

# Význam infekcie *Chlamydomphila pneumoniae* a cytomegalovírusom pre rozvoj karotických plátov

MUDr. Roman Sľško, PhD.<sup>1</sup>, MUDr. Ján Kazár, DrSc.<sup>2</sup>, MUDr. Ján Tomka, PhD.<sup>1</sup>, MUDr. Eva Kováčová, PhD.<sup>3</sup>, Mgr. Juraj Gašparovič<sup>2</sup>, MUDr. Katarína Daňová<sup>4</sup>, prof. MUDr. Vladimír Šefránek, PhD.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinika cievnej chirurgie, NÚSCH, a. s., Bratislava

<sup>2</sup> Oddelenie virológie, Slovenská zdravotnícka univerzita, Bratislava

<sup>3</sup> Virologický ústav, Slovenská akadémia vied, Bratislava

<sup>4</sup> Oddelenie klinickej biochémie, NÚSCH a. s., Bratislava

**Cieľ.** Vo venóznej krvi pacientov so stenózou karotídy sme sa snažili dokázať prítomnosť protilátok proti cytomegalovírusu (CMV) a *Chlamydomphila pneumoniae* (CP) metódou ELISA, ako aj genomickú DNA týchto mikroorganizmov pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). PCR sme použili tiež pre dôkaz CMV a CP v peroperačne odobratých kompletných karotických plátoch. Vo venóznej krvi pacientov a kontrolnej skupiny sme vyhodnocovali aj všeobecné markery zápalových prejavov – C reaktívny proteín (CRP) a interleukín 6 (IL-6). **Metodika.** Súbor 38 pacientov pred elektívnou operáciou – korekciou hemodynamicky významnej stenózy karotickej artérie – CEA sa skladal z 24 mužov a 14 žien, s priemerným vekom 67,6 roka (rozmedzie 43 – 86 rokov). Kontrolná skupina pacientov pozostávala zo 68 ľudí, 38 mužov a 30 žien, s priemerným vekom 40,4 rokov. Prítomnosť IgG špecifických anti-CMV protilátok sme detegovali pomocou Platelia™ CMV IgG a IgM ELISA kit (Bio Rad.). Ako pozitívne anti-CMV IgG sme hodnotili sérum obsahujúce 1,2 IU/ml. Anti-CP IgA a IgG sme dokazovali pomocou SeroCP IgA a IgG ELISA kit (Savyon Diagnostics Ltd, Izrael) s optickou denzitou 1,1 ako hraničnou hodnotou pozitivity. Detekciu IL-6 sme robili pomocou IL-6 ELISA kit (Imunotech, Francúzsko) s pozitívnou hodnotou 3 ng/L. CRP sme detegovali pomocou súpravy C-reactive Protein ELISA (Immundiagnostik, Nemecko) s pozitívnou vzorky od 3 mg/L. Priamy dôkaz prítomnosti CP a CMP sme stanovovali pomocou PCR tak zo vzoriek leukocytov z venóznej krvi ako aj z rozdrvených karotických plátov. **Výsledky.** Vo všetkých ukazovateľoch s výnimkou priameho dôkazu CP pomocou PCR bol štatisticky významný rozdiel medzi súborom našich pacientov a kontrolnou skupinou. Nepodarilo sa potvrdiť prítomnosť CP pomocou PCR vyšetrenia vo vzorkách krvi pacientov. Signifikantný štatistický rozdiel podľa Fischerovho exact testu vykázala 100 % prítomnosť anti-CMV protilátok u symptomatických pacientov, v porovnaní so 76,5 % u asymptomatickej skupiny ( $p = 0,03$ ). S tým však nekorešpondoval údaj priameho dôkazu CMV pomocou PCR v sére pacientov. Napriek opakovaným pokusom o čo najprecíznejšiu mechanickú úpravu materiálu z AS plátov, ako aj rovnaký spôsob DNA extrakcie, aký sme použili pri dôkaze CMV vo venóznej krvi, boli výsledky všetkých odobratých vzoriek negatívne. Musíme preto hodnotiť túto časť experimentu ako neúspešnú. **Záver.** Podarilo sa preukázať významne vyšší výskyt CMV v krvi pacientov operovaných pre AS postihnutie karotických artérií, v porovnaní s kontrolnou skupinou a významnú pozitívitu všeobecných zápalových markerov vo vyšetrovanej krvi. Signifikantná pozitivita protilátok proti CP pri zjavnej absencii priameho dôkazu CP v periférnych Le nás vedie ku konštatovaniu pravdepodobnej prítomnosti skríženej pozitivity s inými druhmi chlamýdií alebo môže podporiť teóriu o uplatnení infekcie CP v mladom veku vo včasnom štádiu AS.

**Kľúčové slova:** cytomegalovírus, *Chlamydomphila pneumoniae*, karotická endarterektómia, zápalové markery, CP a CMV protilátky.

## The importance of *Chlamydomphila pneumoniae* and cytomegalovirus infection in development of carotid plaques

**Objective.** To determine anti-cytomegalovirus (CMV) and anti-*Chlamydomphila pneumoniae* (CP) antibodies in comparison with inflammatory markers, to detect CP DNA and CMV DNA performed with polymerase chain reaction (PCR) in peripheral Leucocytes (Le) and in atherosclerotic carotid plaques in patients undergoing carotid endarterectomy. **Methods.** 38 patients undergoing carotid endarterectomy, 24 males and 14 females, mean age 67.6 roka (interval 43–86 years). Control group of 68 people, 38 males and 30 females, mean age 40.4 years. The presence of IgG specific anti-CMV antibodies was detected by Platelia™ CMV IgG a IgM ELISA kit (Bio Rad.). As positive anti-CMV IgG serum was that containing 1.2 IU/ml. Anti-CP IgA and IgG antibodies were detected by the SeroCP IgA and IgG ELISA kit (Savyon Diagnostics Ltd, Israel) with optical density 1.1 as a cut-off value. Detection of IL-6 was performed by a IL-6 ELISA kit (Imunotech, France) with a positive value 3 ng/L. CRP was detected by C-reactive Protein ELISA (Immundiagnostik, Germany) with a positive value 3 mg/L. All analyses were performed and calculated according to the manufacturer's instructions. Detection of CP DNA and CMV DNA was performed with PCR in peripheral leukocytes and crushed carotid plaques. **Results.** In all measured aspects there was a significant difference between group of patients and a control group. We did not succeed, however, to prove a clear evidence of CP DNA in peripheral leukocytes in the patients group. We found also significant difference in anti-CMV IgG antibodies that was 100.0% in symptomatic group in comparison to 76.5% positivity in asymptomatic patients ( $p=0.03$ ). However, this was not corresponding to finding of CMV DNA in peripheral leukocytes as detected by PCR. Despite of repeated attempts to treat the AS plaques and using the same method of DNA extraction as applied to venous blood, all the samples were found to be negative. For this reason, this part of our experiment we evaluate as unsuccessful. **Conclusion.** We succeeded to prove a clear significant evidence of CMV DNA in peripheral leukocytes of patients with carotid disease (65.7%) in comparison to control group (less than 3%) ( $p=0.001$ ). This was associated with finding of significant positivity of inflammatory markers in peripheral blood. Significant positivity of IgG and IgA anti-CP antibodies ( $p=0.03$  and  $p=0.007$ , respectively) in patients group did not correspond with a detection of CP DNA in peripheral leukocytes. This could be explained with possible crossed immunity to other *Chlamydomphila* varieties or could support a theory of CP infection as an initiation of atherosclerotic process in younger age.

**Key words:** Cytomegalovirus, *Chlamydomphila pneumoniae*, carotid endarterectomy, inflammatory markers, anti-CP and anti-CMV antibodies.

## Úvod

Myšlienka infekčného pôvodu aterosklerózy (AS) je stará viac ako 100 rokov. Objavila sa už v roku 1800 a bola opätovne vyslovená začiatkom 20. storočia Oslerom a inými americkými vedcami (1, 2). V roku 1970 bol súčasne s objavením monoklonálnych buniek prítomných v pláte vyslovený názor na účasť vírusov pri tejto transformácii (3). Okrem toho výskumy u kurčiat dokázali možnosť indukovať vznik AS lézií po infikovaní herpetickým vírusom (4). Následne v 80. rokoch 20. storočia skupina fínskych vedcov dokázala signifikantné zvýšenie protilátok proti *Chlamydomphila pneumoniae* (CP) u pacientov s rizikom akútnej koronárnej príhody (5). Početné štúdie potvrdili **vzájomný vzťah medzi infekčnými agens a aterosklerózou** (6). Okrem tradičných rizikových faktorov aterosklerózy, ako sú stres, fajčenie, diabetes mellitus, hypercholesterolémia a hypertenzia je v súčasnom období snaha početných štúdií odhaliť iné rizikové faktory, zohrávajúce významnú úlohu v etiopatogenéze aterosklerózy. Chronický zápal a infekčné agens sú potenciálnymi rizikovými faktormi na pri rozvoji AS.

## Ciele štúdie

Na súbore pacientov pred plánovanou operačnou liečbou karotickej tepny pre prítomnosť hemodynamicky závažnej stenózy sme sa snažili dokázať sérologickú pozitivitu prítomnosti anti-CMV a anti-CP protilátok v krvi. Zo vzoriek venóznej krvi, ako aj z peroperačne odobratých kompletných karotických plátov sme sa snažili izolovať genomickú DNA CMV a CP a dokazovať ju pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). Vo venóznej krvi pacientov a kontrolnej skupiny sme vyhodnocovali aj všeobecné markery zápalových prejavov – C-reaktívny proteín (CRP) a interleukín 6 (IL-6). Prierezová štúdia sa realizovala v spolupráci so Slovenskou zdravotníckou univerzitou (SZU) v Bratislave a Virologickým ústavom Slovenskej akadémie vied v Bratislave. Z klinického hľadiska sme sa snažili skorelovať výsledky výskumu so symptomatológiou plátov.

## Charakteristika súboru

Do našej prospektívnej štúdie bolo zaradených 38 pacientov čakajúcich na elektívnu operáciu – korekciu hemodynamicky významnej stenózy (70 a viac %) karotickej artérie – CEA. Z 38 pacientov bolo 24 mužov a 14 žien, s priemerným vekom 67,6 roka (rozmedzie 43 – 86 rokov). Súbor bol následne porovnávaný s kontrolnou skupinou pacientov, ktorú tvorilo 68 ľudí, 38 mužov a 30 žien, s priemerným vekom 40,4 rokov. Išlo o skupinu náhodne vybraných ľudí, bez zjavnej klinickej prítomnosti AS postihnutia, všetci boli mladší ako 60 rokov. Vo všetkých skupinách boli vylúčení pacienti s aktívnou infekciou a systémovým zápalovým ochorením. Z pochopiteľných príčin sa dali korelovať iba výsledky krvného odberu. Sledovaný súbor 38 pacientov bol následne z klinického hľadiska rozdelený na skupinu symptomatických a asymptomatických pacientov. Pri symptomatických pacientoch išlo o klinicky diagnostikovanú náhlu cievnu mozgovú príhodu (NCMP), s CT korelátom v príslušnej mozgovej hemisfére, tranzitórny ischemický atak (TIA) alebo prítomnosť *amaurosis fugax*. Oba prejavy museli byť diagnostikované neurológom. Detailnejšie delenie v rámci podskupín symptomatických pacientov pri danej veľkosti súboru nemalo opodstatnenie. V skupine symptomatických pacientov bolo prítomných 14 mužov a 7 žien, s priemerným vekom 67,7 roka (rozmedzie 43 – 84 roka). Skupinu klinicky asymptomatických pacientov tvorilo 10 mužov a 7 žien, s priemerným vekom 67,5 roka (rozmedzie 53 – 86 roka). V rámci celej skupiny a oboch podskupín boli sledované aj niektoré významné rizikové faktory a pridružené ochorenia, ako ischemická choroba srdca (ICHS), diabetes mellitus (DM), hyperlipoproteinémia (HLP), chronická renálna insuficiencia (CHRI) a fajčenie. Podrobný prehľad spomenutých údajov je v tabuľke 1. Pomer medzi mužmi a ženami v oboch porovnávaných skupinách, celkový súbor a kontroly, respektíve symptomatickí a asymptomatickí pacienti, je v podstate identický. Neúmerne je zastúpenie diabetikov a výskyt hyperlipoproteinémie v skupine pacientov

(37,0 % a 76,0 %), v porovnaní s kontrolným súborom (0 % a 14,7 %). Naproti tomu počet fajčiarov je v oboch porovnávaných súboroch približne identický. Pri komparácii súboru symptomatických a asymptomatických pacientov je mierne vyšší počet diabetikov u asymptomatickej skupiny (47,0 % vs. 29,0 %), naopak mierne vyšší výskyt HLP je u symptomatického súboru (81,0 % vs. 70,0 %). Počet fajčiarov je takmer identický.

## Výsledky a vyhodnotenie

Prítomnosť IgG špecifických anti-CMV protilátok sme detegovali pomocou Platelia™ CMV IgG a IgM ELISA kit (Bio Rad.). Ako pozitívne anti-CMV IgG bolo hodnotené sérum obsahujúce 1,2 IU/ml. Anti-CP IgA a IgG sme dokazovali pomocou SeroCP IgA a IgG ELISA kit (Savyon Diagnostics Ltd, Izrael) s optickou denzitou 1,1 ako hraničnou hodnotou pozitivitu. Dôkaz IL-6 sme robili pomocou IL-6 ELISA kit (Imunotech, Francúzsko) s pozitívnou hodnotou 3 ng/L. CRP sme detegovali pomocou C-reactive Protein ELISA (Immundiagnostik, Nemecko) s pozitívnou vzorky od 3 mg/L. Všetky testy sme robili a vyhodnocovali podľa odporúčaní výrobcov (7). Priamy dôkaz prítomnosti CP a CMV sme stanovovali pomocou PCR tak zo vzoriek venóznej krvi ako aj z rozdrvených karotických plátov.

Na vyhodnotenie a štatistickú analýzu pri porovnávaní jednotlivých súborov sme použili Fischerov exact test.

Ako ukazuje tabuľka 2 a graf 1, vo všetkých ukazovateľoch s výnimkou priameho dôkazu *Chlamydomphila pneumoniae* pomocou PCR bol štatisticky signifikantný rozdiel medzi súborom našich pacientov a kontrolnou skupinou. Naopak, nepodarilo sa nám potvrdiť priamym dôkazom prítomnosť *Chlamydomphila pneumoniae* pomocou PCR vyšetrenia vo vzorkách súboru krvi pacientov. To však nekorešponduje s nálezom signifikantne vyšších hodnôt dokázaných protilátok. Môžeme to vysvetliť prítomnosťou protilátok voči iným druhom chlamýdií, ktoré majú s CP skříženú reaktivitu. Zo spomínaných vyšetřovaných parametrov

**Tabuľka 1.** Vlastnosti súboru, pridružené ochorenia a rizikové faktory.

Spolu	M	Ž	priemerný vek	ICHS	DM	HLP	fajčenie	CHRI
<b>38</b>	24	14	67,6	29 / 76 %	14 / 37 %	29 / 76 %	21 / 55 %	6 / 16 %
Kontrola	M	Ž	priemerný vek	ICHS	DM	HLP	fajčenie	CHRI
<b>68</b>	38	30	40,4	0	0	10 / 14,7 %	33 / 48,5 %	0
Symptomatickí pacienti	M	Ž	priemerný vek	ICHS	DM	HLP	fajčenie	CHRI
<b>21</b>	14	7	67,7	15 / 71 %	6 / 29 %	17 / 81 %	11 / 52 %	3 / 14 %
Asymptomatickí pacienti	M	Ž	priemerný vek	ICHS	DM	HLP	fajčenie	CHRI
<b>17</b>	10	7	67,5	14 / 82 %	8 / 47 %	12 / 70 %	10 / 59 %	3 / 18 %

**Tabuľka 2.** Porovnanie a štatistické vyhodnotenie súboru a kontroly.

Spolu	CP IgG	CP IgA	CMV Abs	CRP	IL-6	CP PCR	CMV PCR
38	29 / 76,3 %	32 / 84,2 %	34 / 89,4 %	37 / 97,4 %	32 / 84,2 %	3 / 7,89 %	25 / 65,7 %
p =	0,03	0,007	0,023	0,001	0,009	0,082	0,001
Kontrola	CP IgG	CP IgA	CMV Abs	CRP	IL-6	CP PCR	CMV PCR
68	36 / 52,9 %	32 / 47,1 %	46 / 67,6 %	14 / 20,6 %	39 / 52,9 %	0	2 / 2,96 %

**Tabuľka 3.** Porovnanie a štatistické vyhodnotenie symptomatických a asymptomatických pacientov v rámci súboru.

Symptomatickí	CP IgG	CP IgA	CMV Abs	CRP	IL-6	CP PCR	CMV PCR
21	17 / 80,9 %	18 / 85,7 %	21 / 100 %	21 / 100 %	20 / 95,2 %	2 / 9,52 %	11 / 52,4 %
p =	0,7	1	0,03	0,45	0,07	1	0,11
Asymptomatickí	CP IgG	CP IgA	CMV Abs	CRP	IL-6	CP PCR	CMV PCR
17	12 / 70,6 %	14 / 82,3 %	13 / 76,5 %	16 / 94,1 %	12 / 70,6 %	1 / 5,88 %	14 / 82,3 %

vykazuje štatisticky najvýznamnejší rozdiel prítomnosť CMV metódou jeho priameho dôkazu. Vo vzorkách pacientov bol prítomný až v 65,7 % v porovnaní iba s necelými 3 % u kontrolnej skupiny pacientov ( $p = 0,001$ ). Ak skorelujeme tieto výsledky s pozitívou všeobecných zápalových markerov vo vyšetrovanej krvi zistíme, že pozitívna hodnota CRP bola prítomná u 96,0 % pacientov, ktorí vykázali pozitívnu prítomnosť CMV pomocou jeho priameho dôkazu. Zo zápalových markerov bol špecifickejší CRP, ktorý bol v súbore pacientov prítomný až v 97,4 % prípadov v porovnaní s kontrolou (20,6 %) ( $p = 0,001$ ). Interleukín-6 bol v súbore pacientov pozitívny v 84,2 % v porovnaní s 52,9 % v kontrolnej skupine ( $p = 0,009$ ). Úplne nesignifikantné bolo vyšetrenie na priamy dôkaz CP v krvi, keď v súbore pacientov bol prítomný v 7,89 % a v kontrolnej skupine sa nevyskytol.

V záujme ešte väčšieho klinického významu štúdie sme sa pokúsili skorelovať a porovnať aj

výsledky z hľadiska symptomatológie karotických plátov. Súbor pacientov sme preto rozdelili na dve podskupiny – klinicky asymptomatickú a klinicky symptomatickú. Dostali sme počtom približne identické skupiny, ktoré sa z hľadiska veku a pohlavia výrazne neodlišovali

Ako uvádza tabuľka 3 a graf 2, porovnanie prítomnosti IgA a IgG anti-CP v sére oboch podskupín, ako symptomatickej, tak aj asymptomatickej, je takmer identické. Mierne zvýšená zápalová aktivita je na strane symptomatických pacientov. Je charakterizovaná 100,0 % pozitívou CRP u symptomatickej skupiny v porovnaní s 76,5 % u asymptomatickej a 95,2 % prítomnosťou pozitívneho IL-6 v symptomatickej skupine v porovnaní s 70,6 % u asymptomatickej. Signifikantný štatistický rozdiel podľa Fischerovho exact testu vykázala 100,0 % prítomnosť protilátok proti CMV u symptomatických pacientov, v porovnaní so 76,5 % u asymptomatickej skupiny ( $p = 0,03$ ). S tým však nekorešpon-

doval údaj priameho dôkazu CMV pomocou PCR v krvi pacientov. Rozdiel medzi symptomatickou a asymptomatickou skupinou vyšiel nielen ne-signifikantný, ale percentuálne viac sa podarilo preukázať prítomnosť CMV v periférnych leukocytoch asymptomatických pacientov. Môžeme iba vysloviť hypotézu, že infekcia CMV je jedným zo spúšťacích alebo potenciujúcich mechanizmov pre vznik instabilných plátov v karotických artériách, pričom u asymptomatickej skupiny môže postupom času po prebehnuti infekcii CMV dôjsť k zmene štruktúry AS plátu. Zmenený plát sa následne môže prejavovať klinickou symptomatológiou.

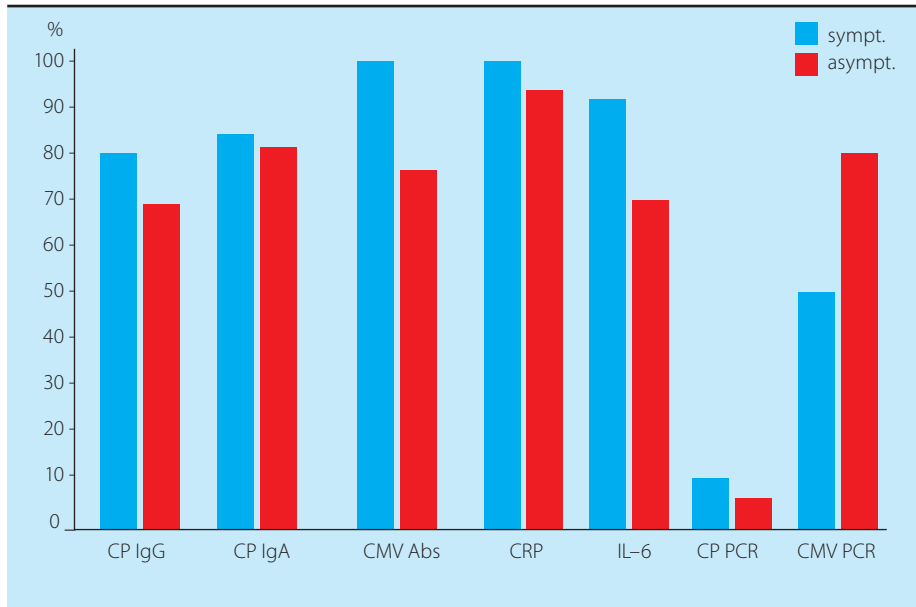
Súčasťou výskumu bolo aj vyhodnotenie všetkých sledovaných parametrov po spracovaní karotických plátov odobratých počas elektívnych operácií. Získané karotické pláty boli v prvej fáze mechanicky rozdrvené na čo najmenšie partikuly a následne rozpustené vo fyziologickom roztoku, pričom ďalší postup pri izolácii genomickej DNA bol zhodný ako pri izolácii z venóznej krvi. Napriek opakovaným pokusom o čo najprecíznejšiu mechanickú úpravu materiálu boli výsledky všetkých odobratých vzoriek negatívne. Musíme preto hodnotiť túto časť experimentu ako neúspešnú a nemôžeme vyvodit' žiadne relevantné závery. Metodika izolácie genomickej DNA s priamym dôkazom infekčného agens na základe identifikácie presne definovanej nukleotidovej sekvencie vo vzorkách z venóznej krvi prebiehala bez problémov. Z daného vyplýva, že výskum v tejto oblasti zlyhal na mechanickej časti prípravy roztoku.

## Diskusia, závery iných štúdií

Úloha infekčných agens v patogenéze aterosklerózy a ich jednoznačné označenie ako ďalších rizikových faktorov je stále zdrojom kontroverzných diskusií (7). Za obdobie posledných rokov bolo publikovaných viacero prác o vplyvoch infekcie a zápalu na vznik AS (8, 9). Musíme povedať, že na jednej strane existujú štúdie potvrdzujúce jednoznačnú prítomnosť anti-CMV protilátok u jedincov s AS postihnutím (10, 1), na strane druhej iné štúdie svojimi výsledkami tento vzťah popierajú (12, 13). Situácia v oblasti výskumu vplyvu CP na vznik AS je ešte výraznejšie komplikovaná (7). Leven vo svojej súčasnej práci zhrnul poznatky posledných výskumov, pričom závery smerujú k popretiu kauzálneho vzťahu CP a aterosklerózy (14). Z uvedeného vyplýva, že potvrdenie hypotézy o infekčnom pôvode aterosklerózy po mnohých rokoch od jej prvej formulácie nebolo pre dostatočné množstvo priamych dôkazov zrealizované (8). Jedným z hlav-

**Graf 1.** Grafické znázornenie štatistického vyhodnotenia súboru a kontroly.

**Graf 2.** Grafické znázornenie štatistického vyhodnotenia symptomatických a asymptomatických pacientov.



ných faktov svedčiacich z klinického hľadiska proti tejto hypotéze sú nie veľmi povzbudivé výsledky antibiotickej liečby postihnutých pacientov. Liečba infekcií spôsobených CP makrolidovými antibiotikami nepriniesla v redukcii kardiovaskulárneho rizika u pacientov želaný efekt.

Jednou z prvých **klinických štúdií** v antibiotickej liečbe a prevencii AS bola **ACADEMIC** (*Azithromycin in Coronary Artery Disease*) (15): 302 seropozitívnych pacientov na CP bolo randomizovaných s azitromycínom alebo placebom po obdobie troch mesiacov. Po 6 mesiacoch azitromycín znížil celkový index štyroch systémových zápalových markerov (CRP, Interleukín 1 a 6, TNF- $\alpha$ ) v porovnaní s placebom. Titre CP protilátok zostali nezmenené. Klinické prejavy boli sledované nasledujúce dva roky, pričom zníženie rizika infarktu myokardu bolo medzi porovnávanými skupinami nesignifikantné.

**Štúdia WIZARD** (*Weekly Intervention with Zithromax for Atherosclerosis and its Related Disorder*) (16) zahrnula viac ako 7 724 pacientov s anamnézou infarktu myokardu a séropozitívnosťou na CP randomizovaných na tri mesiace s liečbou azitromycínom (600 mg/týždeň) alebo placebom. Sledovaným kritériom bol recidivujúci infarkt myokardu, smrť v dôsledku infarktu myokardu, nestabilná *angina pectoris* alebo nutnosť opakovanej revaskularizácie myokardu v priebehu troch rokov. Nebol evidovaný žiadny benefit pri liečbe antibiotikom v porovnaní s placebom. Neskoršie analýzy preukázali možný úžitok počas a krátko po antibiotickej liečbe v zmysle 33% redukcie infarktu a smrti.

**V štúdií** fínskych autorov **CLARIFY** (*Clarithromycin in Acute Coronary Syndrome Patients in*

*Finland*) (17) bolo randomizovaných 148 pacientov s akútnym non-Q infarktom myokardu alebo instabilnou anginou pectoris po období 3 mesiacov. Hlavnými sledovanými znakmi bol infarkt myokardu, smrť v dôsledku infarktu, respektíve prejavy instabilnej anginy pectoris. Po ukončení sledovania (priemerne 555 dní, bolo v skupine liečenej klaritromycínom pozitívnych 16 pacientov a v skupine placebo 27, čo bolo štatisticky vyhodnotené ako signifikantný rozdiel. Tento síce povzbudivý výsledok však nemohol byť považovaný za jednoznačný dôkaz benefitu antibiotickej prevencie.

**V štúdií ISAR-3** (*Intracoronary Stenting and Antibiotic Regimen*) (3) sa skúmal vplyv roxitromycínu v prevencii restenózy po zavedení koronárneho stentu. Súbor tvorilo 1010 randomizovaných pacientov po úspešnej implantácii koronárneho stentu. Roxitromycín (300 mg denná dávka), respektíve placebo bolo aplikované 4 týždne. Sledovaný bol počet restenóz väčších ako 50% na koronarografii vykonávanej 6 mesiacov po primárnej implantácii. Druhým sledovaným kritériom bola nutnosť chirurgickej revaskularizácie v období jedného roka po stentingu. V prvom sledovanom znaku nebol signifikantný rozdiel v miere restenóz medzi placebom a antibiotikom (29,0% placebo, 31,0% roxitromycín), rovnako nesignifikantná bola nevyhnutnosť revaskularizácie (17,0% placebo, 19,0% roxitromycín). Bola však zistená súvislosť medzi titrom CP protilátok. Roxitromycín bol efektívny u pacientov s vysokým titrom protilátok a neúčinný pri nízkych titroch (18). Antibiotikum by teda mohlo byť selektívne účinné u pacientov s aktívnou infekciou.

Všetky uvedené antibiotické štúdie vo svojom počiatku pôsobili optimisticky v možnosti terapeutického ovplyvnenia a prevencie kardiovaskulárnych ochorení, avšak do dnešného dňa neexistuje dostatočné množstvo klinických štúdií podporujúcich ich klinické využitie (19). Môžeme preto predpokladať, že CP sa uplatňuje v ranej fáze formovania AS plátu, keď sú pacienti ešte v mladom veku. K dnešnému dňu sú preto známe dva mechanizmy, ktoré spájajú pôsobenie infekčných agens so vznikom aterosklerózy. Po prvé, indukovaním imunitnej skříženej reakcie proti HSP produkovanom endotelom ako odpoveď na tradičné rizikové faktory a v druhom rade priamym infikovaním buniek endotelu a následne indukovaním exprese HSP na povrchu bunky s aktiváciou imunitného systému. Oba tieto mechanizmy môžu fungovať súčasne, pričom druhý z nich by mohol byť zodpovedný za ranú fázu vzniku AS (8). Pôsobenie oboch mechanizmov sa dá zlúčiť s pôsobením hyperlipidémie a ostatných známych rizikových faktorov. Z terapeutického a profylaktického hľadiska by preto mala byť antibiotickej liečba aplikovaná v mladom veku. Vakcinácia proti rôznym mikroorganizmom (najmä voči CP) v mladom veku sa zdá byť sľubnou cestou.

**Kaperonis** a kolektív gréckych autorov sa vo svojej práci z roku 2006 pokúsil nájsť súvislosť medzi infekciou CP a zápalom karotického plátu v súčinnosti s klinickými prejavmi – cerebrovaskulárnou symptomatológiou (20). Súbor tvorilo 78 pacientov s karotickou endarterektómiou, pričom 46 bolo symptomatických a 32 asymptomatických. Predoperačne boli skúmané hodnoty CRP, fibrinogénu, TNF- $\alpha$  a titre anti IgA a IgG protilátok proti CP v sére. Počas operácie bol odobratý karotický plát, následne imunohistochemicky vyšetrený na prítomnosť CP a bola stanovená aj koncentrácia TNF- $\alpha$  v tkanive. Po štatistickom vyhodnotení súboru autori konštatovali signifikantnú koreláciu prítomnosti hypertenzie, sérovej hladiny fibrinogénu, anti IgA CP protilátok v sére a prítomnosť CP a zvýšené hodnoty TNF- $\alpha$  v plátoch u symptomatických pacientov mužského pohlavia.

**Hunter** sa so svojimi spolupracovníkmi v štúdií z roku 1999 pokúsil nájsť vzájomný vzťah medzi stabilitou karotického plátu a prítomnosťou CMV (21). Pri výskume analyzovali karotické pláty z hľadiska oxidatívneho poškodenia skúmaním prítomnosti a distribúcie indukovaného oxidu dusného (iNOS), nitrotyrozínu a prítomnosti infekcie CMV. Do štúdie bolo zaradených 51 pacientov s karotickou endarterektómiou, z ktorých bolo 37 primárnych lézií



a 14 restenóz po predchádzajúcej endarterektómii. Karotické pláty boli vyšetrené histologicky a imunohistochemicky so špecifickými protilátkami proti  $\alpha$ -aktínu hladkých svalových vlákien, makrofágom (CD68), T-lymfocytom (CD3) a leukocytovému antigénu – DR. Súbor 28 vzoriek od pacientov bol vyšetrený na prítomnosť iNOS a nitrozínu imunohistochemicky a *in situ* hybridizáciou. Súbor 23 vzoriek bol vyšetrený na protilátky proti CMV a PCR na priamy dôkaz CMV v pláte. Primárne karotické pláty sa v 29 prípadoch javili ako komplexné heterogénne celulárne pláty a v 8 prípadoch ako relatívne acelulárne fibrózne pláty. Desať zo 14 restenotických plátov tvorili buď komplexné alebo fibrotické lézie, zostávajúce štyri mali charakter myointimálnej hyperplázie. Makrofágy (CD68) boli prítomné vo všetkých vzorkách bez ohľadu na histologickú štruktúru. T-Lymfocyty (CD3) boli prítomné vo všetkých heterogénnych plátoch a zriedkavo vo fibróznych plátoch. iNOS a nitrozínová imunoreaktivita bola detegovaná v makrofágoch a hladkých svalových bunkách vo všetkých heterogénnych a fibróznych plátoch a vo dvoch z štyroch vzoriek s myointimálnou proliferáciou. Prítomnosť iNOS a nitrozínu v plátoch koreloval s klinickou symptomatológiou pri 80,0% primárnych karotických plátov a 62% plátov pri restenózach. CMV bol detegovaný iba v dvoch z 23 vzoriek (9,0%).

Sessa a jeho talianski kolegovia v roku 2003 skúmali prítomnosť CP na základe jej priameho DNA dôkazu u symptomatických karotických stenóz (22). Do súboru bolo zaradených 51 pacientov, ktorí podstúpili karotickú endarterektómiu. Z nich bolo 18 pacientov symptomatických a 33 klinicky asymptomatických. Prítomnosť CP bola detegovaná v karotickom pláte, lymfatických uzlinách a v mononukleároch z periférnej krvi pacientov pomocou PCR. Protilátky anti-CP boli detegované imunohistochemicky. Priamy dôkaz CP v pláte zaznamenali u 44,4% pacientov so symptomatickou stenózou a u 30,3% s asymptomatickou stenózou. V lymfatických uzlinách bola CP detegovaná v 33,3% u symptomatických proti 18,2% u asymptomatických pacientov. Oba výsledky vyšli štatisticky nesignifikantné ( $p = 0,48$ , resp.  $0,19$ ). Prítomnosť CP v mononukleároch z periférnej krvi bola signifikantne vyššia ( $p = 0,01$ ) u symptomatických pacientov (72,2%) v porovnaní s asymptomatickými (30,3%). Sérologické testy boli v súlade so zistením priameho dôkazu v mononukleároch. Pozitívne IgA anti CP protilátky boli signifikantne vyššie u symptomatických pacientov v porovnaní s asymptomatickými ( $p = 0,02$ ).

Prítomnosť CP, CMV a vírusu *Herpes simplex* (HSV) sa snažili vo vzorkách z mozgového tka-

niva dokázať vo svojej práci Voorend s kolegami v roku 2008 (23). Pri autopsii u 70 pacientov odoberali vzorky mozgového tkaniva, konkrétne vzorky z *arteria basilaris*, *a. cerebri media* a tkanivo bazálnych ganglií a periventriculárneho mozgového tkaniva. Neuropatologické zmeny boli pozorované po farbení hematoxilín-eozínom a priamy dôkaz jednotlivých infekčných agens bol detegovaný PCR. Priamy dôkaz CP, CMV alebo HSV v *arteria basilaris* respektíve *arteria cerebri media* nebol pozitívny v žiadnej z vyšetrených vzoriek napriek nálezu stredne až závažných AS zmien na artériách. Iba dve vzorky boli pozitívne na nález CMV v bazálnych gangliách a CP v periventriculárnom tkanive.

Infekcia a zápalový proces hrajú významnú úlohu v patogenéze aterosklerózy. Sérové markery HSV, CP, CMV a ďalšie môžu prognózovať riziko vzniku kardiovaskulárnych ochorení spolu s ďalšími rizikovými faktormi (24). V budúcnosti by mohlo byť sledovanie sérologických a zápalových markerov infekcie užitočné pre identifikáciu pacientov so zvýšeným kardiovaskulárnym rizikom a ich následnú agresívnejšiu liečbu (25). Vakcinácia pred expresiou klinických príznakov by mohla byť logickým krokom (26). V súčasnosti ešte neexistuje dostatočne veľká evidencia na odporúčenie rutinného podávania antibiotickej liečby v prevencii kardiovaskulárnych ochorení v každodennej klinickej praxi (25).

## Záver

V našej štúdií sa nám podarilo preukázať **signifikantne vyšší výskyt prítomnosti CMV v sére pacientov operovaných pre AS postihnutie karotických artérií** v porovnaní s kontrolnou skupinou. Vo vzorkách pacientov bol prítomný v až 65,7% v porovnaní iba s necelými 3% u kontrolnej skupiny pacientov. Súbežne sme pozorovali **štatisticky významnú a signifikantnú pozitívitu všeobecných zápalových markerov** vo vyšetrovanej krvi. Pozitívna hodnota CRP bola prítomná u 96% pacientov, ktorí vykázali pozitívitu na prítomnosť CMV pomocou jeho priameho dôkazu. Zo zápalových markerov bol špecifickejší CRP, ktorý bol v súbore pacientov prítomný až v 97,4% prípadov v porovnaní s kontrolnou skupinou (20,6%). IL-6 bol v súbore pacientov pozitívny v 84,2% v porovnaní s 52,9% v kontrolnej skupine. Problematické sa zdá porovnávanie vyšetrovanej skupiny pacientov a kontrolného súboru z pohľadu veku, ktorý je sám o sebe významným rizikovým faktorom AS. Bolo by však nereálne nájsť kontrolnú skupinu v identickom vekovom rozmedzí, ako bol vyšetrovaný súbor

pri úplnej absencii AS postihnutia organizmu. **Signifikantná pozitivita protilátok proti CP** pri zjavnej absencii priameho dôkazu CP v periférnych Le nás vedie ku konštatovaniu **pravdepodobnej prítomnosti skříženej pozitivity s inými druhmi chlamýdií alebo môže podporiť teóriu o uplatnení infekcie CP v mladom veku** vo včasnom štádiu AS a tvorby AS plátov, ako sme spomenuli v diskusii. Pretrvávajúci zvýšený titer protilátok by bol v zhode s týmto tvrdením. Oba závery korešponujú s viacerými podobnými štúdiami spomenutými v diskusii. Podarilo sa nám ďalej dokázať signifikantne vyšší výskyt CMV v periférnych leukocytoch symptomatologických pacientov s postihnutím karotických artérií. Najväčšou slabinou nášho súboru je nízky počet vyšetrených pacientov. Aby sme však mohli vyhlásiť CMV za ďalší rizikový faktor AS, musí dané závery potvrdiť väčšie množstvo obdobných štúdií s identickým záverom.

## Literatúra

- Osler W. Disease of the arteries. In: Osler W, ed. Modern medicine: its theory and practise. Philadelphia, PA. Lea a Febiger 1908: 426–447.
- Gibbon RV. Germs, Dr. Billings and the theory of focal infection. Clin Infect Dis 1998; 27: 627–633.
- Benditt EP, Benditt JM. Evidence of monoclonal origin of human atherosclerotic plaques. Proc Natl Acad Sci USA 1973; 70: 1753–1766.
- Fabricant CG, Fabricant J. Atherosclerosis induced by infection with Marek's disease herpes virus in chickens. Am Heart J 1999; 138: 465–478.
- Saikk P et al. Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. Lancet 1988; 2: 983–986.
- Nicoletti A et al. Functionality of specific immunity in atherosclerosis. Am Heart J 1999; 138: 438–443.
- Kazar J et al. Anti-cytomegalovirus antibodies and other atherosclerosis risk factors in patients with cardiovascular diseases. J Geriatr Cardiol 2007; 4: 131–134.
- Blasi C et al. The role of infectious agents in pathogenesis and evaluation of atherosclerosis. Ann Ital Med Int 2004; 19: 249–261.
- Kol A et al. Infectious agents and atherosclerosis: current perspectives and unsolved issues. Ital Heart J 2004; 5: 350–357.
- Blum A et al. Anti-Cytomegalovirus IgG antibody titer in patients with risk factors to atherosclerosis. Clin Exp Med 2003; 3: 157–160.
- Eryol NK et al. Are the high levels of cytomegalovirus antibodies a determinant in the development of coronary artery disease? Int Heart J 2005; 46: 205–209.
- Danesh J. Coronary heart disease, Helicobacter pylori, dental disease, Chlamydia pneumoniae and cytomegalovirus: meta-analyses of prospective studies. Am Heart J 1999; 138: 434–437.
- Schiele F et al. Cytomegalovirus, Chlamydia pneumoniae and Helicobacter pylori IgG antibodies and restenosis after stent implantation: an angiographic and intravascular ultrasound study. Heart 2001; 85: 304–311.
- Leven MM et al. Involvement of Chlamydia pneumoniae in atherosclerosis: more evidence for lack of evidence. J Clin Microbiol 2005; 43: 19–24.
- Anderson JL et al. Randomised secondary prevention trial of Azithromycin in patients with coronary artery disease and serological

evidence for Chlamydia pneumoniae infection: The Azithromycin in Coronary Artery Disease: Elimination of Myocardial Infection with Chlamydia (ACADEMIC) study. *Circulation* 1999; 99: 1540–1547.

16. Grayston JT. Secondary prevention antibiotic treatment trials for coronary artery disease. *Circulation* 2000; 102: 1742–1743.

17. Sinisalo J et al. Effect of 3 months of antimicrobial treatment with clarithromycin in acute non-q-wave coronary syndrome. *Circulation* 2002; 105: 1555–1560.

18. Neumann F et al. Treatment of Chlamydia pneumoniae infection with Roxithromycin and effect on neointima proliferation after coronary stent placement (ISAR-3): a randomised double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2001; 357: 2085–2089.

19. Corrado E, Novo S. Role of inflammation and infection in vascular disease. *Acta Chir Belg* 2005; 105: 567–579.

20. Kaperonis EA et al. The association of carotid plaque inflammation and Chlamydia pneumoniae infection with cerebrovascular symptomatology. *J Vasc Surg* 2006; 44: 1198–1204.

21. Hunter GC et al. The contribution of inducible nitric oxide and cytomegalovirus to the stability of complex carotid plaque. *J Vasc Surg* 1999; 30: 36–50.

22. Sessa R et al. Chlamydia pneumoniae DNA in patients with symptomatic carotid atherosclerotic disease. *J Vasc Surg* 2003; 37: 1027–1031.

23. Voorend M et al. Limited role for C. pneumoniae, CMV and HSV-1 in cerebral large and small vessel atherosclerosis. *Open Neurol J* 2008; 2: 39–44.

24. Pesonen E et al. Dual role of infections as risk factors for coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2007; 192: 370–375.

25. Abbas MA et al. Microbial risk factors of cardiovascular and cerebrovascular diseases: Potential therapeutical options. *Open Neurol J* 2008; 2: 20–24.

26. Thorpe C et al. Discovery of vaccine antigen that protects mice from Chlamydia pneumoniae infection. *Vaccine* 2007; 25: 2252–2260.

#### MUDr. Roman Slyško

Klinika cievnej chirurgie NÚSCH, a. s.  
Pod Krásnou hôrkou 1  
833 48 Bratislava 37  
slyskoroman@yahoo.com



## Renata Podstatová: Hygiena a epidemiologie pro ambulantní praxi

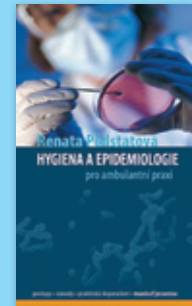
V publikaci jsou uvedeny možnosti vzniku a šíření infekčních onemocnění v ambulantní praxi a základní zásady hygienicko-epidemiologických opatření v ambulancích, včetně stomatologických pracovišť. Dále jsou v ní shrnuta nejdůležitější opatření v ordinacích týkající se příjmu pacientů, dezinfekce, sterilizace, manipulace s biologickým materiálem a s prádlem, likvidace odpadu, používání osobních ochranných prostředků, používání bariérové ošetrovací techniky, očkování, úklidu, kvality vody a ovzduší.

Mezi nejvýznamnější kroky v prevenci nozokomiálních i profesionálních nákaz v ordinaci patří také dezinfekce rukou vždy před a po zdravotnických výkonech u pacientů, po manipulaci s biologickým materiálem a vždy při uplatňování bariérového ošetrovacího režimu, aby se zabránilo vzniku a šíření infekce.

Všechny tyto zásady musejí být popsány v provozních řádech a také důsledně dodržovány ve všech ambulancích. Součástí publikace je i vzorový provozní řád všeobecné ambulance.

Publikace je určena lékařům všech specializací, hygienikům a epidemiologům v terénu.

Maxdorf 2010, edice Jessenius, ISBN: 978-80-7345-212-4, 142 s.



## Martin Vokurka, Jan Hugo a kolektiv: Velký lékařský slovník, 9. vyd.

Deváté rozšířené a aktualizované vydání obsahuje 41 000 hesel ze všech klinických i teoretických oborů současné medicíny. Slovník je svou odbornou úrovní vhodný pro lékaře, zdravotníky a studenty medicíny, svou srozumitelností pak vychází vstříc tradičnímu zájmu české veřejnosti o medicínu. Lékařům slovník umožňuje držet krok se závratným tempem vědeckého pokroku. Molekulární a buněčná biologie mění medicínu prakticky před očima, lékařská terminologie se ročně rozšiřuje o 30 až 60 nových pojmů, které jsou často spojeny také s novými mechanismy a principy. Vydání obsahuje i rozsáhlou přílohu normálních laboratorních hodnot.

Maxdorf 2009, edice Jessenius, ISBN: 978-80-7345-202-5, 1160 s.



## Anna Jedličková: Antimikrobiální terapie v každodenní praxi 3. rozšířené vydání

Od zavedení prvního a dodnes neznámějšího antibiotika – penicilinu – uplynulo více než 50 let. Počet běžně užívaných antibiotik dnes dosáhl několika set a je možné bez nadsázky říci, že lze najít antibiotikum proti každé bakterii. Z velkého počtu dostupných antibiotik však pro lékaře vyplývají zvýšené nároky na výběr, neboť užití nesprávného antibiotika přináší značná rizika. Již třetí vydání publikace naši přední odbornice v oblasti antimikrobiální terapie klade důraz na praktičnost a rychlou orientaci.

Maxdorf 2009, edice Jessenius, ISBN: 978-80-7345-208-7, 664 s.



**Objednávejte:** písmenem – Maxdorf, Na Šejdru 247, 142 00 Praha 4, telefonicky – 004202 4101 1681, e-mailom – knihy@maxdorf.cz.

[www.maxdorf.cz](http://www.maxdorf.cz)