

Prevalencia de *Chlamydia Pneumoniae* y *Mycoplasma Pneumoniae* en Diferentes Formas de la Enfermedad Coronaria

Irineu Luiz Maia^{1,2}, José Carlos Nicolau³, Maurício de Nassau Machado^{1,2}, Lília Nigro Maia^{1,2}, Isabela Thomaz Takakura², Paulo Ricardo de Fernando Rocha², José Antônio Cordeiro¹, José Antônio Franchini Ramires³

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (Famerp)¹, Hospital de Base de São José do Rio Preto², Instituto do Coração - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor - USP)³, São José do Rio Preto, SP; São Paulo, SP - Brasil

Resumen

Fundamento: Se han investigado diversos agentes infecciosos desde que se evidenció la asociación entre infección y aterosclerosis, sin embargo esos estudios ofrecen resultados conflictivos.

Objetivo: Probar la asociación entre títulos séricos de anticuerpos anti-*Chlamydia* y anti-*Mycoplasma* en diferentes formas de síndromes coronarios agudos (SCA).

Métodos: Se dividieron a 126 pacientes en 4 grupos: SCA con elevación del segmento ST (32 pacientes), SCA sin elevación del segmento ST (30 pacientes), enfermedad arterial coronaria crónica (30 pacientes) y donadores de sangre sin enfermedad coronaria conocida (34 pacientes - grupo-control). En los primeros dos grupos, muestras de suero se colectaron al ingreso (primeras 24 horas de hospitalización) y tras 6 meses de seguimiento. En los otros dos grupos, se colectó solamente una muestra basal. En todas las muestras, se dosificaron anticuerpos IgG anti-*Chlamydia* y anti-*Mycoplasma* por inmunofluorescencia indirecta.

Resultados: Se observaron diferencias significativas entre la medida basal y tras 6 meses de seguimiento en los pacientes con infarto de miocardio con elevación del segmento ST, tanto para *Chlamydia* ($650 \pm 115,7$ vs $307 \pm 47,5$, $p = 0,0001$) como para *Mycoplasma* ($36,5 \pm 5,0$ vs $21,5 \pm 3,5$, $p = 0,0004$). Los grupos con SCA tuvieron niveles séricos de anticuerpos anti-*Chlamydia* y anti-*Mycoplasma* más altos en la dosificación basal, con relación a los pacientes con enfermedad arterial coronaria crónica y grupo-control, sin embargo las diferencias obtenidas no tuvieron significancia estadística.

Conclusión: El presente estudio reveló asociación entre los títulos de anticuerpos anti-*Chlamydia* y anti-*Mycoplasma* en la fase aguda de los pacientes con angina inestable o infarto de miocardio (ClinicalTrials.gov - NCT00561028). (Arq Bras Cardiol 2009;92(6):422-428)

Palabras clave: *Chlamydia pneumoniae*, *mycoplasma pneumoniae*, aterosclerosis, enfermedad de la arteria coronaria.

Introducción

Desde 1978, cuando se evidenció por primera vez la asociación entre infección y aterosclerosis¹, se han investigado diversos agentes infecciosos². Entre esos, es la *Chlamydia pneumoniae* (Cp) que presenta mayores evidencias en cuanto a su participación en la enfermedad aterosclerótica estable, en el infarto agudo de miocardio (IAM) y en el accidente cerebrovascular (ACV)³⁻⁷.

Sin embargo, los resultados contradictorios de los estudios que probaron los efectos de antibióticos anti-Cp en la

reducción de eventos cardiovasculares pusieron en duda la participación de infección y, más específicamente, de la Cp en la enfermedad aterosclerótica.

En 2000, Higuchi et al^{8,9}, en estudio de piezas de necropsia, además de confirmar un alta cantidad de células infectadas por la Cp en placas ateroscleróticas rotas, fueron los primeros a evidenciar la presencia de un otro agente infeccioso en el local, posteriormente identificado como *Mycoplasma pneumoniae* (Mp)^{8,9}.

Ese agente infeccioso se comporta como superantígeno y necesita del colesterol para sobrevivir, una vez que su membrana se constituye de esa sustancia¹⁰. Desde el punto de vista fisiopatológico, una hipótesis atrayente sería la de que el Mp funcionaría como un "gatillo" para la activación de la Cp, promoviendo así la inestabilidad de la placa aterosclerótica coronaria.

Se planificó ese estudio-piloto para evaluar, por medio

Correspondencia: Irineu Luiz Maia •

Rua Raul de Carvalho 3862, Alto Rio Preto, 15020-020, São José do Rio Preto, SP - Brasil

E-mail: maia@famerp.com.br

Artículo recibido el 16/11/07; revisado recibido el 06/05/08; aceptado el 30/05/08.

de investigación serológica, el rol de esos dos agentes bacterianos en el desencadenamiento de eventos isquémicos coronarios agudos.

Métodos

Diseño del estudio

El Comité de Ética en Investigación local aprobó este estudio y todos los pacientes firmaron el formulario de consentimiento informado.

En el período de marzo de 2002 a noviembre de 2004, se incluyeron de forma prospectiva a 138 pacientes, de ellos:

a) 34 pacientes eran portadores de IAM con supradesnivel del segmento ST (edad promedio de $55,1 \pm 1,7$ años, con un 73,5% del sexo masculino);

b) 40 pacientes eran portadores de angina inestable o IAM sin supradesnivel del segmento ST (edad promedio de $60,1 \pm 2,1$ años, con un 52,5% del sexo masculino);

c) 30 pacientes eran portadores de aterosclerosis crónica, asintomáticos o portadores de angina estable (edad promedio de $65,9 \pm 2,0$ años, con un 63,3% del sexo masculino);

d) 34 individuos no tenían enfermedad coronaria conocida, eran donadores de sangre (edad promedio de $42,5 \pm 1,2$ años, con un 64,7% del sexo masculino).

Objetivo primario

El objetivo principal del estudio fue probar la asociación entre títulos serológicos de anticuerpos anti-*Chlamydia pneumoniae* y anti-*Mycoplasma pneumoniae* (anti-Cp y anti-Mp) y síndromes isquémicos miocárdicos inestables (SIMI).

Criterios de inclusión

Se incluyeron a pacientes de ambos sexos con edad superior a 18 años, tras firmar el formulario de consentimiento informado. Los diferentes grupos se definieron de la forma que sigue a continuación:

a) SIMI con supradesnivel del segmento ST

Pacientes que presentaban dolor con características anginosas ≤ 24 horas de evolución, que completan al menos dos de los siguientes criterios de IAM:

- *Clínicos* - Dolor retroesternal de fuerte intensidad y carácter opresivo, duración superior a 20 minutos, que no cedió con el uso de nitratos.

- *Electrocardiográficos* - Supradesnivel del segmento ST ≥ 1 mm en al menos dos derivaciones periféricas y/o supradesnivel del segmento ST ≥ 2 mm en al menos dos derivaciones consecutivas precordiales y/o presencia de bloqueo de rama izquierda.

- *Marcadores de necrosis miocárdica* - Elevación de al menos dos veces en relación a los valores normales de la CKMB actividad (normal hasta 25 U/l) y/o troponina T (normal hasta 0,010 ng/ml).

b) SIMI sin supradesnivel del segmento ST

Pacientes que presentaban dolor con características anginosas ≤ 24 horas de evolución, con (IAM sin supradesnivel del segmento ST) o sin (angina inestable) elevación de los biomarcadores de necrosis miocárdica (CKMB y/o troponina T). En ese grupo, se seleccionaron solamente a pacientes de alto riesgo, de acuerdo con la clasificación de la Sociedad Brasileña de Cardiología (SBC) ¹¹.

- Edad > 75 años.
- Dolor progresivo síntomas en las últimas 48 horas.
- Dolor prolongado (> 20 min), en reposo.
- Edema pulmonar, empeoramiento o surgimiento de soplo de regurgitación mitral, B3, hipotensión, bradicardia y taquicardia.
- Infradesnivel del segmento ST $\geq 0,5$ mm (asociado o no a angina), alteración dinámica del ST, bloqueo completo de rama, nuevo o presumidamente nuevo. Taquicardia ventricular sostenida.
- Marcadores de isquemia acentuadamente elevados ($>$ percentil 99).

c) Grupo aterosclerosis crónica

Pacientes con enfermedad aterosclerótica coronaria crónica asintomática o con angina estable. La presencia de la enfermedad se definió por los siguientes criterios:

- IAM previo; y/o
- Revascularización quirúrgica del miocardio previa; y/o
- Intervención coronaria percutánea previa; y/o
- Cineangiografía previa evidenciando lesiones obstructivas de arterias coronarias.

d) Grupo-control

Individuos seleccionados de modo aleatorio, a partir de los donadores de sangre del Hospital de Base, y que negaban la presencia de cualquier enfermedad aterosclerótica conocida.

Criterios de exclusión

Se excluyeron a los pacientes que presentaron al menos uno de los siguientes criterios:

- Dificultad de comprensión del formulario de consentimiento informado;
- Rechazo a firmar el formulario de consentimiento informado;
- Imposibilidad de regresar al seguimiento del estudio;
- Edad inferior a 18 años;
- Tiempo de evolución > 24 horas;
- Infección activa;
- Uso de antimicrobianos en los últimos 30 días;
- Enfermedades terminales.

Artículo Original

Metodología de la colecta sanguínea

En los grupos portadores de SIMI con y sin supradesnivel ST, se colectaron muestras sanguíneas en dos ocasiones, la primera durante el evento agudo y la segunda tras 6 meses. En los otros dos grupos (aterosclerosis crónica y control), se colectaron dichas muestras solamente una vez. Como la vida media de los anticuerpos de la clase IgG es de 30 días, la colecta tras 6 meses del evento agudo buscó reflejar los valores basales de una persona infectada crónicamente, tanto por la Cp como por el Mp.

En todas las muestras, se dosificaron los títulos de anticuerpos anti-Cp y anti-Mp de la clase IgG con los resultados expresados por el mayor valor de la dilución en que la reacción fue positiva.

Análisis laboratoriales

Las pruebas serológicas se llevaron a cabo por un único y experimentado examinador, de forma ciega, además de emplearse la técnica de inmunofluorescencia indirecta¹².

Análisis estadístico

Los datos categóricos están detallados en números absolutos y porcentajes, y las variables continuas en promedio \pm error estándar (EE) para una mejor aclaración. Las variables continuas no tuvieron distribución gaussiana y se evaluaron por pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis y Wilcoxon)¹³. Gráficos *Box Plot* están presentados en mediana e intercuartiles. Valores $p < 0,05$ se consideraron como estadísticamente significativos (a dos colas). El software utilizado para el análisis estadístico fue el StatsDirect Statistics Software v. 2.6.5.

Resultados

El tamaño de la muestra recomendado fue de 30 pacientes por grupo, totalizando 120 pacientes.

En el transcurrir del estudio, 8 pacientes fallecieron, con 2 del grupo SIMI con supra ST y 6 del grupo SIMI sin supra ST. Cuatro pacientes del grupo SIMI sin supra ST no comparecieron a los regresos pre agendados y tras varias tentativas mal sucedidas de contacto, se les consideraron como pérdida de seguimiento, y, por lo tanto, en esos casos, no fue posible colectar la segunda serología.

Esas pérdidas se las remplazaron, con la inclusión de un total de 138 pacientes: 34 en el grupo SIMI con supra ST; 40 pacientes en el grupo SIMI sin supra ST; 30 pacientes en el grupo aterosclerosis crónica y 34 individuos en el grupo-control. Solamente se incluyeron en todos los análisis realizados en el estudio a los pacientes que realizaron todas las serologías planificadas para su grupo.

Características clínicas de los pacientes

En la Tabla 1, están relacionadas las características clínicas de los 126 pacientes que realizaron todas las serologías planificadas.

Vale destacar el alta prevalencia de factores de riesgo encontrados en el grupo aterosclerosis crónica (un 83,3% eran hipertensos, un 53,3% tabaquistas y el 90% dislipidémicos).

Comparación entre las serologías obtenidas al ingreso y tras 6 meses de la internación en los grupos con y sin supradesnivel del segmento ST

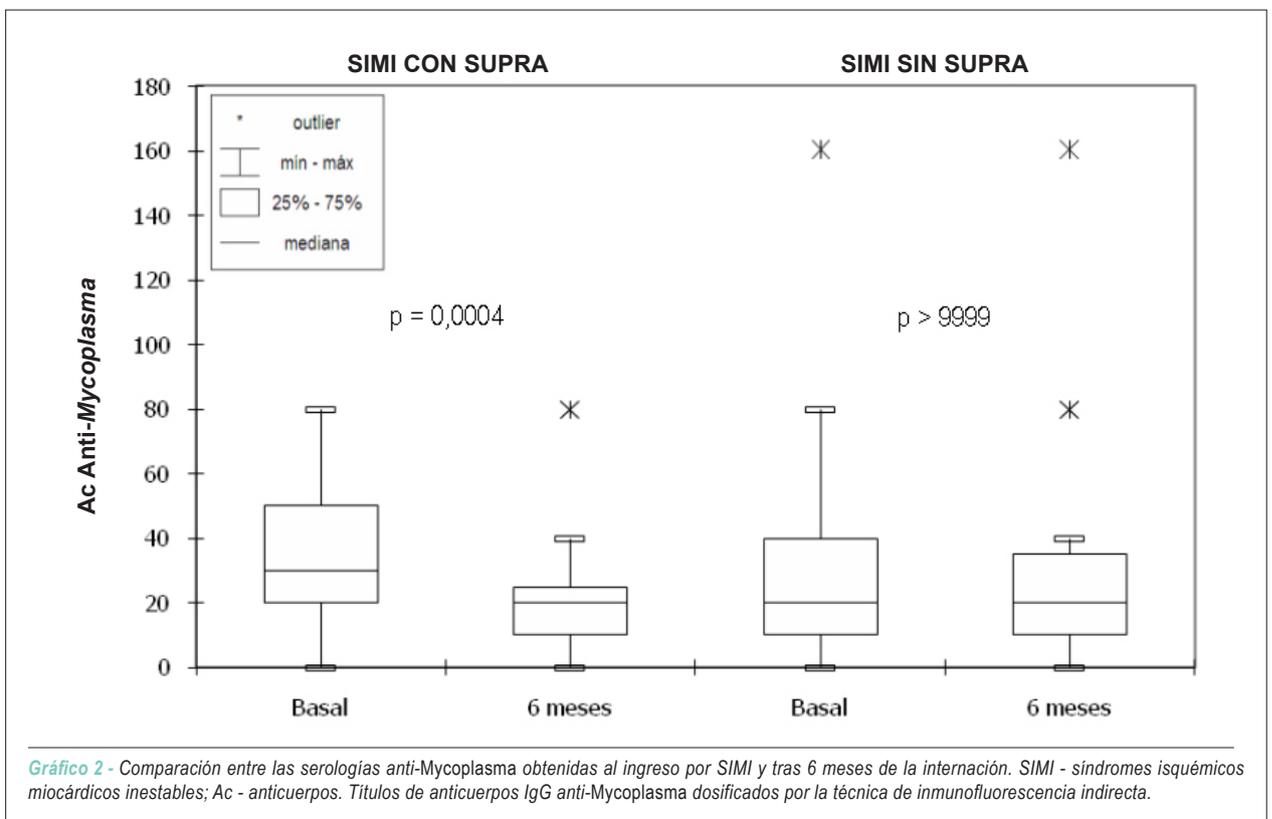
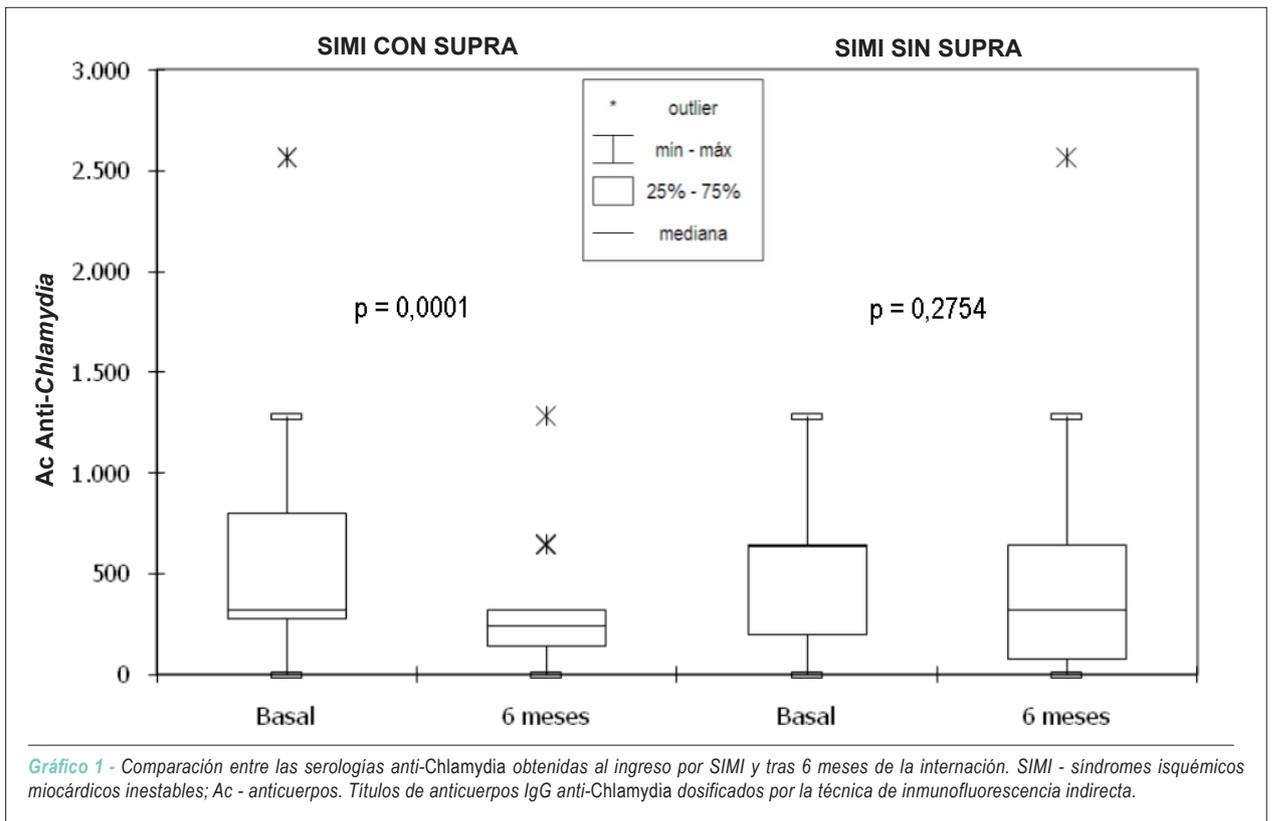
En los gráficos 1 y 2, se evidenciaron los valores serológicos colectados en la fase aguda del evento coronario y tras 6 meses, en los grupos con y sin supradesnivel del segmento ST, con ese análisis el objetivo principal del estudio.

Los pacientes portadores de SIMI con supra presentaron significativa reducción de los títulos serológicos en las colectas realizadas tras 6 meses de la internación, tanto en relación con la Cp ($p = 0,0001$) como con relación a la Mp ($p = 0,0004$).

Tabla 1 – Características clínicas de la población (126 pacientes)

Características clínicas n (%)	SIMI con supra ST (n = 32)	SIMI sin supra ST (n = 30)	EAC estable (n = 30)	Control (n = 34)	Valor p
Edad (promedio \pm EE)	55,1 \pm 1,7	60,1 \pm 2,1	65,9 \pm 2,0	42,5 \pm 1,2	< 0,0001
Varones	24 (75)	17 (56,7)	19 (63,3)	22 (64,7)	0,5007
Historia de hipertensión	15 (46,9)	22 (73,3)	25 (83,3)	N/A	0,0065
Historia de diabetes	4 (12,5)	6 (20,0)	5 (16,7)	N/A	0,7252
Tabaquismo	22 (68,7)	11 (36,7)	16 (53,3)	N/A	0,0407
Angina previa	15 (46,9)	21 (70,0)	8 (26,7)	N/A	0,0035
IAM previo	7 (21,9)	10 (33,3)	20 (66,7)	N/A	0,001
Historia familiar de EAC	14 (43,7)	13 (43,3)	17 (56,7)	N/A	0,4977
Dislipidemia	12 (37,5)	10 (33,3)	27 (90,9)	N/A	< 0,0001
Uso previo de estatinas	4 (12,5)	3 (10,0)	24 (80,8)	N/A	< 0,0001
ICP previa	3 (9,4)	3 (10,0)	8 (26,7)	N/A	0,104
RM previa	2 (6,2)	3 (10,0)	14 (46,7)	N/A	< 0,0001

SIMI - síndromes isquémicos miocárdicos inestables; EAC - enfermedad arterial coronaria; EE - error estándar; IAM - infarto agudo de miocardio; ICP - intervención coronaria percutánea; RM - revascularización del miocardio.



Artículo Original

No se observó igual comportamiento serológico en el grupo sin supradesnivel del segmento ST, tanto para la Cp como para el Mp ($p = 0,27$ y $0,99$, respectivamente).

Comparación entre los valores serológicos realizados al inicio del estudio

Los gráficos 3 y 4 comparan las diferencias serológicas entre los diferentes grupos analizados (primera muestra serológica).

Se puede notar, en los grupos que presentaron isquemia miocárdica aguda (SIMI con y sin supra ST), valores serológicos más elevados comparados a los grupos que no tuvieron evento agudo (aterosclerosis crónica y control), tanto en lo que toca a la Cp como al Mp, aunque esas diferencias no hayan alcanzado significancia estadística.

Discusión

El presente estudio fue motivado por la necesidad de se evaluar, clínicamente, la presencia concomitante del *Mycoplasma pneumoniae* y de la *Chlamydia pneumoniae* en lesiones ateromatosas coronarias, descrita previamente por Higuchi et al⁹ en hallazgos de necropsia.

La *Chlamydia*, el *Mycoplasma* y otros agentes causadores de infecciones respiratorias agudas son patógenos de alta prevalencia, de forma que, desde la edad adulta, la mayoría de la población ya presenta anticuerpos en las evaluaciones seroepidemiológicas. Por esa razón, no se llevó a cabo el

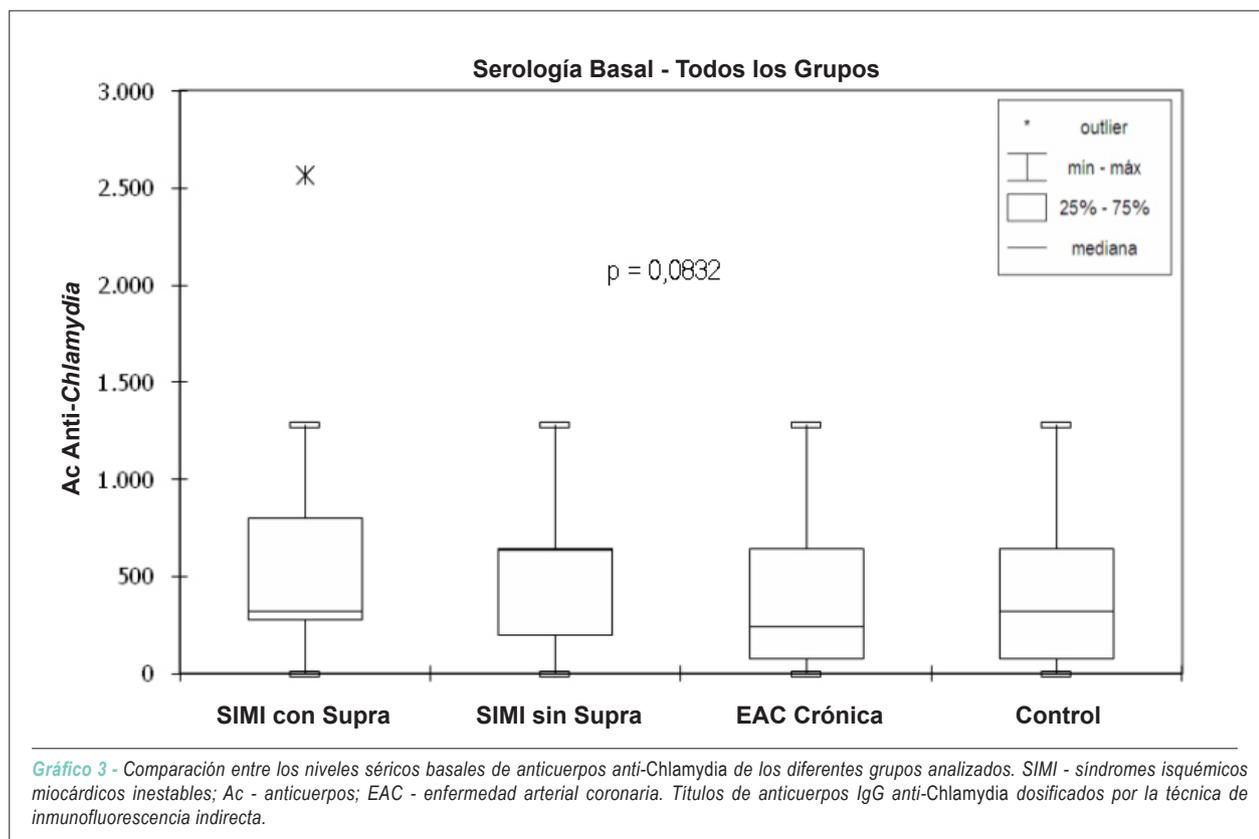
emparejamiento para edad en el grupo-control, ya que, en la edad adulta, se admite no existir relación entre los valores serológicos y el grupo de edad. De esa manera, al elegirse a los individuos más jóvenes para este grupo (donadores de sangre), se reduzo también la posibilidad de enfermedad arterial coronaria clínicamente no-detectable.

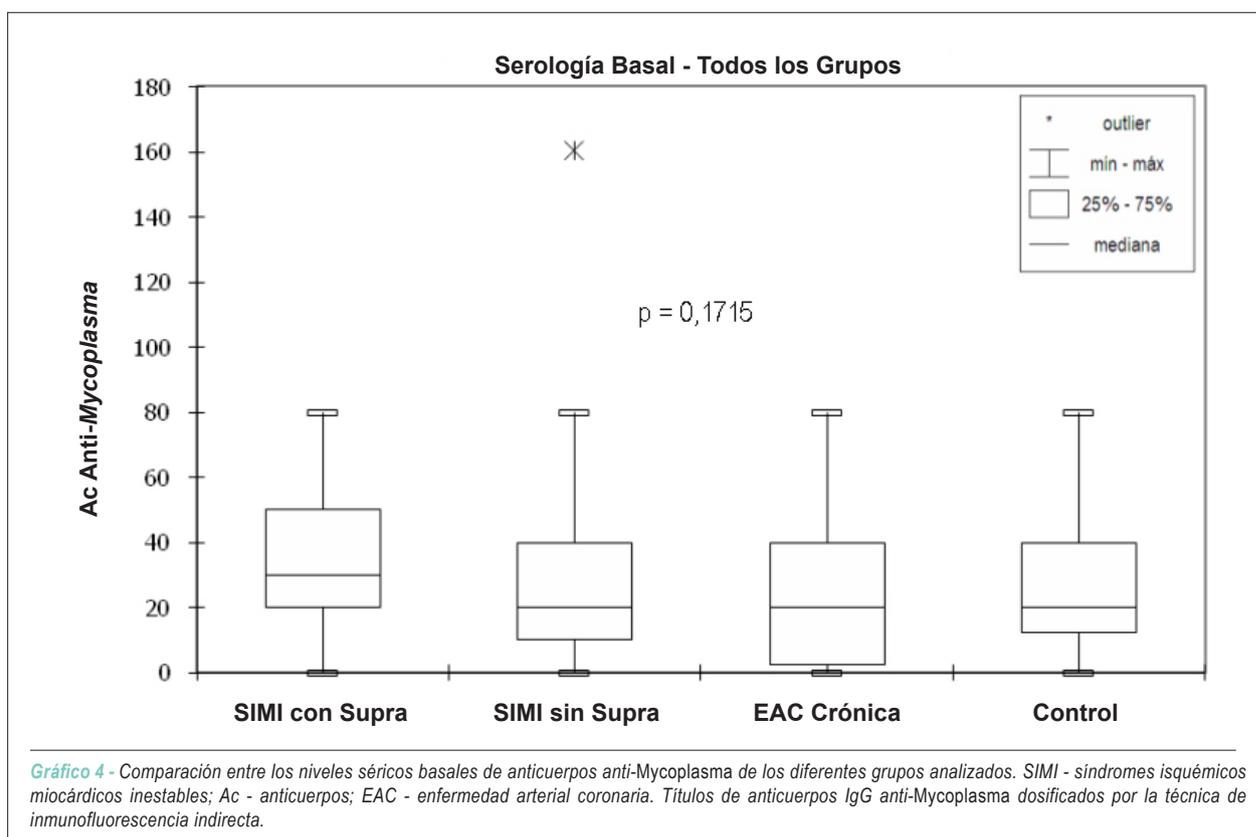
Se optó por la inmunoglobulina de la clase IgG porque ésta tiene promedio de vida de 20 a 30 días y es el anticuerpo (Ac) que mejor expresa la actividad del proceso infeccioso, en consecuencia de reinfecciones previas¹⁴.

En los gráficos 1 y 2, se observa, en los pacientes que presentaron SIMI con supra, una reducción significativa de los títulos de los Ac anti-Cp y anti-Mp. Esa reducción sugiere fuertemente que la *Chlamydia* y el *Mycoplasma* presentes en la placa aterosclerótica estuvieron en actividad, una vez que sería extremadamente improbable que tuviera ocurrido reinfección simultánea por los dos agentes.

Se podría especular que la propia coinfección de la placa aterosclerótica podría haber sido el "gatillo" que indujo esos dos agentes a entrar en actividad, desencadenando la cascada inflamatoria que, a su vez, conllevaría el evento coronario agudo.

En el grupo sin supra, se observó sólo una discreta reducción no significativa de los niveles serológicos anti-Cp, con valores prácticamente idénticos con relación al Mp. Esos hallazgos sugieren que, en esta forma de SIMI, ocurriría una reactivación infecciosa de menor intensidad, resultando un menor daño de la placa aterosclerótica.





Cuando comparados los cuatro grupos entre sí, utilizándose las muestras colectadas en la primera fase del estudio, se observaron valores serológicos más elevados en los grupos que presentaron evento coronario agudo respecto a los otros dos grupos (aterosclerosis crónica y control, tanto en relación con el Ac anti-Cp como el anti-Mp). Sin embargo, las diferencias encontradas no alcanzaron significancia estadística.

Tampoco se observaron diferencias significativas de los niveles serológicos entre los grupos aterosclerosis crónica y control, tanto para *Chlamydia* como para *Mycoplasma*. Esos datos sugieren que la participación del proceso infeccioso podría estar restringida sólo a los mecanismos de inestabilidad de la placa. Por fin, se evidencian resultados semejantes entre los valores serológicos encontrados en los grupos control y la aterosclerosis crónica; sin embargo, no se puede descartar la posibilidad (a nuestro ver, remota) de que eso haya ocurrido porque el grupo-control ya estaría con un proceso aterosclerótico en marcha.

La comparación entre los resultados del presente estudio y los demás estudios seroepidemiológicos se vuelve difícil, una vez que hay importantes diferencias metodológicas entre ellos. La gran mayoría de esos estudios fue retrospectiva^{3,5,15-17} y los pocos estudios prospectivos utilizaron variadas técnicas de dosificación de Ac y distintos criterios para positividad serológica^{4,6,18}.

Algunos de esos estudios revelaron que un alta carga de

patógenos, al actuar simultáneamente en un mismo individuo, podría exacerbar el proceso aterosclerótico^{19,20}, lo que contradice los hallazgos del presente estudio.

Conclusiones

El presente estudio evidencia la asociación entre títulos de anticuerpos anti-Cp y de anti-Mp y enfermedad coronaria aguda. Revela aún la normalización de aquellos títulos en un período de hasta 6 meses, desde la inestabilidad clínica del paciente.

Potencial Conflicto de Intereses

Declaro no haber conflicto de intereses pertinentes.

Fuentes de Financiación

El presente estudio fue parcialmente financiado por FINEP/Petrobras/CNPQ.

Vinculación Académica

Este artículo forma parte de tesis de doctorado de Irineu Luiz Maia, por el Instituto do Coração, Facultad de Medicina de la Universidad de São Paulo y Facultad de Medicina de São José do Rio Preto.

Referencias

1. Fabricant CG, Fabricant J, Litrenta MM, Minick CR. Virus-induced atherosclerosis. *J Exp Med.* 1978; 148 (1): 335-40.
2. Libby P, Egan D, Skarlatos S. Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research. *Circulation.* 1997; 96 (11): 4095-103.
3. Saikku P, Leinonen M, Mattila K, Ekman MR, Nieminen MS, Mäkelä PH, et al. Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet.* 1988; 2 (8618): 983-6.
4. Saikku P, Leinonen M, Tenkanen L, Linnanmäki E, Ekman MR, Manninen V, et al. Chronic Chlamydia pneumoniae infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *Ann Intern Med.* 1992; 116 (4): 273-8.
5. Thom DH, Grayston JT, Siscovick DS, Wang SP, Weiss NS, Daling JR. Association of prior infection with Chlamydia pneumoniae and angiographically demonstrated coronary artery disease. *JAMA.* 1992; 268 (1): 68-72.
6. Fagerberg B, Gnarp J, Gnarp H, Agewall S, Wikstrand J. Chlamydia pneumoniae but not cytomegalovirus antibodies are associated with future risk of stroke and cardiovascular disease: a prospective study in middle-aged to elderly men with treated hypertension. *Stroke.* 1999; 30 (2): 299-305.
7. Wimmer ML, Sandmann-Strupp R, Saikku P, Haberl RL. Association of chlamydial infection with cerebrovascular disease. *Stroke.* 1996; 27 (12): 2207-10.
8. Higuchi M, Castelli JB, Aiello VD, Palomino S, Reis MM, Sambiasi NV, et al. Great amount of C.pneumoniae in ruptured plaque vessel segments at autopsy. A comparative study with stable plaques. *Arq Bras Cardiol.* 2000; 74 (2): 149-51.
9. Higuchi ML, Sambiasi N, Palomino S, Gutierrez P, Demarchi LM, Aiello VD, et al. Detection of Mycoplasma pneumoniae and Chlamydia pneumoniae in ruptured atherosclerotic plaques. *Braz J Med Biol Res.* 2000; 33 (9): 1023-6.
10. Razin S, Yogeve D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998; 62 (4): 1094-156.
11. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Guidelines of the Brazilian Cardiology Society on unstable angina and myocardial acute infarction without ST-segment elevation: Part I: Risk stratification and approaches in the first 12 hours after the patient arrives to the hospital. *Arq Bras Cardiol.* 2001; 77 (Suppl 2): 3-23.
12. Granato C. Procedimentos operacionais padrão.: manual do Laboratório Fleury. São Paulo: 2005.
13. Runyon RP. Fundamentals of statistics in the biological, medical and health sciences. Boston: PWS Publishers; 1985.
14. Parham P. O Sistema Imune. Porto Alegre: Ed Art Méd; 2001.
15. Mendall MA, Carrington D, Strachan D, Patel P, Molineaux N, Levi J, et al. Chlamydia pneumoniae: risk factors for seropositivity and association with coronary heart disease. *J Infect.* 1995; 30 (2): 121-8.
16. Blasi F, Cosentini R, Raccanelli R, Massari FM, Arosio C, Tarsia P, et al. A possible association of Chlamydia pneumoniae infection and acute myocardial infarction in patients younger than 65 years of age. *Chest.* 1997; 112 (2): 309-12.
17. Thom DH, Wang SP, Grayston JT, Siscovick DS, Stewart DK, Kronmal RA, et al. Chlamydia pneumoniae strain TWAR antibody and angiographically demonstrated coronary artery disease. *Arterioscler Thromb.* 1991; 11 (3): 547-51.
18. Arcari CM, Gaydos CA, Nieto FJ, Krauss M, Nelson KE. Association between Chlamydia pneumoniae and acute myocardial infarction in young men in the United States military: the importance of timing of exposure measurement. *Clin Infect Dis.* 2005; 40 (8): 1123-30.
19. Stacey A, Bradlow A. Arcanobacterium haemolyticum and Mycoplasma pneumoniae co-infection. *J Infect.* 1999; 38 (1): 41-2.
20. Holland JF, Frei E. Cancer Medicine. 5th. ed. Boston: Ed Becker B.C. Inc.; 2000.