

عفونت کلامیدیا پنومونیه در بیماران مبتلا به پلاک‌های آترواسکلروتیک

محمد رستمی نژاد^۱، فرهاد لحمی^۲، احسان ناظم الحسینی مجرد^۱، حسین گودرزی^۳، حسین احمدی^۴،* حسین دبیری^۵

تاریخ اعلام وصول: ۹۲/۲/۱

تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۹۲/۶/۲

چکیده

سابقه و هدف: در مطالعات مختلف نشان داده شده که عفونت‌های میکروبی از قبیل کلامیدیا پنومونیه موجب توسعه بیماری آترواسکلروز می‌باشند. در این مطالعه شیوع کلامیدیا پنومونیه در پلاک‌های آترواسکلروتیک به دو روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و ایمونوفلورسانس و همچنین رابطه بین شدت بیماری و وجود این باکتری بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی مقایسه‌ای در مجموع ۶۴ نمونه شامل ۳۳ نمونه از بیماران با پلاک آترواسکلروتیک شریان‌ها (۲۶ عروق کرونر و ۷ آئورت شکمی) و ۳۱ نمونه کنترل شامل ۱۲ نمونه بیوپسی از مناطق سالم آئورت صعودی همگی از بیمارانی که تحت عمل جراحی پیوند عروق کرونر (CABG) قرار گرفته بودند و ۱۹ نمونه اتوپسی از شریان کرونر افراد سالم بررسی شد. **یافته‌ها:** DNA و آنتی ژن کلامیدیا پنومونیه به ترتیب در ۶ (۱۸٪) و ۷ نفر (۲۱٪) از ۳۳ نمونه مشاهده شد ولی در گروه کنترل باکتری کلامیدیا پنومونیه توسط دو روش جدا نگردید.

بحث و نتیجه‌گیری: حضور کلامیدیا پنومونیه در پلاک‌های آترواسکلروتیک و عدم وجود آن در عروق سالم تایید کننده نقش احتمالی پنومونیه در توسعه آترواسکلروز، به ویژه در مناطقی است که عفونت به صورت مکرر وجود دارد ولی مکانیسم دقیق شیوع بالای آترواسکلروتیک بیماری عروقی کاملاً ناشناخته باقی مانده است.

کلمات کلیدی: کلامیدیا پنومونیه، پلاک‌های آترواسکلروتیک، PCR، ایمونوفلورسانس

مقدمه

پنومونیه، هلیکوباکتر پیلوری و یاسیتو مگالو ویروس در بیماری زایی آترواسکلروز مطرح شده است، اما علت این مسئله ناشناخته مانده است (۴ و ۵). فراوانی عفونت کلامیدیا پنومونیه و بیماری‌های قلبی آترواسکلروز در ایران نسبتاً بالا است (۶ و ۷). در مطالعات انجام شده تیتراژ آنتی بادی اختصاصی ضد کلامیدیا پنومونیه (IgG) در بیماران مبتلا به آترواسکلروز به ترتیب ۸۲ و ۵۴ درصد گزارش شده است (۶ و ۷). هدف از مطالعه حاضر، بررسی شیوع کلامیدیا پنومونیه در مناطق atheromatous و nonatheromatous از شریان بیماران ایرانی

آترواسکلروز بیماری است که بر عروق خونی اثر می‌گذارد، و به عنوان یکی از علل اصلی ابتلا به بیماری و مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته و برخی از کشورهای در حال توسعه، مانند ایران شناخته شده است (۱ و ۲). هیچ کدام از فاکتورهای خطر مانند استعداد ژنتیکی، کلسترول بالا، فشارخون بالا، کشیدن سیگار یا دیابت نمی‌تواند به طور کامل بیماری زایی آترواسکلروز را توصیف کند (۳). نقش احتمالی برخی از میکروارگانیسم‌ها مانند

۱- پژوهشگر، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد

۲- استادیار، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی آجا، گروه بیماری‌های گوارش

۳- استاد، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، گروه میکروبی شناسی

۴- استادیار، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، گروه قلب و عروق

۵- استادیار، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، گروه میکروبی شناسی (*نویسنده مسئول)

تلفن: ۲۲۴۳۲۵۱۸ آدرس الکترونیک: elman1356@yahoo.com

و به مدت ۵ دقیقه با استون فیکس کرده سپس به روش گارنت و همکارانش رنگ آمیزی انجام شد (۹). هر لام توسط دو نفر به صورت جداگانه مطالعه شد که آنها دارای تجربه کافی در تشخیص کلامیدیا پنومونیه با روش ایمونو فلوروسانس بودند. هنگامی که چهار یا بیشتر از آن، دیسک سبز فلورسنت با قطری حدود ۳۰۰ نانومتر داشته باشد، تست مثبت در نظر گرفته شد. لام کنترل مثبت و منفی در هر آزمون وجود داشت که با نتایج بدست آمده مقایسه شدند. تجزیه و تحلیل آماری با نرم افزار SPSS (شیکاگو، ایلینویز، ایالات متحده آمریکا) انجام شد. داده‌های بدست آمده با استفاده از آزمون t و آزمون فیشور مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. اگر p کوچکتر از ۰/۵ بود نتیجه معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

سی و سه نمونه از پلاک آترواسکلروتیک (۲۶ نمونه از عروق کرونر و ۷ نمونه از آئورت شکمی) به عنوان گروه بیمار و ۳۱ نمونه به عنوان گروه شاهد (۱۲ نمونه بیوپسی و ۱۹ نمونه اتوپسی) برای بررسی کلامیدیا پنومونیه به وسیله PCR و ایمونو فلوروسانس مورد بررسی قرار گرفتند. ۱۸٪ نمونه‌های DNA (۶ از ۳۳) و ۲۱٪ از نمونه‌های آنتی ژن غشای بیرونی (۷ از ۳۳) نمونه آترواسکلروز از لحاظ کلامیدیا مثبت بودند. در گروه کنترل، کلامیدیا پنومونیه در هر دو روش جداسازی نشد. همه نمونه‌های DNA مثبت از لحاظ ایمونو فلوروسانس مستقیم هم مثبت بودند. تنها نمونه‌ای که از لحاظ ایمونو فلوروسانس مثبت بود ممکن است به خاطر ایمونو فلوروسانس غیر اختصاصی یا واکنش متقابل باشد (۱۰). تفاوت آماری معنی داری بین گروه بیمار و گروه کنترل از نظر سن، جنس، فشارخون، چربی، کشیدن سیگار و دیابت وجود نداشت (جدول ۱). همان طور که در نمودار ۱ نشان داده شده، هیچ یک از ویژگی‌های جمعیتی از بیماران مانند سن، جنس، سیگار کشیدن، فشار خون بالا، چربی و یا دیابت به طور قابل توجهی در گروه DNA و آنتی ژن مثبت با DNA و آنتی ژن منفی کلامیدیا پنومونیه به طور معنی داری اختلاف نداشت. علاوه بر این، یافته‌های ما در مورد بیماران نشان داد که هیچ ارتباط معنی داری بین بیماری‌های قلبی مزمن و انفارکتوس میوکارد در بیماران مبتلا به عفونت کلامیدیا پنومونیه وجود نداشت (۰/۵ < p).

بر پایه‌ی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و ایمونو فلوروسانس و همچنین بررسی ارتباط بین وضعیت بالینی با آنتی ژن و DNA (پروتئین غشای خارجی) مثبت این باکتری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ۳۳ بیمار مراجعه کننده به بخش جراحی قلب و عروق بیمارستان‌های وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تهران بین سال‌های ۱۳۸۵ تا ۱۳۸۶ که با نشانه‌هایی مانند نارسایی بیماری‌های عروقی تحت عمل جراحی قرار گرفته بودند، بررسی شدند. علاوه بر این، ۳۱ نمونه شامل ۱۲ نمونه بیوپسی مناطق سالم آئورت صعودی بیمارانی که عمل جراحی پیوند عروق کرونر قلب را انجام داده بودند و ۱۹ نمونه کالبد شکافی شریان‌های کرونر افراد سالم در پزشکی قانونی نیز جمع‌آوری شدند.

اطلاعات مربوط به عادات تغذیه‌ای، کشیدن سیگار، چربی و سابقه بیماری برای هر مورد ثبت شد. این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تهران به تصویب رسید و از کلیه شرکت‌کنندگان در مطالعه رضایت نامه‌ای اخذ شد.

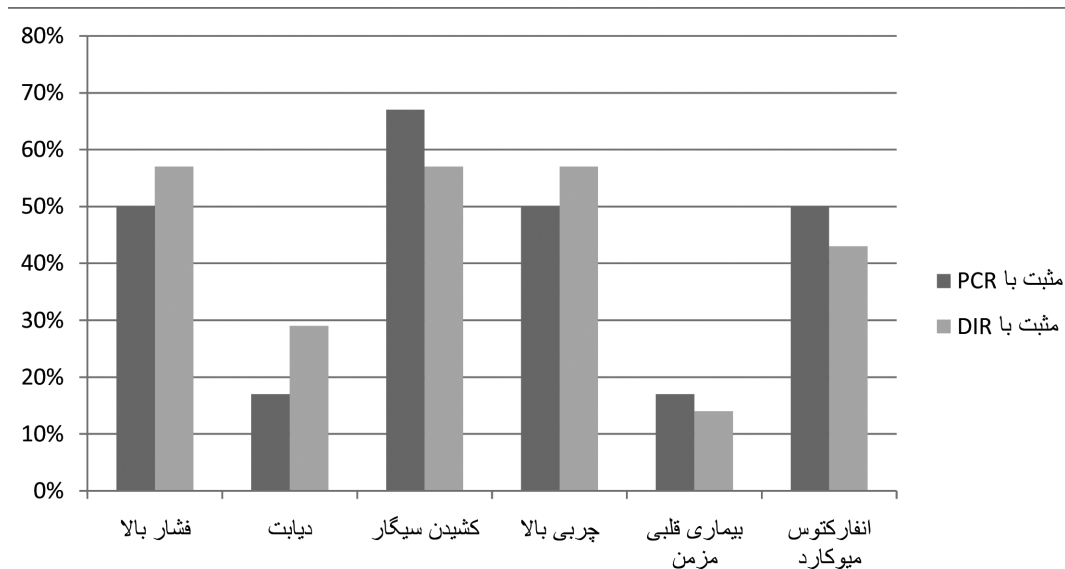
نمونه‌های بافت تحت شرایط استریل در اتاق عمل تشریح شدند. حدود ۴ تا ۵ میلی متر از عروق به صورت طولی برش داده شد و در میکروتیوپ بدون بافر قرار گرفت. پس از انتقال میکروتیوپ‌ها از اتاق عمل به آزمایشگاه میکروبیولوژی، نمونه‌ها زیر هود با جریان هوای تمیز باز شدند.

نمونه‌های بافت به دو قسمت، یکی برای ایمونو فلوروسانس و دیگر برای استخراج DNA برش داده شدند. همه نمونه‌ها در ۲۰- درجه تا زمان انجام آزمایش نگهداری شدند. ژنوم DNA برای انجام PCR به وسیله کیت QIAamp (کیاژن، هیلدن، آلمان) استخراج شد. برای تکثیر ژن PstI در کلامیدیا پنومونیه، که یک قطعه ۴۳۷ جفت بازی است از پرایمرهای (۳′-GTTGTTTCATGAAGGCCTACT-۵′) HL۱ و (۳′-TGCATAACCTACGGTGTGTT-۳′) HR۳ استفاده شد.

محصولات PCR روی ژل ۱/۵٪ آگارز آغشته به اتیدیوم بروماید الکتروفورز و سپس زیر نور UV مورد بررسی قرار گرفتند. برای انجام ایمونو فلوروسانس مستقیم، بافت‌های آترواسکلروز را مخلوط کرده تا به فرم محلول شیری یکنواخت درآیند. حدود ۵ میکرولیتر از محلول را روی لامی که از تفلون پوشیده شده ریخته

جدول ۱- مقایسه درصد متغیرهای مختلف در گروه بیمار در مقایسه با گروه شاهد

p Value	گروه شاهد	گروه بیمار	
	۴۵	۵۹	میانگین سنی
۰/۷۹	۲۲/۹	۲۲/۱۱	جنسیت (نسبت مرد به زن)
۰/۱۷	۱۲/۱۹	۲۶/۷	آئورت /کرونر
۰/۶۲	۱۲(۳۹٪)	۱۵(۴۵٪)	فشار خون بالا
۰/۴۱	۷(۲۲٪)	۱۱(۳۳٪)	دیابت
۰/۴۵	۱۵(۴۸٪)	۱۲(۳۶٪)	کشیدن سیگار
۰/۸	۱۱(۳۵٪)	۱۳(۳۹٪)	چربی بالا
۰/۷۹	۹(۳۰٪)	۱۱(۳۳٪)	بیماری قلبی مزمن
۰/۵۸	۸(۲۶٪)	۱۱(۳۳٪)	انفارکتوس میوکارد



نمودار ۱- نتایج بدست آمده با توجه به ویژگی‌های جمعیتی با روش PCR در مقایسه با ایمونوفلورسانس مستقیم

بحث و نتیجه‌گیری

معنی داری بین عفونت کلامیدیا پنومونیه و انفارکتوس حاد قلبی دیده شد. مطالعات قبلی انجام شده در ایران عفونت کلامیدیا پنومونیه و بیماری قلبی را به روش کشت یا الایزا و فقط بر روی نمونه‌های اتوپسی بررسی کردند ولی در بررسی حاضر علاوه بر نمونه‌های اتوپسی، نمونه‌های بیوپسی مریض به روش‌های PCR و ایمونوفلورسانس مطالعه شدند. میزان شیوع بدست آمده در مطالعه حاضر نسبت به مطالعات قبلی بطور محسوسی کمتر بوده است که این شاید بعلت حجم کم نمونه‌های مورد بررسی باشد.

دو نمونه از ۷ نمونه آئورت شکمی و ۵ نمونه از ۲۶ نمونه عروق کرونر با روش PCR یا ایمونوفلورسانس مثبت شدند. بر اساس

میزان شیوع کلامیدیا پنومونیه در نقاط مختلف جهان متفاوت است. به عنوان مثال میزان شیوع آن در هند ۱۰ درصد، ترکیه ۱۵ درصد، لهستان ۲۷ درصد و ژاپن ۶۲ درصد است (۱۴-۱۱). نتایج بدست آمده در این مطالعه مشابه نتایج به دست آمده در مطالعه انجام شده در ترکیه بود.

نتایج مطالعه‌ای که در سال ۱۳۸۶ در شیراز روی ۱۰۹ بیمار مبتلا به عروق کرونر با روش الایزا انجام شد، تیتراژ آنتی بادی اختصاصی بر ضد کلامیدیا پنومونیه (IgG و IgA) ابتلا به کلامیدیا را به ترتیب ۸۲٪ و ۲۲٪ نشان داد. همچنین در مطالعه مقدم (سال ۱۳۷۹) ارتباط

غیر سیگاری شایع تر بود. این نتیجه ممکن است این واقعیت را نشان دهد که افراد سیگاری بیشتر در معرض کلونیزه شدن کلامیدیا پنومونیه به عنوان یک ارگانسیم در دستگاه تنفسی می باشد. علاوه بر این میزان فشارخون بالا، چربی بالا، انفارکتوس میوکارد در گروه پنومونیه مثبت بیشتر بود، ولی از نظر آماری تفاوت معنی دار نداشتند ($p > 0.05$).

جالب اینکه یکی از شش نفر مثبت پنومونیه دارای هیچ یک از فاکتورهای خطر مرتبط با تصلب شریان نبود ولی در بقیه چندین فاکتور خطر وجود داشت. در نتیجه، توجه به اینکه فاکتورهای خطر متعددی به همراه تأثیرات ژنتیکی وجود دارد، بعید به نظر می رسد که عفونت تنها علت اصلی آترواسکلروز باشد. هر چند نقش این فاکتورهای خطر نو ظهور و روابط آنها با فاکتورهای خطر قدیمی، مانند فشار خون یا چربی بالا، ناشناخته باقی می ماند. مطمئناً با انجام مطالعات آینده نگر در مناطق مختلف جغرافیایی می توان نقش آنها، نوع عفونت و نوع بیماری را در بیمارانی که بایستی درمان شوند را بررسی کرد.

آمار بدست آمده نمی توان مکان خاصی را برای حضور کلامیدیا پنومونیه مشخص کرد ($p < 0.05$) (نمودار ۱). پس از آنژیوگرافی، شدت بیماری با شمارش تعداد عروق کرونر مبتلا مشخص شد (بیش از ۵۰٪ تنگی پلاک آترواسکلروتیک). نمونه هایی که از لحاظ کلامیدیا پنومونیه مثبت بودند بیشتر در بیمارانی دیده شد که سه بار یا بیشتر به بیماری عروق مبتلا شده بودند. با نتیجه به دست آمده این احتمال وجود دارد که این ارگانسیم در شدت آترواسکلروز نقش داشته باشد. با این حال، ما هیچ ارتباط معنی داری بین تعداد عروق مبتلا و قطعات استنتوتیک از یک طرف و از طرف دیگر، کلامیدیا پنومونیه مثبت پیدا نکردیم ($p = 0.02$). حضور پنومونیه در بیش از ۱۸٪ ضایعات آترواسکلروز و عدم حضور آن در عروق سالم نقش احتمالی آن را در آتروژنز تایید می کند. با این حال، عدم وجود آن در بیش از سه چهارم ضایعات نشان می دهد که این باکتری جزء ضروری فرآیند آترواسکلروز نمی باشند و ممکن است در شروع و یا پیشرفت آتروژنز نقش داشته باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که کلامیدیا پنومونیه در عروق کرونر افراد سیگاری نسبت به افراد

References

- 1- Sessa R, Di Pietro M, Schiavoni G, Petrucca A, Cipriani P, Zagaglia C, et al. Measurement of Chlamydia pneumoniae bacterial load in peripheral blood mononuclear cells may be helpful to assess the state of chlamydial infection in patients with carotid atherosclerotic disease. *Atherosclerosis* 2007; 195 (1): e224-30. PubMed PMID: 17575984.
- 2- Ebrahimi A, Nabipour I, Vahdat K, Jafari SM, Fouladvand M, Assadi M, et al. High sensitivity C-reactive protein is associated with the metabolic syndrome independent to viral and bacterial pathogen burden. *Diabetes Res Clin Pract* 2009; 84 (3): 296-302. PubMed PMID: 19362745.
- 3- Kaklikkaya I, Kaklikkaya N, Buruk K, Pulathan Z, Koramaz I, Aydin F, et al. Investigation of Chlamydia pneumoniae DNA, chlamydial lipopolisaccharide antigens, and Helicobacter pylori DNA in atherosclerotic plaques of patients with aortoiliac occlusive disease. *Cardiovasc Pathol* 2006; 15 (2): 105-9. PubMed PMID: 16533699.
- 4- Jha HC, Srivastava P, Divya A, Prasad J, Mittal A. Prevalence of Chlamydia pneumoniae is higher in aorta and coronary artery than in carotid artery of coronary artery disease patients. *Apmis* 2009; 117 (12): 905-11.
- 5- Rupp J, Kothe H, Mueller A, Maass M, Dalhoff K. Imbalanced secretion of IL-1beta and IL-1RA in Chlamydia pneumoniae-infected mononuclear cells from COPD patients. *Eur Respir J* 2003; 22 (2): 274-9. PubMed PMID: 12952260.
- 6- Zibaeenezhad MJ, Amanat A, Alborzi A, Obudi A. Relation of Chlamydia pneumoniae infection to documented coronary artery disease in Shiraz, Southern Iran. *Angiology* 2005; 56 (1): 43-8. PubMed PMID: 15678255.
- 7- Shirani S, Boroumand MA, Abbasi SH, Maghsoodi N, Shakiba M, Karimi A, et al. Preoperative carotid artery screening in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *Arch Med Res* 2006; 37 (8): 987-90. PubMed PMID: 17045115.
- 8- Verkooyen R P, Willemsse D, Hiep-van Casteren S C, Joulandan S A, Snijder R J, van den Bosch J M, van Helden H P, Peeters M F and Verbrugh H A (1998) Evaluation of PCR, culture, and serology for diagnosis of Chlamydia pneumoniae respiratory infections. *Journal of clinical microbiology*. 36 (8) 2301-7.
- 9- Garnett P, Brogan O, Lafong C and Fox C (1998) Comparison of throat swabs with sputum specimens for the detection of Chlamydia pneumoniae antigen by direct immunofluorescence. *Journal of clinical pathology*. 51 (4) 309-11.
- 10- Ridgway G L and Taylor-Robinson D (1991) Current

- problems in microbiology: 1. Chlamydial infections: which laboratory test? *Journal of clinical pathology*. 44 (1) 1-5.
- 11- Campbell L A, Kuo C C and Grayston J T (1998) Chlamydia pneumoniae and cardiovascular disease. *Emerging infectious diseases*. 4 (4) 571-9.
- 12- Iriz E, Cirak M Y, Engin E D, Zor M H, Erer D, Imren Y, Turet S and Halit V (2007) Effects of atypical pneumonia agents on progression of atherosclerosis and acute coronary syndrome. *Acta cardiologica*. 62 (6) 593-8.
- 13- Reszka E, Jegier B, Wasowicz W, Lelonek M, Banach M and Jaszewski R (2008) Detection of infectious agents by polymerase chain reaction in human aortic wall. *Cardiovascular pathology: the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*. 17 (5) 297-302.
- 14- Ouchi K, Fujii B, Kudo S, Shirai M, Yamashita K, Gondo T, Ishihara T, Ito H and Nakazawa T (2000) Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic and nonatherosclerotic tissue. *The Journal of infectious diseases*. 181 Suppl 3 S441-3.

Chlamydia pneumoniae infection in patients with atherosclerotic plaques

Mohammad Rostami Nejad¹, Farhad Lahmi², Ehsan Nazemalhosseini Mojarad¹,
Hossein Godarzi³, Hossein Ahmadi⁴, *Hossein Dabiri⁵

Received: 21 Apr 2013

Accepted: 24 Aug 2013

Abstract

Background: Previous studies showed that microbial infection such as *Chlamydia pneumoniae* is contributed to the development of atherosclerosis. This study evaluated the prevalence of *C. pneumoniae* in atherosclerotic plaques by PCR and immunofluorescence assay (IFA), and also it examined the correlation of disease severity and the presence of this bacterium.

Materials and Methods: In this descriptive study sixty four specimens, thirty three plaques in case group and thirty one plaques in control group were assessed in Tehran University of Medical Sciences affiliated hospitals. The plaques was assessed by PCR nor IFA method. The data was analyzed by SPSS and t-test and fisher exact test was used.

Results: Out of 33 case specimens, *C. pneumoniae* DNA and antigen were found in 6 (18%) and 7 (21%) of endarterectomy specimens, respectively. While none of control specimens was positive for *C. pneumoniae* either by neither PCR nor IFA method.

Conclusion: Respect to remarkable presence of *C. pneumoniae* in atherosclerotic tissues and its absence in healthy vessels supports the hypothesis that *C. pneumoniae* may play an important role in the development of atherosclerosis, especially in regions where infection is frequent but the exact mechanisms for high prevalence of atherosclerotic vascular disease are not fully understood.

Keywords: Chlamydophila pneumonia; Plaque, Atherosclerotic; Polymerase Chain Reaction; Fluorescent Antibody Technique

1- Researcher, Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Assistant Professor, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5- (*Corresponding Author) Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Tel: + 98 21 22432518 Email: elman1356@yahoo.com