

***Chlamydia pneumoniae*: review and possible link with arteriosclerosis?**

by

Ieven M¹

Abstract

Chlamydia pneumoniae was recognised as a third species in the genus *Chlamydia* in 1989. It is responsible for about 10% of pneumonia and for less severe forms of respiratory infections such as bronchitis and asthma. During recent years, seroepidemiologic studies showed a relation between coronary arteriosclerosis and *C. pneumoniae* infections. In 1992 Shor et al. detected for the first time *C. pneumoniae* in atheromatous lesions by electron microscopy. During the following years the organism was detected by several techniques in diseased artery walls. However, this does not prove a causal relationship. This presentation gives an overview on the diagnosis and clinical significance of *C. pneumoniae* and its possible role in atherosclerosis.

Key words

Chlamydia pneumoniae, diagnosis, epidemiology, link with atherosclerosis.

¹ Universitaire Instelling Antwerpen, Laboratorium voor Microbiologie, Edegem.

Inleiding

C. pneumoniae is het laatst ontdekte species van het genus *Chlamydia* (1). *Chlamydia* zijn bacteriën met een celwand, ze delen door binaire deling, bevatten DNA, RNA en ribosomen, en synthetiseren enzymen. De celwand bezit een binnen- en buitenmembraan waarin het bekende MOMP eiwit (major outer membrane protein). Ze kunnen geen ATP noch GTP synthetiseren, waardoor ze energie afhankelijk intracytoplasmatische parasieten zijn. De groeicyclus omvat extracellulaire, metabool inerte, elementairlichaampjes (EL) die de cel binnendringen via receptoren waarbij het MOMP een rol zou kunnen spelen. Intracellulair ontstaan reticulaire lichaampjes die de fagolysomen fusie beletten en zich vermenigvuldigen. Aan de oppervlakte van de geïnfecteerde cel verschijnen *Chlamydia* antigenen waaronder MOMP. Vervolgens worden opnieuw dense EL gevormd die de cel verlaten (2).

Microbiologie – Classificatie

Op basis van DNA homologie worden op dit ogenblik 3 species onderscheiden (tabel 1). De EL van *C. pneumoniae* zijn peervormig. *Chlamydiae* zijn heel belangrijke ziekteverwekkers: trachoom, genitourinaire en neonatale infecties door *C. trachomatis*, pneumonieën door *C. psittaci*, terwijl *C. pneumoniae* verantwoordelijk is voor luchtweg-infecties en misschien ook een rol speelt in atherosclerose.

C. pneumoniae werd voor het eerst geïsoleerd in 1965 uit de conjunctiva van een kind in Taiwan en kreeg de laboratoriumaanduiding TW-183. Bijna 20 jaar later, in 1983, werd een tweede stam geïsoleerd uit een luchtwegbemonstering in Taiwan die de labaaanduiding AR (acute respiratory)-39 kreeg. Uit deze twee isolaten ontstond dan de benaming TWAR (2). *C. pneumoniae* isolaten vertonen onder mekaar meer dan 90% DNA homologie en minder dan 10% met de andere twee species (3). Er is slechts één serovar bekend.

Diagnose

Detectie van *C. pneumoniae* in klinische monsters kan gebeuren door kweek, nucleïnezuuramplificatie of antigeen-detectie.

TABEL 1
Voornaamste eigenschappen van de drie Chlamydia species

Eigenschap	<i>C. pneumoniae</i>	<i>C. trachomatis</i>	<i>C. psittaci</i>
Aandoening	Luchtweginfectie*	Trachoom** S.O.A.	Luchtweginfectie
Elementair lichaam	Peervormig	Rond	Rond
Serovars	1	18	?
Gastheer	Mens	Mens	Vogels
Tetracyclinemacroliden	S	S	S
Sulfonamiden	R	S	R

* spectrum mogelijk onvolledig

** ook neonatale inclusieconjunctivitis en pneumonie (aangepast van JT Grayston, CID 1992; 15: 757)

Kweek

Zeer veel verschillende cellen zijn gebruikt: McCoy, Hep-2, H292, Hela 229, maar de meest gebruikte zijn HL en Hep-2 cellen. De cellen moeten worden behandeld met metabolisme-inhibitoren zoals mitomycine C of cycloheximide. Deze kweekmethode is zeker niet optimaal en talrijke technieken werden voorgesteld om ze te optimaliseren. Een positieve kweek wordt dan herkend door reactie van een fluorescerend specifiek monoclonaal antilichaam. De gevoeligheid van de kweekmethode voor de detectie van *C. pneumoniae* is niet gekend, maar ligt waarschijnlijk lager dan die voor *C. trachomatis*.

Nucleïnezuur amplificatietechniek

Gezien de gebrekkige gevoeligheid van de kweektechniek lag het gebruik van nucleïnezuur amplificatietechnieken voor de hand (4). Als bemonsteringen zijn gebruikt: nasopharynxaspiraten, keelwissers, sputum, bronchoalveolaire spoelingen en bloedvatfragmenten. Keelwissers leveren meer positieve resultaten op dan nasopharynxaspiraten (5). Amplificatie doelwit is meestal een fragment van het MOMP gen, soms van het 16S rRNA gen (6), zelden een specifiek genoom fragment met ongekende functie. Tong en Sillis (7) voeren een reactie in 2 stappen uit: eerst voor een fragment, gemeenschappelijk voor *C. psittaci* en *C. pneumoniae*, en hierop met nieuwe primers voor een fragment specifiek voor *C. pneumoniae*. Black (8) en Rasmussen (9) amplificeren een genus specifiek fragment dat door behandeling met endonucleasen in species specifieke stukken wordt geknipt. Confrontatie van serologische reacties met PCR-resultaten bij luchtweginfecties laat soms vermoeden dat de gevoeligheid van de PCR niet optimaal is, wat hoogst waarschijnlijk

meer met de monsterbehandeling te maken heeft dan met de amplificatie zelf. Ook antistoffendetectie kan tekortschieten. Hierbij duikt de problematiek van de referentietest of gouden standaard op.

Om de gevoeligheid te verhogen voeren vele auteurs een 'nested PCR' uit. Deze procedure is 10 maal gevoeliger dan een enkelvoudige reactie, maar bijzonder kwetsbaar wegens de sterk verhoogde kansen op laboratoriumkruisbesmettingen, wat voor de detectie in delicate gevallen zoals bloedvaten erg belangrijk is. Dat de klassieke, goed uitgevoerde reactie voldoening geeft, wordt geïllustreerd door een recent onderzoek in Zweden (10). Op 116 monsters werden alle 32 kweekpositieve gevallen door PCR bevestigd en daarenboven nog 17 kweeknegatieven gedetecteerd. Een interne controle werd in ons laboratorium aangemaakt door een fragment herpes virus DNA te binden aan de *C. pneumoniae* amplificatieprimers. Hierdoor wordt een DNA fragment gesynthetiseerd dat door *C. pneumoniae* primers wordt geamplificeerd, maar langer is dan het doelwit amplicon en in de elektroforese ervan wordt gescheiden en herkend.

Antigeen-detectie

Antigeendetectie kan gebeuren door immunofluorescentie op vers of voor histologie gefixeerd materiaal. Hierbij stellen zich opnieuw de problemen van gevoeligheid en vooral van specificiteit.

Serologie

De tijdrovende micro-immunofluorescentie is de enige beschikbare species specifieke test. Als criteria voor een positief resultaat worden aangenomen: – een 4-voudige IgG stijging tussen acuutfase en convalescentiefase serum of – een IgG titer $\geq 1:512$ of een IgM titer $\geq 1:16$. Er is beweerd dat IgA een betere waardemeter zou zijn dan IgG. Als antigeen worden reticulaire lichaampjes gebruikt die zijn aangemaakt in het laboratorium van Grayston. Recent is gebleken dat meerdere stammen van *C. pneumoniae* besmet zijn met *Mycoplasma pneumoniae*, wat natuurlijk de specificiteit van de test in vraag stelt (11, 12). Daarenboven zijn kruisreacties met *Bartonellae* vastgesteld (13).

Epidemiologie

Sero-epidemiologisch onderzoek toonde een significante stijging aan van *C. pneumoniae* antistoffen prevalentie vanaf de leeftijd van 5-6 jaar,

die in deze groep 10-12% bedraagt, om 50% te bereiken bij volwassenen (2, 14). Daaruit besloot men dat de infectie optrad vanaf de schoolgaande leeftijd, alhoewel ook dikwijls volwassenen en anderen geïnfecteerd en zelfs gereïnfecteerd worden (2, 15). Recent werd echter door Falck en medewerkers aangetoond dat kinderen jonger dan 6 jaar evenveel als 6-10 jarigen geïnfecteerd worden, maar de meesten vormen geen detecteerbare antistoffen (16). Sero-epidemiologie zou een vertekend beeld leveren. Alleen aëroge mens-mens overdracht is bekend. De rol in conjunctivitis-trachoom is onvoldoende opgevolgd.

Klinische betekenis

Conjunctivitis-trachoom

Na de eerste isolaten bij conjunctivitis was de belangstelling voor *C. pneumoniae* uitsluitend gericht op luchtweginfecties. De rol bij trachoom blijft dus onbekend.

Luchtwegeninfecties (LWI)

Deze onderscheiden zich klinisch niet van die, veroorzaakt door de talrijke andere etiologische agentia. *C. pneumoniae* is verantwoordelijk voor een gedeelte van de LWI waarvoor tot nog toe geen etiologisch agens gekend was. Hoe groot dit aandeel is, blijft onbekend omdat geen studies voorhanden zijn waarbij een cohorte patiënten met alle beschikbare technieken op alle mogelijke etiologiën werd onderzocht. *C. pneumoniae* is verantwoordelijk voor ongeveer 20% van de pneumonieën (17) en komt epidemisch voor in rusthuizen en hun personeel (18, 19, 20, 21). Bij kinderen en volwassenen zonder symptomen werd *C. pneumoniae* door PCR gedetecteerd, wat wijst op asymptomatische infecties (22, 3, 8, 23, 24, 25).

Er werd herhaaldelijk gewezen op een associatie van *C. pneumoniae* met astma volgend op een acute infectie (26, 27, 28). In ons laboratorium werden respiratoire bemonsteringen onderzocht van kinderen met en zonder astma bij een acute LWI. Van de eersten werden 2/24 en van de tweeden 0/47 positief bevonden voor *C. pneumoniae*, het verschil is niet significant ($p = 0,11$). *C. pneumoniae* is verantwoordelijk voor 2-5% van de buiten het ziekenhuis opgelopen pneumonieën en meer bij immunodeficienten. Zoals in bijna alle infecties doen er zich ook asymptomatische voor die zich alleen door een serologische omslag manifes-

teren, zowel bij kinderen als bij volwassenen in 5% (10). Dragerschap en chronische infectie komen eveneens voor: na een acute infectie kan *C. pn.* nog weken in de bovenste luchtwegen aanwezig blijven (16, 29, 30).

Chlamydia pneumoniae en atherosclerose

In 1988 vonden Leinonen en medewerkers (vermeld door Saikku, 31) in 70% van de sera van patiënten met acuut myocard infarct (AMI) een seroconversie tegen een bacterieel lipopolysaccharide. Later bleek dat deze sera in de micro-immunofluorescentietest hoge titers antistoffen bevatten tegen *C. pneumoniae*. Daarna zijn in vele landen sera van patiënten met AMI en atherosclerose (AS) van coronairen, carotis, aorta en andere bloedvaten op dezelfde manier onderzocht (tabel 2).

TABEL 2

Globale resultaten van de detectie van *C. pneumoniae* in atherosclerotische bloedvaten

ICC	ICC	PCR	Kweek
A. coronariae	107/153 (70)	32/154 (21)	1/113 (0.9)
Aorta	36/60 (60)	40/85 (54)	
A. carotis	45/77 (58)	18/91 (20)	6/85 (7)
Andere		19/47 (40)	
Totaal	188/290 (65)	115/377 (30)	7/198 (3.5)

ICC: immunocytochemie
aantal positieven/aantal onderzochte
(): percentage

Gezien de gladde spiercelwoekering in AS monoclonaal is, kunnen de letsels tot op zekere hoogte als vasculaire tumoren worden aanzien, waarbij virussen een aanzet zouden kunnen geven (32). In de eerste plaats herpesvirussen: Herpes simplex 2, CMV en EB virus kunnen cellen transformeren en Herpes 8 veroorzaakt Kapositumoren. HSV werd opgezocht door in situ hybridisatie in gladde spiercellen van AS aorta-letsels ter gelegenheid van coronair chirurgie en bij jonge trauma slachtoffers. Ook CMV werd in AS letsels door in situ hybridisatie gedetecteerd en later door PCR. CMV en *C. pneumoniae* werden ervan verdacht een rol te spelen in restenose (33); Zou et al. (34) zagen restenose bij 43% CMV seropositieve patiënten en slechts bij 8% der CMV seronegatieven. Men haalde daarbij het CMV p53 tumor repressor gen eiwit aan, dat de gladde spiercellenwoekering in de bloedvatwand zou kunnen remmen. In een recentere studie in Duitsland werd geen verband gevonden

tussen seropositiviteit voor CMV, noch voor *C. pneumoniae* en coronaire restenose (33). Saikku (31) heeft recent de resultaten van het serologisch onderzoek over *C. pneumoniae* bij atherosclerose samengebracht: 4 studies uit Finland, 4 uit de VS, 2 uit Zweden, 2 uit Duitsland, 3 uit Engeland en 1 uit Nederland. Allen wijzen op een verhoogde kans op AMI en AS gaande van 1,8 tot 11,1 maal, bij een hoge IgG of IgA titer tegen *C. pneumoniae* of indien IgM of immuuncomplexen worden gevonden. Er zijn ook 2 mededelingen bekend die dit verband niet vonden. Later is men ervan uit gegaan dat een blijvend hoge antistoftiter (≥ 3 maand, $\geq 1:64$) zou wijzen op een chronische infectie, in tegenstelling met een dalende titer. Als mogelijke uitleg voor de pathogenese van AS door *C. pneumoniae* wordt gewezen op het klassieke chronisch verloop van de andere chlamydiën infecties met opeenvolgende perioden van activiteit en latentie. In vitro kan *C. pneumoniae* zich vermenigvuldigen in macrofagen, endotheel en gladde spiercellen, die cellen die de zetel zijn van de AS plaques. Bij konijnen met normale cholesterolemie ontstaan AS letsels in de aorta na aërogene toediening van *C. pneumoniae* (35, 36). Ook bij bepaalde muizensoorten kan *C. pneumoniae* in de aorta worden teruggevonden na experimentele infectie (37), wat recent weer werd tegengesproken.

Het zou natuurlijk een revolutie betekenen moest AS een infectieuze, door antibiotica behandelbare aandoening zijn (38, 39, 40). Twee onderzoeken over gebruik van antibiotica zijn reeds verricht. Gupta et al. voerden een prospectieve studie uit bij postmyocardinfarctpatiënten zonder, met lage en met hoge antistoftiters tegen *C. pneumoniae*. Degenen met hoge titers werden toegewezen tot geen behandeling, of een placebo, of 3 of 6 dagen azithromycine. Tijdens de daaropvolgende 18 (± 4) maand waren er significant minder cardiovasculaire incidenten bij de antistoffen negatieve en de met azithromycine behandelde patiënten (38, 39). Een tweede studie door Gurfinkel et al. (40) wees in dezelfde richting.

Maar hoe zit het intussen met het uiteindelijke bewijs van de rol van *C. pneumoniae* in AS: het aantonen van het organisme in de letsels, door kweek, PCR, immunoflorescentie? Ons zijn 16 publicaties bekend over pogingen *C. pneumoniae* in bloedvatenletsels aan te tonen, op vers of voor histologie gefixeerd materiaal. De eerste studie werd in Zuid-Afrika verricht, de meeste in de VS, maar ook een enkele in Engeland, Italië, Duitsland, Finland en Mexico. Globaal genomen levert de cytochemische detectie meer positieve resultaten (65%) dan de PCR (30%). De studie van Ramirez (41) illustreert de moeilijkheden bij deze studies. Zeven verschillende laboratoria bewerkten 12 bemonsteringen met zeer

verschillende methoden. Eén van de 12 monsters was in de 3 PCR laboratoria positief en in 2 andere laboratoria kweek positief. De overige resultaten waren zeer uiteenlopend.

De kweektechniek mag dan wel ongevoelig zijn, ze was zelden positief, op één studie na met 5 positieve resultaten op 60 pogingen (42). In 3/7 studies waar kweek werd ondernomen, waren globaal 7 monsters op 198 positief: éénmaal in de verwarde studie van Ramirez (41), 5 maal op 60 A. carotis monsters in de studie van Maass (42) en 1 op 25 carotis bemonsteringen in de studie van Jackson et al. (43). Weiss et al. (44) verwerpen de mogelijke betrokkenheid van *C. pneumoniae* in atherosclerose. De PCR positieve prevalentie die zij vinden, 2%, is significant lager dan die van alle andere onderzoekers, evenals de vergelijkingen van de antistoftiters.

Besluit

C. pneumoniae vult gedeeltelijk het domein op van de LWI waarvan de oorzaak totnogtoe onbekend bleef, en is misschien ook met andere etiologiën van LWI één van de aanzetten tot astma. Aanwijzingen dat een besmettelijk agens verantwoordelijk zou zijn voor coronair lijden zijn op dit ogenblik zwak. In de eerste plaats moet de aanwezigheid van *C. pneumoniae* in arteriosclerotische letsels worden gedocumenteerd door verbeterde kweekmethodes en vooral door toepassing van verschillende onafhankelijke, mekaar bevestigende nucleïnezuur-amplificatietechnieken. Vervolgens moet een oorzakelijk verband worden aangetoond.

Samenvatting

Chlamydia pneumoniae werd in 1989 als derde species erkend binnen het genus *Chlamydia* en is vooral bekend als respiratoir pathogeen. Ongeveer 10% van de pneumonieën zijn te wijten aan *C. pneumoniae*, benevens minder ernstige vormen van luchtweg-infecties zoals bronchitis en astma. Enkele jaren geleden werd op basis van sero-epidemiologische onderzoeken een verband gevonden tussen coronair hartlijden en *C. pneumoniae* infecties. In 1992 werd door Shor en medewerkers voor het eerst elektronen-microscopisch *C. pneumoniae* in atherosclerotische letsels aangetoond. Sedertdien werd het micro-organisme in menige studies door verschillende technieken in aangetaste vaatwanden aangetoond. Dit bewijst echter nog niet dat er een causaal verband bestaat. Een overzicht wordt gegeven van *Chlamydia pneumoniae*, de diagnose, klinische betekenis en zijn mogelijke rol in atherosclerose.

Sleutelwoorden

Chlamydia pneumoniae, diagnose, epidemiologie, associatie atherosclerosis.

Résumé

Identifiée depuis 1989 comme troisième espèce dans le genre *Chlamydia*, *C. pneumoniae* est bien connue comme pathogène respiratoire, responsable d'environ 10% des pneumonies. Elle intervient en outre dans des formes moins graves d'infections respiratoires telles que la bronchite et l'asthme. Au cours des dernières années, des enquêtes séro-épidémiologiques ont trouvé un rapport entre les infections par *C. pneumoniae* et l'athérosclérose coronaire. Shor et al. ont mis le germe en évidence pour la première fois par microscopie électronique dans des lésions athéromateuses. Depuis, le micro-organisme fut détecté par diverses techniques dans des lésions artérielles. Ces données ne constituent évidemment pas la preuve d'une relation causale. Cet exposé présente un aperçu sur le diagnostic et le rôle clinique des *C. pneumoniae* ainsi que sur son rôle possible dans l'athérosclérose.

Mots-clés

Chlamydia pneumoniae, diagnostic, épidémiologie, association avec athérosclérose.

Referenties

1. GRAYSTON JT, KUO CC, CAMPBELL LA, WANG SP. *Chlamydia pneumoniae* sp. nov. for *Chlamydia* sp. Strain TWAR. Int J Syst Bacteriol 1989; 39: 88-90.
2. GRAYSTON JT. Infections caused by *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. Clin Infect Dis 1992; 15: 757-763.
3. BERDAL BP, SCHEEL O, THOMAS GN, BLACK CM, MEIDELL NK. Epidemic patterns and carriage of *Chlamydia pneumoniae* in Norway. Scand J Infect Dis (suppl.) 1997; 104: 22-25.
4. CAMPBELL LA, PEREZ MELGOZA M, HAMILTON DJ, KUO CC, GRAYSTON JT. Detection of *Chlamydia pneumoniae* by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992; 30: 434-439.
5. GNARPE J, LUNDBACK A, GNARPE H, SUNDELOF B. Comparison of nasopharyngeal and throat swabs for the detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* by polymerase chain reaction. Scand J Infect Dis (suppl.) 1994; 104: 11-12.
6. GAYDOS CA, QUINN TC, EIDEN JJ. Identification of *Chlamydia pneumoniae* by DNA amplification of the 16S rRNA gene. J Clin Microbiol 1992; 30: 796-800.
7. TONG CYW, SILLIS M. Detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia psittaci* in sputum samples by PCR. J Clin Pathol 1993; 46: 313-317.

8. BLACK CM, THARPE JA, RUSSELL H. Distinguishing *Chlamydia* species by restriction analysis of the major outer membrane protein gene. *Mol Cell Probes* 1992; 6: 395-400.
9. RASMUSSEN SJ, DOUGLAS FP, TIMMS P. PCR detection and differentiation of *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis*. *Mol Cell Probes* 1992; 6: 389-394.
10. FALCK G, GNARPE J, GNARPE H. Prevalence of *Chlamydia pneumoniae* in healthy children and in children with respiratory infections. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16: 549-554.
11. MESSMER TO, BLACK CM, TACKER WL. Mycoplasma contamination of *Chlamydiae* isolated from clinical specimens. *APMIS* 1994; 102: 793-796.
12. VERKOOYEN RP, SIJMONS M, FRIES E, VAN BELKUM A, VERBRUGH HA. Widely used, commercially available *Chlamydia pneumoniae* antigen contaminated with mycoplasma. *J Med Microbiol* 1997; 46: 419-424.
13. MAURIN M, EB F, ETIENNE J, RAOULT D. Serological cross-reactions between *Bartonella* and *Chlamydia* species: implications for diagnosis. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2283-2287.
14. OUCHI K, NAKAZAW T, KARITA M, KANEHARA Y. Prevalence of *Chlamydia pneumoniae* in acute lower respiratory infection in the pediatric population in Japan. *Acta Paediatr Jpn* 1994; 36: 256-260.
15. JANTOS CA, WIENPAHL B, SCHIEFFER HG, WAGNER F, HEGEMANN JH. Infection with *Chlamydia pneumoniae* in infants and children with acute lower respiratory tract disease. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14: 117-122.
16. FALCK G, HEYMAN L, GNARPE J, GNARPE H. *Chlamydia pneumoniae* and chronic pharyngitis. *Scand J Infect Dis* 1995; 27: 179-182.
17. THOM DH, GRAYSTON JT, CAMPBELL LA, KUO CC, DIWAN VK, WANG SP. Respiratory infection with *Chlamydia pneumoniae* in middle-aged and other adult outpatients. *Eur J Clin Microbiol Inf Dis* 1994; 13: 785-792.
18. GAYDOS CA, ROBIN PM, HAMMERSCHLAG MR, HYMAN CL, EIDEN JJ, SCHACHTER J, QUINN TC. Diagnostic utility of PCR-enzyme immunoassay, culture and serology for detection of *Chlamydia pneumoniae* in symptomatic and asymptomatic patients. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 903-905.
19. GAYDOS LA, EIDEN JJ, OLDACH D, MUNDY LM, AUWAERTER P, WARNER ML, VANCE E, BURTON AA, QUINN TC. Diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* infection in patients with community acquired pneumoniae by polymerase chain reaction enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis* 1994; 19: 157-160.
20. LIEBERMAN D, LIEBERMAN D, SCHLAEFFER F, PORATH A. Community-acquired pneumonia in old age: a prospective study of 91 patients admitted from home. *Age Ageing* 1997; 26: 69-75.
21. TROY CJ, PEELING RW, ELLIS AG, HOCKIN JC, BENNETT DA, MURPHY MR, SPIKA JS. *Chlamydia pneumoniae* as a new source of infectious outbreaks in nursing homes. *JAMA* 1997; 277: 1214-1218.
22. BERDAL BP, SCHEEL O, OGAARD AR, HOEL T, GUTTEBERG TJ, ANESTAD G. Spread of subclinical *Chlamydia pneumoniae* infection in a closed community. *Scand J Infect Dis* 1992; 24: 431-436.
23. GNARPE J, GNARPE H, SUNDELÖF B. Endemic prevalence of *Chlamydia pneumoniae* in subjectively healthy persons. *Scand J Infect Dis* 1991; 23: 387-388.
24. HYMAN CL, ROBLIN PM, GAYDOS CA, QUINN TC, SCHACHTER J, HAMMERSCHLAG MR. Prevalence of asymptomatic nasopharyngeal carriage of *Chlamydia pneumoniae* in subjectively healthy adults: assessment by polymerase

- chain reaction – enzyme immunoassay and culture. Clin Infect Dis 1995; 20: 1174-1178.
25. TJHIE HT, KOCK JH, THEUNISSEN JJ, STOLZ E, MACLAREN DM. Succesvolle kweek van *Chlamydia pneumoniae* bij twee asymptomatische patiënten. Ned Tijdsch Geneesk 1994; 139: 1913-1916.
 26. BJORNSSON E, HJELM E, JANSON C, FRIDELL E, BOMAN G. Serology of *Chlamydia* in relation to asthma and bronchial hyperresponsiveness. Scand J Infect Dis 1996; 28: 63-69.
 27. HAHN DL, DODGE RW, GOLUBJATNIKOV R. Association of *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR) infection with wheezing, asthmatic bronchitis, and adult-onset asthma. JAMA 1991; 266: 225-230.
 28. MAYAUD C. Asthme et *Chlamydia pneumoniae*. Une perspective d'avenir pour les macrolides en général et pour la roxithromycine en particulier? Presse Med 1997; 26 (suppl. 2): 27-29.
 29. FALCK G, GNARPE J, GNARPE H. Persistent *Chlamydia pneumoniae* infection in a Swedish family. Scand J Infect Dis 1996; 28: 271-273.
 30. HAMMERSCHLAG MR, CHIRGWIN K, ROBLIN PR. Persistent infection with *Chlamydia pneumoniae* following acute respiratory illness. Clin Infect Dis 1992; 14: 178-182.
 31. SAIKKU P. *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis, an update. Scand J Infect Dis (suppl.) 1997; 104: 53-56.
 32. ELLIS RW. Infection and coronary heart disease. J Med Microbiol 1997; 46: 535-539.
 33. CARLSSON J, MIKETIC S, MUELLER KH, BROM J, ROSS R, VON ESSEN R, TEBBE U. Previous cytomegalovirus or *Chlamydia pneumoniae* infection and risk of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. Lancet 1997; 350: 1225.
 34. ZOU YF, LEON MB, WASLAWIW MA. Association between prior cytomegalovirus infection and the risk of restenosis after coronary atherectomy. N Eng J Med 1996; 335: 624-630.
 35. FONG IW, CHIN B, VIIRA E, FONG MW, JANG D, MAHONY J. Rabbit model for *Chlamydia pneumoniae* infection. J Clin Microbiol 1997; 35: 48-52.
 36. Laitinen. Atherosclerotic changes in normocholesterolemic rabbits after *Chlamydia pneumoniae* infection ACAAC, 1997; Toronto.
 37. MOAZED TC, KUO CC, GRAYSTON JT, CAMPBELL LA. Murine models of *Chlamydia pneumoniae* infection in atherosclerosis. J Infect Dis 1997; 175: 883-890.
 38. GUPTA S, GARRINGTON D, LEATHAM EW, IRESON N, WONG H, MENDALL MA, PATEL P, CAMM AJ, KASKI JC. Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection in post myocardial infarction patients. Eur Heart J, 1996; 2367 Abstract.
 39. GUPTA S, LEATHAM EW, CARRINGTON D, MENDALL MA, KASKI JC, CAMM AJ. Elevated *Chlamydia pneumoniae* antibodies, cardiovascular events, and azithromycin in male survivors of myocardial infarction. Circulation 1997; 96: 404-407.
 40. GURFINKEL E, BOROVICH G, DAROCAA, BECK E, MAUTNER B. Randomised trial of roxithromycin in non Q-wave coronary syndromes: ROX15 pilot study. Lancet 1997; 350: 404-407.
 41. RAMIREZ JA. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from the coronary artery of a patient with coronary atherosclerosis. Ann Int Med 1996; 125: 979-982.
 42. MAASS M, KRAUSE E, ENGEL PM, KREGER S. Endovascular presence of *Chlamydia pneumoniae* in patients hemodynamically effective carotid artery stenosis. Angiology 1997; 48: 699-706.

43. JACKSON LA, CAMPBELL LA, KUO CC, RODRIGUEZ DI, LEE A, GRAYSTON JT. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from a carotid endarterectomy specimen. J Infect Dis 1997; 176: 292-295.
44. WEISS S, ROBLIN P, GAYDOS C, CUMMINGS P, PATTON D, SCHULHOFF N, SHANI J, FRANKEL R, PENNY K, QUINN TC, HAMMERSCHLAG MR, SCHACHTER J. Failure to detect *Chlamydia pneumoniae* in coronary atheromas of patients undergoing atherectomy. J Infect Dis 1996; 173: 957-962.