dis. 162: 755-758 (1990).
48. Kuo CC, T Grayston, L Campbell, Y Goo, R Wissler and E Benditt. *Chlamydia pneumoniae* TWAR in coronary arteries of young adults (15-34 years old). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6911-6914 (1995).

49. Kuo CC, L Jackson, L Campbell and T Grayston. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). Clin. Microbiol. Reviews 8(4): 451-461 (1995).
50. Kuo CC, A Shor, L Campbell, H Fukushi, D Patton and T Grayston. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerosis lesions of coronary arteries. J Inf Dis. 167: 841-849 (1993).
51. Laitinen K, A Laurila, M Leinonen and S Pekka. Reactivation of *Chlamydia pneumoniae* infection in mice by cortisona treatment. Inf and IMM. 64(4): 1488-1490 (1996).
52. Laitinen K, A Laurila, L Pyhäälä, M Leinonen and S Pekka. *Chlamydia pneumoniae* infection induces inflammatory changes in the aortas of rabbits. Inf and IMM 65(11): 4832-4835 (1997).
53. Laurila A, A Blołgy, S Näyhä, J Hassi, M Leinonen and S Pekka. *Chlamydia pneumoniae* antibodies and serum lipids in Finnish men: cross sectional study. BMJ. 314(7092): 1456-1457 (1997).
54. Linnanmäki E, M Leinonen, K Mattila, S Nieminen, V Valtonen and S Pekka. *Chlamydia pneumoniae* specific circulating immune complexes in patients with chronic coronary heart disease. Circulation. 87(4): 1130-1134 (1993).
55. Lopes- Virella M and G Virella. Immunological and microbiological factor in the pathogenesis of atherosclerosis. Clin Imm and Immunopathol. 37: 377-386 (1985).

56. Lucáková M, M Baumann , L Brade, U Mamat and H Brade. Lipopolysaccharide smooth-rough phase variation in bacteria of the genus *Chlamydia*. Inf and IMM. 62(2): 2270-2276 (1994).
57. Maas M and K Dalhoff. Transport and storage conditions of cultural recovery of *Chlamydia pneumoniae*. J Clin Microbiol. 33(7): 1793-1796 (1995).
58. Maas M, A Essig, R Marre and W Henkel. Growth in serum-free medium improves isolation of *Chlamydia pneumoniae*. J Clin Microbiol. 31(11): 3050-302 (1993).
59. Marrie T. *Chlamydia pneumoniae*. Thorax. Editorials 48:1 (1993).
60. Maurin M, F Etienne and D Raoult. Serological cross-reactions between Bartonella and *Chlamydia* species: implications for diagnosis. J Clin Microbiol. 35(9): 2283-2287 (1997).
61. McClarty G. *Chlamydiae* and the biochemistry of intracellular parasitism. Trends on Microbiol. 2(5): 157-163 (1994).
62. Meijer A, G Kwakkel, A de Vries, L Schouls and J Ossenwaarde. Species identification of *Chlamydia pneumoniae* isolates by analyzing restriction fragment length polymorphism of the 16s-23s rRNA spacer region. J Clin Microbiol. 35(5): 1179-1183 (1997).

63. Melnik S, E Shahar and A Folsom. Past infection by *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR and asymptomatic carotid atherosclerosis. Atherosclerosis risk in communities (ARIC) study investigators. Am. J. Med. 95(5): 499-504 (1993).
64. Mendall M, P Patel, L Ballam, D Strachan and T Norhfield. C reactive protein and its relation to cardiovascular risk factors: a population based cross sectional study. BMJ 312(7038): 1061-1065 (1996).
65. Miyashita N, Y Niki, T Kishimoto, M Nakajima and T Matsushima. In vitro and in vivo activities of AM-155 a new fluoroquinolone, against *Chlamydia* spa. Antim Agent Chemother. 41(6): 1331-1334 (1997).
66. Moazed T, CC Kuo, T Grayston and L Campbell. Murine models of *Chlamydia pneumoniae* infection and atherosclerosis. J Inf Dis. 175(4):883-890 (1997).
67. Montalban G, P Roblin, and M Hammerschlag. Performance of three commercially available monoclonal reagents for confirmation of *Chlamydia pneumoniae* in cell culture. J Clin Microbiol. 32(5): 1406-1407 (1994).
68. Muhlestein J. The link between *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. Infect Med 14(5): 380-382, 392,426 (1997).

69. Muhlestein J, E Hammond, J Carlquist, E Radicke, M Thompson, L Karagounis, M Woods and J Anderson. Increased incidence of *Chlamydia* species within the coronary arteries of patients with symptomatic atherosclerosis versus other forms of cardiovascular disease. *JACC* 27: 1555-1561 (1996).
70. Naidu B, Y Ngeow, P Jewyamalar, A Khir, K Khoo and T Pang. Evidence of *Chlamydia pneumoniae* infection obtained by the PCR in patients with acute myocardial infarction and coronary heart disease. *J Infect* 35(2): 199-200 (1997).
71. Numazaki K, S Tauzeeh and D Taylor-Robinson. *Chlamydia pneumoniae* infection and coronary heart disease. *BMJ* 315(7121):1538-1539 (1997).
72. Nyström-Rosander C, K Hultén, I Gustavsson, O Cars, L Engstrand and E Hjelm. Susceptibility of *Chlamydia pneumoniae* to azythromicine and doxycycline: methodological aspects on the determination of minimal inhibitory and bactericidal concentrations. *Scand J Infect Dis.* 29:513-516 (1997).
73. Nyström-Rosander C, S Thelin, E Hjelm, O Lindquist, C Pahlson and G Friman. High incidence of *Chlamydia pneumoniae* in sclerotic heart valves of patients undergoing aortic valve replacement. *Scan J Infect Dis* 29(4):361-365 (1997).
74. Ostergaard L and J Moller. Use of PCR and direct immunofluorescence microscopy for confirmation of results obtained by Syva Microtak *Chlamydia* enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol.* 33(10): 2620-2623 (1995).

75. Patel P, M Mendall, D Carrington, P Strachan, E Leatham, N Molineaux, J Levy, C Blakeston, C Seymour, A Camm and T Northfield. Association of *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* infections with coronary heart disease and cardiovascular risk factors. *BMJ* 311(7007): 711-714 (1995).
76. Patel P, C Carrington, D Strachan, E Leatham, P Goggin, T Northfield and M Mendall. Fibrinogen: a link between chronic infection and coronary heart disease. *The Lancet*. 343(8913): 1634-1635 (1994).
77. Pearce J, H Gaston, K Deane, A Devitt, A Harper and R Jecock. 'Persistent forms and persistence of *Chlamydia*. *Trends on Microbiol*. 2(7): 257-258. *Letters* (1994).
78. Perez Melgosa M, CC Kuo and L Campbell. Outer membrane complex proteins of *Chlamydia pneumoniae*. *FEMS Microbiol Letters* 112: 199-200 (1993).
79. Peterson E, X Cheng, Z Qu and L De la Maza. Characterization of the murine antibody response to peptides representing the variable domains of the MOMP of *Chlamydia pneumoniae*. *Inf and Imm*. 64(8): 3354-3359 (1996).
80. Popov V, A Shatkiu, V Pankratova, N Smirnova, C-H Von Bonsdorff, M Ekman, A Mörntinen and S Pekka. Ultrastructure of *Chlamydia pneumoniae* in cell culture. *FEMS Microbiol Letters*. 84:129-134 (1991).

81. Poulakkainen M, CC Kuo, A Shor, SP Wang, T Grayston and L Campbell. Serological response to *Chlamydia pneumoniae* in adults with coronary arterial fatty streaks and fibrolipid plaques. *J Clin Microbiol* 31(8): 2212-2214 (1993).
82. Ramirez J. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from the coronary artery of a patient with coronary atherosclerosis. *Ann Intern Med* 125(12): 979-982 (1996).
83. Robbins S
“Patología estructural y funcional”
3ª. Edición
Editorial Interamericana
México 1987
84. Roblin P, W Dumornay and M Hammerschlag. Use of Hep-2 cells for improved and isolation and passage of *Chlamydia pneumoniae*. *J Clinical Microbiol.* 30(8): 1968-1971 (1992).
85. Roblin P, A Kutlin, N Sokolovskaya and M Hammerschlag. In vitro activity of diritromycin against *Chlamydia pneumoniae*. *J Antim Chemother (JAC)* 39: 647-649 (1997).
86. Saikku P, M Leinonen, L Tenkanen, E Linnanmäki, M Ekman, V Manninen, M Mänttari, M Frick and J Huttunen. Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *Ann Intern Med.* 116(4): 273-278 (1992).

87. Saikku P, S Mattilak, M Nieminen, V. Valtonen, J. Huttunen, M. Leinonen, M. Ekman and P Mäkelä. Serological evidence of an association of a novel *Chlamydia* TWAR with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. The Lancet. “. 983-986 (1998).
88. Schaechter R
“Mecanismos de las enfermedades infecciosas”
2ª. Edición
Editorial Médica Panamericana
Argentina 1994
89. Shapiro M.
Infarto agudo al miocardio
5ª. Reimpresión
Compañía Editorial Continental SA de CV
90. Shor A., Kuo CC. and Patton D. Detection of *Chlamydiae* in coronary arterial fatty streaks and atheroma plaques. S Afri Med J. 82: 158-161 (1992).
91. Sokolow M.
Cardiología clínica
El Manual Moderno SA de CV
3ª. Edición México 1998

92. Stiegler H., S.Kolbe- Bush, Y. Fischer, M Leschke and H Reinauer. Antibodies to Citomegalovirus on *Chlamydia pneumoniae* and coronary heart disease. The Lancet. 351(9096): 143 (1998).
93. Stilew L., R. Dittman and G Nubling. Atherosclerosis to chronic arteritis caused by *Chlamydia tentative* hypothesis. Infection. 25(5): 281-285 (1997).
94. Stites
Inmunología básica y Clínica.
8ª. Edición
El Manual Moderno. México 1996
95. Taylor R. *Chlamydia pneumoniae* in arteries: A tale of the unexpected. J Infect. 35(2): 97-98 (1997).
96. Taylor R and B. Thomas. Antibodies to Cytomegalovirus or *Chlamydia pneumoniae* and coronary heart disease. The Lancet. 351(9096): 142 (1998).
97. Thomas N., M. Lusher, C. Shorey and I. Clarke. Plasmid diversity in *Chlamydia*. Microbiology. 143: 1847-1854 (1997).
98. Thom H., J. Thomas, S. Siscovich, SP Wang, N. Weiss and J Daling. Association of prior infection with *Chlamydia* and Angiography demonstrated coronary artery disease. Jama. 268(1): 68-72 (1992).

Bibliografia

99. Tjhie J., R. Roosendaal, D. Maclaren, M Cristina and G. Vandenbroeke. Improvement of growth oh *Chlamydia* on Hep-2 cells by treatment with polyethylene glycol in combination with additional centrifugation and extension of culture time. J Clin Microbiol. 35(7): 1883-1884 (1997).
100. Tsumura N., U. Emre, P Roblin and M Hammerschlag. Effect of hydrocortisone succinate on grown of *Chlamydia* in vitro. J Clin Microbiol. 34(10): 2379-2381 (1996).
101. Wagels G., S. Rasmunssen and P. Timms. Comparison of *Chlamydia* isolates by Western blot analysis and ADN sequencing of the omp 2 gene. J Clin Microbiol. 32(11): 2820-2823 (1994).
102. Wang SP. And T Grayston. *Chlamydia* elementary body antigenic reactivity with fluorescent antibody is destroyed by methanol. J Clin Microbiol. 29(7): 1539-1541 (1991).
103. Ward M. *Chlamydia* vaccines future trends. J Infect. 25 Supp I :11-14 (1992).
104. Watson M., I. Clarke, J Eversen and P Lamden. The Crp operon of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia pneumoniae*. Microbiology. 141: 2489-2497 (1995).
105. Weiss S., P. Roblin, Ch. Gaydos, N. Schulhoff, J Shani, R. Frankel, K. Penney, T Quinn, M Hammerschlag. Failure to detect *Chlamydia* in coronary

- atheromas of patients undergoing atherectomy. *J Infect Dis.* 173(4): 957-962 (1997).
106. Wiederman A., P Schyessle and H. Feidank. Reactions of polyclonal neutralizing anti-p 54 monoclonal wit an isolated, specific 54- kDa proteins of *Chlamydia*. *Inf and Imm.* 4(6): 700-704 (1997).
107. Wong K., S Skelton and Y Chan. Efficient culture of *Chlamydia* with cell lines derived from the human respiratory tract. *J Clin Microbiol.* 30(7): 31625-1630 (1992).
108. Yea C., D Kim, K Kyung, k. Oak, P. Soo and J Ro. Prevalence of specific antibodies to *Chlamydia* in Korea. *J Clin Microbiol.* 36(11): 3426-3428 (1998).