

5. årsoppgave i Stadium IV, medisinstudiet

Det medisinske fakultet

Universitetet i Tromsø

August 2002

**C-reaktivt protein og *Chlamydia pneumoniae*
antistoffer hos pasienter med angiografisk
verifisert koronar hjertesykdom.**

Petter Bernhardsen, kull-97

Veileder

Overlege Dag S. Halvorsen, Mikrobiologisk avdeling, UNN

Forord

Hjerte-kar sykdom er en viktig årsak til morbiditet og mortalitet. Selv om man i flere tiår har forsket intensivt på årsakene til slik sykdom, sitter man fortsatt igjen med mange ubesvarte spørsmål. Inflammasjon i karveggen antas å spille en viktig rolle i utvikling av slik sykdom, og infeksjon er foreslått som en mulig årsak til initiering av denne inflammasjonen.

Overlege Dag S. Halvorsen ved Mikrobiologisk avdeling, UNN, har i flere år jobbet med diagnostikk av *Chlamydia pneumoniae*, og denne mikrobens assosiasjon til hjerte-kar sykdom. Vårt samarbeid startet allerede våren 1999, og resultatet foreligger nå i form av denne studien. Jeg vil med dette takke for all hjelp og støtte han har gitt meg, det har vært en lærerik og interessant prosess. Jeg håper og tror at vi vil fortsette samarbeidet også etter at jeg har fullført mine medisinstudier.

Jeg vil ellers takke avdelingsoverlege Dr. med Tore J. Gutteberg ved Mikrobiologisk avdeling (UNN) for økonomisk støtte og for å ha stilt avdelingens fasiliteter til disposisjon under prosjektarbeidet. Takk også til overlege Dr. med Pål Gunnes ved Kardiologisk avdeling (UNN), bioingeniør Jon Terje Berg ved Mikrobiologisk avdeling (UNN), bioingeniør Edel Olsen ved Avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin (UNN) og professor Dr. med Inger Njølstad ved Institutt for samfunnsmedisin (Universitetet i Tromsø).

Petter Bernhardsen

Tromsø, august 2002

Innholdsfortegnelse

Forord	2
Innholdsfortegnelse	3
Sammendrag	4
Innledning	6
Målsetning	11
Materialer og metoder	12
Studiedesign	12
Angiografiprosedyre	15
Serumanalyser	15
CRP-analyse	15
Analyse av IgG-antistoffer mot <i>C. pneumoniae</i>	16
Analyse av IgA-antistoffer mot <i>C. pneumoniae</i>	17
Statistiske analyser	17
Finansiering av studien	18
Godkjenning av studien	18
Resultater	19
Diskusjon	22
Konklusjon	31
Referanser	32
Tabeller	41
Figurer	44

Sammendrag

Ischemisk hjertesykdom skyldes aterosklerose i et eller flere koronarkar, og koronar angiografi regnes som gullstandard i diagnostikk av denne tilstanden. Inflammasjon står sentralt i dagens forklaringsmodeller for utvikling av aterosklerose, og C-reaktivt protein (CRP) regnes som den mest følsomme inflammasjonsmarkøren. Man kan i dag kvantitere CRP innenfor det såkalte normalområdet ($< 5\text{mg/l}$). Økte CRP-nivåer ses hos personer med ischemisk hjertesykdom, og antas å kunne bidra i risikovurderinger av slik sykdom. Det diskuteres om kroniske infeksjonstilstander kan være involvert i utviklingen av aterosklerose, og *Chlamydia pneumoniae* er en av de mest aktuelle kandidatene i dag.

Målsetningen med studien var å sammenligne seroprevalens og antistoffnivå av IgA- og IgG-antistoffer mot *C.pneumoniae* samt nivå av CRP hos angiograferte pasienter uten stenoser i sine koronarkar ($n=34$), hos pasienter med henholdsvis 1-åre ($n=57$), 2-åre ($n=49$) og 3-års sykdom ($n=55$) og hos koronar-bypass (ACB) opererte pasienter som ble angiografert grunnet residivangina ($n=42$).

Pasientene var i alderen 40-60 år, og var alle henvist til koronar angiografi som ledd i utredning av brystmerter. De ble identifisert ved gjennomgang av angiografibeskrivelser fra 1993-96 ved Universitetssykehuset Nord-Norge (UNN). Pasientene ble ytterligere karakterisert ved gjennomgang av sykehusets pasientjournaler. Serum ble identifisert ved søk i serumbanken ved Mikrobiologisk avdeling, UNN. Antistoffer ble analysert med enzyme immunoassay (EIA)-metodikk. CRP ble analysert med nefelometri-metodikk. Forskjeller mellom grupper ble analysert med t-tester, variansanalyser samt kji-kvadrat tester.

Gruppene var godt matchet, men det var høyest andel kvinner i gruppen 0-åre og lavest andel i gruppen ACB-opererte. \log_{10} [CRP]-nivåene var $-0,060$, $0,103$, $0,110$, $0,198$ og $0,339$ i de 5 gruppene, og pasientene med angiografisk verifisert koronarsykdom hadde signifikant ($p=0,012$) høyere nivå sammenlignet med de uten signifikante stenoser i sitt koronartre. Det var ingen signifikante forskjeller mellom gruppene med 1-, 2- og 3-års sykdom, men de ACB-opererte hadde signifikant høyere ($p=0,006$) \log_{10} [CRP]-nivå sammenlignet med de øvrige koronarpasientene. Ikke-røykerne hadde signifikant ($p=0,004$) lavere \log_{10} [CRP]-nivå enn både x-røykerne og røykerne. Man fant ingen forskjeller i seroprevalens eller nivå av IgA- og IgG-antistoffer mot *C.pneumoniae* mellom gruppene.

Våre resultater viser at pasienter med angiografisk verifisert koronar hjertesykdom har høyere basalt CRP-nivå sammenlignet med pasienter uten signifikante stenoser, samt at ACB-opererte med residivangina har høyere CRP-nivå enn ikke bypass-opererte koronarpasienter. Det er også en tendens i materialet til at CRP stiger med økende alvorlighetsgrad av koronarsykdom. Årsaken til disse forskjellene kan vi ikke forklare, men det ser ut til at røyking er en konfunderende faktor ved sammenligning av basale CRP-nivåer. Resultatene viser også at prevalens og nivå av IgA- og IgG-antistoffer mot *C.pneumoniae* er like uansett angiografisk vurdert alvorlighetsgrad av koronar hjertesykdom.

Innledning

Ischemisk (koronar) hjertesykdom er den vanligste form for hjertesykdom i den vestlige verden, og kan manifestere seg på flere ulike måter: Stabil angina pectoris, ustabil angina pectoris, akutt hjerteinfarkt, ischemisk hjertesvikt, arytmier og plutselig død. Årsaken til ischemisk hjertesykdom er i de aller fleste tilfeller aterosklerose i et eller flere koronarkar [1].

Angina pectoris (AP) er et klinisk begrep som brukes for å beskrive brystmerter som følge av relativ oksygenmangel i myokard [1]. Stabil AP skyldes aterosklerose i et eller flere koronarkar. Dette gir obstruksjon av karlumen og nedsatt evne til å forsyne myokard med arterielt blod og dermed også oksygen, spesielt i situasjoner der myokards oksygenbehov øker. Diagnostikk av AP baserer seg hovedsakelig på anamnese, klinisk undersøkelse, EKG, arbeids-EKG og eventuelt myokardscintigrafi og koronar angiografi.

Koronar angiografi regnes som gullstandarden i diagnostikken av koronar hjertesykdom [2]. Ved denne prosedyren sprøyter man jodholdig kontrastmedium selektivt inn i høyre og venstre koronararterie, og ved hjelp av såkalt cinèangiografi får man visualisert koronartreets anatomi samt størrelsen og alvorlighetsgraden av eventuelle stenotiske lesjoner. Hjertet forsynes med arterielt blod via to hovedarterier, *a.coronaria sinistra* som deler seg i sine to hovedgrener *ramus interventricularis anterior* og *ramus circumflexus*, og *a.coronaria dextra*. På bakgrunn av dette kan koronar hjertesykdom klassifiseres som 1-åre, 2-åre eller 3-åre sykdom [2]. Gradering av stenoser er tradisjonelt blitt gjort ved visuell inspeksjon [2, 3]. En

50 % reduksjon i lumen diameter, svarende til 75 % reduksjon i tverrsnittareal, regnes som en signifikant stenose [1, 2, 3].

Aterosklerose er ansvarlig for over halvparten av alle dødsfall i den vestlige verden [4]. Aterosklerose karakteriseres av en lokalisert fortykkelse av tunica intima som forsnevrer karlumen og gir svekkelse av den underliggende tunica media. Kliniske manifestasjoner av aterosklerose ses hyppigst ved affeksjon av mellomstore muskulære arterier som koronararteriene, carotisarteriene, *a.basilaris*, *a.vertebralis* og arterier i underekstremiteter. Når det gjelder patogenesen til aterosklerose, eksisterer det mange ulike teorier, men den mest anerkjente er nok den såkalte "response to injury" hypotesen [4]. Fokal endotelskade gir endotelial dysfunksjon med økt utsiving av LDL og modifisert (oksidert) LDL til karveggen. Lipider akkumuleres i karveggen, og det oppstår en kronisk inflammasjonstilstand som involverer endotelceller, monocytter/makrofager (MΦ), T-lymfocytter og glatte muskelceller (SMC). Ved inflammasjon frigjøres et utall signalsubstanser fra de ulike involverte cellene. Dette fører blant annet til proliferasjon av SMC i intima med dannelse av ekstracellulær matriks (kollagen og grunnsubstans). Lipidene som akkumuleres i karveggen blir i stor grad tatt opp i MΦ, som etter hvert omdannes til såkalte "foam cells" eller skumceller. Ateromatøse plaque kan klassifiseres som fibrøse (harde) eller lipoide (bløte) [5]. Man antar at lipoide plaque representerer nyere lesjoner enn de fibrøse, og at det er en naturlig utvikling av ateromatøse plaque som går fra lipoide til fibrøse lesjoner. Begge består i hovedsak av en subendotelial bindevevshinne med en underliggende ateromatøs kjerne. Bindevevshinnen inneholder collagen, SMC, MΦ og T-lymfocytter. Kjernen er oppbygd av store mengder lipid, cellerester og ekstracellulær matriks med varierende mengder kollagen. Fibrøse plaque inneholder relativt mer kollagen i kjernen sammenlignet med de lipoide, samtidig som det er større grad av lokal inflammasjon i de lipoide lesjonene. Dette gjør lipoide plaque mer

ustabile enn fibrøse, med større risiko for ruptur med påfølgende trombose og okklusjon av karlumen.

Følgende faktorer har tradisjonelt blitt forbundet med økt risiko for utvikling aterosklerose [5]: Økende alder, kjønn ($\sigma > \text{♀}$), rase (kaukasiere > mørkhudede), sigarettøyking, diabetes mellitus, hypertensjon og hyperkolesterolemi. I tillegg til disse "tradisjonelle" risikofaktorene, har man de siste årene blitt klar over at økt nivå av akutt fase reaktanter og kroniske infeksjonstilstander kan være assosiert med økt risiko for aterosklerose.

Ved all form for inflammasjon og vevsskade frigjøres cytokiner fra det involverte vevet. Disse cytokinene stimulerer leveren til produksjon av såkalte akutt-fase proteiner (AFP), og av disse regnes C-reaktivt protein (CRP) som den mest sensitive inflammasjonsmarkøren. Normalkonsentrasjon av CRP i serum er < 5 mg/l [6], og halveringstiden i blod er ca. 19 timer [7]. Måling av CRP benyttes hovedsakelig til påvisning av akutte bakterielle infeksjoner og for å skille mellom bakterielle og virale infeksjoner. Til dette formålet er man interessert i økninger i CRP-nivå utover normalkonsentrasjonen, og tradisjonelle målemetoder for CRP har derfor en nedre påvisningsgrense på ca. 5 – 8 mg/l. Med utviklingen av nye og mer sensitive metoder, kan man nå kvantitere CRP innenfor det såkalte normalområdet, og dette benevnes high sensitive CRP- eller ultrasensitiv CRP-metodikk. I klinikken har dette per i dag liten praktisk verdi, kanskje bortsett fra til påvisning av akutt sykdom hos nyfødte [8, 9]. Nyere studier har vist at ultrasensitiv CRP-metodikk kan være nyttig ved risikovurderinger av hjerte-kar sykdom. Økte basale CRP-verdier ses hos personer med koronar hjertesykdom [10, 11, 12, 13] og antas å kunne predikere fremtidige koronare hendelser hos disse [14, 15, 16, 17]. Basalt CRP-nivå er også beskrevet brukt for å predikere fremtidig risiko for koronar hjertesykdom hos initialt friske individer [7, 18, 19, 20].

C.pneumoniae er en hyppig årsak til øvre og nedre luftveisinfeksjoner hos mennesker [21]. Infeksjonene er vanligvis asymptomatiske eller milde, og sjeldnere av alvorlig karakter [22]. Infeksjon med *C.pneumoniae* er svært vanlig, og det anslås at om lag 50 % av verdens voksne befolkning har antistoffer mot denne bakterien [23, 24]. Alle *Chlamydiae* har en tendens til å forårsake kronisk infeksjon, og reinfeksjon er vanlig [25]. Rutinemessig diagnostikk av luftveisinfeksjoner med *C.pneumoniae* baserer seg per i dag på påvisning av antistoffer (IgA, IgG og IgM) i serum [26]. Det er også mulig å påvise selve mikroben i luftveissekret, enten ved dyrkning eller Polymerase chain reaction (PCR). Primærinfeksjon med *C.pneumoniae* karakteriseres av en IgM dominert respons, fulgt av en forsinket IgG respons og svak eller fraværende IgA respons. Reinfeksjon karakteriseres av fravær av IgM respons og en rask IgA og IgG respons. Kronisk infeksjon antas å være assosiert med høye, stabile nivåer av IgA og IgG [25]. *C.pneumoniae* er medlem av familien *Chlamydiaceae* som har en genus, *Chlamydiae*. *Chlamydiae* er ubevegelige, gram negative staver, som har en cellevegg som ligner andre gram negative staver, blant annet inneholder den lipopolysakkarider (LPS), men den mangler et peptidoglycanlag. *Chlamydiae* har en unik livssyklus og eksisterer i to morfologiske former: elementærlegemet og retikulærlegemet. Elementærlegemet er den infeksjøsø, ekstracellulære formen, som mangler evnen til replikasjon. Retikulærlegemet er den intracellulære, ikke-infeksjøsø formen, som er metabolsk aktiv og har evnen til replikasjon. Vertsceller for retikulærlegemet er hovedsakelig epitelceller og MΦ [27].

Flere studier har vist at det eksisterer en mulig sammenheng mellom kronisk infeksjon med *C.pneumoniae* og risiko for utvikling av aterosklerose og koronar hjertesykdom. De studier som foreligger per i dag bygger på seroepidemiologiske, morfologiske og eksperimentelle data. Saikku et. al. viste i 1988 at prevalens av *C.pneumoniae* antistoffer var signifikant høyere hos pasienter med koronar hjertesykdom sammenlignet med friske kontroller [25].

Flere senere studier har vist det samme [28, 29, 30, 31, 32, 33]. Lignende funn er også gjort hos pasienter med cerebrovaskulær sykdom [34]. Mikroorganismens mulige rolle i patogenesen til aterosklerose underbygges også av at *C.pneumoniae* (DNA, antigen eller levende organismer) kan påvises i ateromatøse plaque i koronararterier [35, 36, 37] og i halskar. [37, 38, 39]. Av eksperimentelle studier er det i første rekke dyremodeller som har vist en mulig sammenheng mellom infeksjon med *C.pneumoniae* og utvikling av aterosklerose. Det er vist at infeksjon med *C.pneumoniae* akselerer den aterosklerotiske prosessen hos kaniner [40] og mus [41], og at *C.pneumoniae* induserer inflammasjon i aorta hos kaniner [42]. Det er også vist at behandling med antibiotika reverserer *C.pneumoniae* induert aterosklerose hos kaniner [40, 43]. Resultater fra prospektive intervensjonsstudier med behandling av koronarpasienter med makrolidantibiotika [44, 45, 46], har ikke gitt konklusive resultater, og det er usikkert om resultatene fra dyremodellene kan overføres direkte til mennesker.

Målsetning

Studien inkluderer pasienter som var henvist til koronar angiografi som ledd i utredning av koronar hjertesykdom. Målsetningen var å undersøke om det forelå forskjeller i basalt CRP-nivå hos angiograferte pasienter uten signifikante stenoser i sine koronarkar sammenlignet med pasienter med 1-åre, 2-åre og 3-åre sykdom samt ACB-opererte pasienter angiografert på grunn av residivangina. Videre ønsket jeg å undersøke om det forelå forskjeller i seroprevalens og nivå av *C.pneumoniae* IgA- og IgG-antistoffer mellom de samme gruppene.

Materialer og metoder

Studiedesign

Studien er en tverrsnittstudie. Utvalget av pasienter består av kvinner og menn i alderen 40-60 år som fikk utført koronar angiografi ved Regionsykehuset i Tromsø (nå Universitetssykehuset Nord-Norge) i perioden 1/1-93 – 31/12-96. Ingen av pasientene, bortsett fra de ACB-opererte, hadde fått utført koronar angiografi tidligere, og alle ble angiografert i en stabil fase av sin koronarsykdom. Alle pasientene var bosatt i Nordland, Troms eller Finnmark. Pasientene ble fortløpende identifisert ved gjennomgang av angiografibeskrivelser ved Kardiologisk laboratorium, UNN. Ut fra beskrivelsene ble pasientene fordelt til 5 grupper. Gruppen 0-åre bestod av pasienter uten signifikante stenoser i sine koronarkar, gruppene 1-åre, 2-åre og 3-åre bestod av pasienter med signifikante stenoser i henholdsvis 1, 2 og 3 av hjertets hovedarterier eller deres grener, og gruppen ACB-opererte bestod av pasienter som hadde gjennomgått koronar-bypass operasjon og som ble reangiografert på grunn av residivangina.

Inklusjonskriterier:

- Henvist til koronar angiografi som ledd i utredning av koronar hjertesykdom
- Alder mellom 40 og 60 år på angiografitidspunktet
- Første gangs angiografi for pasienter i gruppene 0-, 1-, 2- og 3-åre
- Første gangs angiografi etter gjennomgått koronar-bypass operasjon for pasienter i gruppen ACB-opererte

Eksklusjonskriterier

- Manglende serumprøve tatt i forbindelse med den aktuelle angiografien
- Manglende pasientjournal
- Diabetes mellitus
- Familiær hyperlipidemi
- Hypertyreose
- Hypotyreose
- Kronisk nyresvikt
- Kronisk leversykdom
- Revmatisk sykdom
- Inflammatorisk tarmsykdom
- Aktiv cancersykdom
- Tidligere gjennomgått PTCA (gjaldt for pasientene i gruppene 0-, 1-, 2- og 3-åre)
- Akutt hjerteinfarkt eller klinisk verifisert episode med ustabil angina pectoris siste 12 uker før den aktuelle angiografien
- Innleggelse i sykehus med annen akutt sykdom siste 12 uker før den aktuelle angiografien

Man ønsket i primærutvalget å inkludere 50 – 70 pasienter i hver gruppe og så mange som mulig skulle være kvinner.

Primærutvalget bestod av 320 pasienter hvorav 50 i gruppen 0-åre, 69 i gruppen 1-åre, 68 i gruppen 2-åre, 69 i gruppen 3-åre og 64 i gruppen ACB-opererte.

I alt 49 pasienter ble ekskludert grunnet manglende serumprøve tatt i forbindelse med den aktuelle angiografien.

Blant dem man fant serumprøve på, totalt 271 pasienter, ble sykehusets (UNN) pasientjournaler fremskaffet og gjennomgått, og følgende data registrert: Bostedsfylke, årsak til utredning, venstre ventrikkel ejsksjonsfraksjon, resultat av arbeids-EKG, diagnostisert hypertensjon, tidligere hjerteinfarkt, tidligere innlagt med ustabil angina pectoris, tidligere hjerteoperert, tidligere PTCA, tidligere perifer karkirurgi, tidligere apopleksi/TIA, kjent familiær hyperlipidemi, familiær belastning av hjerte/kar sykdom, kjent diabetes mellitus, kjent kronisk lungesykdom, kjent kronisk nyresvikt, kjent kronisk leversykdom, kjent revmatisk sykdom, kjent tyroideasykdom, annen kjent relevant sykdom (akutt eller kronisk), røykeanamnese, medikamentbruk, samt blodtrykk og serum-kolesterol på angiografitidspunktet.

Til sammen ble 34 pasienter ekskludert etter journalgjennomgang. 4 pga. gjennomgått hjerteinfarkt i løpet av de siste 12 uker, 7 pga. klinisk verifisert episode med ustabil angina siste 12 uker, 9 pga. diabetes mellitus, 5 pga. revmatisk sykdom, 1 på grunn av nyoppdaget cancer, 2 pga. familiær hyperkolesterolemi, 2 pga. kronisk inflammatorisk tarmsykdom, 1 pga. kronisk nyresvikt, 1 pga. innleggelse med aortadisseksjon siste 12 uker og 1 pga. innleggelse med bakteriell pneumoni siste 12 uker. I tillegg ble 1 pasient ekskludert fordi pasientjournalen ikke lot seg fremskaffe.

Totalt 237 pasienter ble inkludert i studien, hvorav 34 i gruppen 0-åre, 57 i gruppen 1-åre, 49 i gruppen 2-åre, 55 i gruppen 3-åre og 42 i gruppen ACB-opererte. Serum fra disse pasientene ble analysert for CRP samt *C.pneumoniae* IgA og IgG antistoffer.

Angiografiprosedyre

Koronar angiografi ble utført i henhold til standardisert metodikk. Et spesialisert intravaskulært kateter føres opp i aortaroten via *a.femoralis*, *aorta descendens* og *arcus aortae*. Kateterspissen føres så inn i ostiet til henholdsvis høyre og venstre koronararterie. Jodholdig kontrastmedium sprøytes inn i de respektive koronararterier og arterietreet visualiseres ved hjelp av cinéangiografi og 35 mm film. Tolkning av røntgenfilmen gjøres ved visuell inspeksjon. En stenose er signifikant når den gir 50 % reduksjon i lumen diameter. Majoriteten av angiografiprosedyrene ble utført av overlege dr. med. Pål Gunnes ved Kardiologisk laboratorium, UNN.

Serumanalyser

Alle pasienter som får utført koronar angiografi ved UNN blir rutinemessig serologisk screenet for antistoffer mot Hepatitt C virus, Cytomegalovirus, HIV og Hepatitt B virus (core) samt for Hepatitt B virus surface antigen. Disse analysene blir utført ved Mikrobiologisk avdeling. Alle sera som blir analysert ved denne avdelingen blir rutinemessig frosset ned ved – 20 °C, og prøvematerialet benyttet i studien ble funnet ved søk i denne serumbanken. Serumprøvene benyttet i studien hadde således vært nedfrosset i fra 6-9 år.

CRP-analyse

Til analysering av CRP ble det benyttet nefelometrimetodikk fra Dade Behring [47], med nedre deteksjonsgrense for CRP på 0,16 mg/l. Polystyrenpartikler dekket med monoklonale

antistoffer mot CRP agglutineres ved tilstedeværelsen av CRP i prøvematerialet (serum). Intensiteten av lysspredningen målt med et nefelometer er avhengig av CRP-innholdet i prøvematerialet. CRP-konsentrasjonen bestemmes ut fra en standardkurve som beregnes ved hjelp av en fortynningsrekke av standard med kjent CRP-konsentrasjon. Denne metodikken kan beregne CRP-konsentrasjoner som ligger innenfor det tradisjonelle normalområdet (<8 mg/l), og kalles for High Sensitivity CRP. Analysen ble utført av bioingeniør Edel Olsen ved Avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin, UNN.

Analyse av IgG-antistoffer mot *C.pneumoniae*

Til serologisk analyse av IgG-antistoffer mot *C.pneumoniae* ble det benyttet EIA-metodikk fra Labsystems [48] som benytter antigen i form av elementærlegemer hvor lipopolysakkaridene er fjernet. Serum innkuberes i mikrotiterbrønner dekket med *C.pneumoniae* antigener. Eventuelle IgG-antistoffer mot *C.pneumoniae* i prøven vil binde seg til antigenene i mikrotiterbrønnene. Etter påfølgende vaskeprosedyre tilsettes peroxidase konjugert sau anti-humant IgG (konjugat). Etter ny inkubasjon og påfølgende vaskeprosedyre tilsettes et fargeløst substrat som består av hydrogenperoxid (H_2O_2) inneholdende tetrametylbenzidin (TMB). Tilstedeværelsen av enzymet peroxidase fra bundet konjugat gir fargereaksjon i substratet. Fargereaksjonen stoppes ved tilsetning av syre (H_2SO_4), og avleses så ved hjelp av fotometri. Fargeintensiteten er direkte proporsjonal med antistoffkonsentrasjonen i prøven. Borderline og positiv kontroll, samt blank og kalibrator ble kjørt i hvert oppsett. Resultatet uttrykkes i såkalte Enzyme immunounits (EIU) og tolkes som følger:

EIU < 30	Negativ
$30 \leq \text{EIU} \leq 45$	Grenseverdi
EIU > 45	Positiv

I tillegg til produsentens grenseverdier valgte vi å benytte oss av de hyppigst brukte grenseverdier i litteraturen, det vil si $\text{EIU} \geq 32$ samt $\text{EIU} \geq 64$.

Analyse av IgA-antistoffer mot *C.pneumoniae*

Til serologisk analyse av IgA-antistoffer mot *C.pneumoniae* ble det benyttet EIA-metodikk fra LabSystems [49] som benytter samme antigen som IgG-testen. Testprosedyren er i realiteten identisk med IgG-analysen, men her benyttes peroxidase konjugert sau anti-humant IgA som konjugat. Resultatet uttrykkes i EIU og tolkes som følger:

EIU < 8	Negativ
$8 \leq \text{EIU} \leq 12$	Grenseverdi
EIU > 12	Positiv

Også her benyttet vi i tillegg de hyppigst brukte grenseverdiene i litteraturen, det vil si $\text{EIU} \geq 16$ samt $\text{EIU} \geq 32$.

Statistiske analyser

Til de statistiske analysene ble programpakken Epi Info 6 versjon 6.04d benyttet [50]. Til fremstilling av diagrammer ble Microsoft Excel regneark [51] benyttet. Forskjeller mellom grupper ble analysert ved hjelp av t-test samt variansanalyse for kontinuerlige variable og kji-kvadrat test for kategoriske variable. Signifikansnivået ble satt til 5 %. For å sammenligne

flere enn to grupper ble ANOVA og kji-kvadrat test benyttet. For å sammenligne to grupper ble to-utvalgs t-test benyttet. Både CRP-verdier og antistoff-titre var positivt skjevfordelt, dataene ble derfor logtransformert forut for de statistiske analysene.

Finansiering av studien

Studien er gjennomført ved hjelp av midler fra Det Medisinske Fakultet, Universitetet i Tromsø, samt fra Mikrobiologisk avdeling, UNN.

Godkjenning av studien

Studien er godkjent av Regional Komité for Medisinsk Forskningsetikk.

Resultater

Totalt 237 pasienter ble inkludert i studien, hvorav 34 i gruppen 0-åre, 57 i gruppen 1-åre, 49 i gruppen 2-åre, 55 i gruppen 3-åre og 42 i gruppen ACB-opererte. Tabell 1 angir generelle karakteristika for deltakerne i de forskjellige gruppene. Det var signifikante forskjeller i kjønnsfordeling mellom gruppene, med størst andel kvinner i gruppen 0-åre og minst i gruppen ACB-opererte. Gruppene var godt matchet med hensyn på alder. Gruppen 3-åre hadde signifikant høyere serum-kolesterol enn de øvrige gruppene. Det var ingen signifikante forskjeller med tanke på andelen røykere mellom gruppene, men tallene i tabell 1 antyder likevel at det er flere røykere/x-røykere i gruppene med angiografisk verifisert koronarsykdom. Når det gjelder medikamentbruk var det forskjeller på gruppene. Det var færrest brukere av statiner og acetylsalisylsyre (ASA) i gruppen 0-åre. Det var færrest pasienter med gjennomgått hjerteinfarkt i gruppen 0-åre, og flest i gruppen ACB-opererte. Blant de ACB-opererte var gjennomsnittlig tid fra operasjon til reangiografi grunnet residivangina 5,9 år (minimum 0,5 år, maksimum 16 år).

Kjønnsespesifikke analyser er utført for alle data i studien, men på grunn av lavt antall kvinner i hver enkelt gruppe har vi valgt å ikke presentere disse resultatene.

$\text{Log}_{10}[\text{CRP}]$ -nivået blant kvinnene var 0,093 og blant mennene 0,164 og det var ikke signifikant ($p=0,274$) forskjell mellom kjønnene.

$\text{Log}_{10}[\text{CRP}]$ -nivåene var henholdsvis $-0,060$, $0,103$, $0,110$, $0,198$ og $0,339$ i de 5 gruppene (tabell 2 og figur 1), og det var signifikante forskjeller ($p=0,001$) mellom gruppene. Ved

innbyrdes sammenligning av gruppene med 1-, 2-, og 3-åre sykdom fant man ingen signifikante ($p=0,397$) forskjeller i \log_{10} [CRP]-nivåer. Gruppene med 1-, 2- og 3-åresykdom sett under ett ($n=161$), hadde signifikant ($p=0,012$) høyere \log_{10} [CRP]-nivå enn gruppen 0-åre og signifikant ($p=0,006$) lavere enn de ACB-opererte.

Blant brukerne av ASA ($n=165$) var \log_{10} [CRP]-nivået 0,154 og blant de som ikke brukte ASA var nivået 0,123 ($n=72$), og det var ikke signifikant ($p=0,619$) forskjell mellom disse gruppene.

Det var ingen signifikant forskjell i \log_{10} [CRP]-nivå mellom brukerne ($n=49$) og ikke-brukerne ($n=188$) av statiner (0,183 vs. 0,135).

I totalmaterialet var \log_{10} [CRP]-nivået blant ikke-røykerne ($n=56$) – 0,016, blant x-røykerne ($n=86$) 0,166 og blant røykerne ($n=94$) 0,223 (figur 2), og det var signifikante forskjeller ($p=0,004$) i \log_{10} [CRP]-nivå mellom disse subpopulasjonene i studien. X-røykerne hadde signifikant ($p=0,097$) høyere \log_{10} [CRP]-nivå enn ikke-røykerne, men ikke signifikant lavere enn røykerne.

Seroprevalens av IgG og IgA antistoffer mot *C.pneumoniae* ble beregnet ved fire forskjellige grenseverdier for hver antistoffklasse. Seroprevalens i totalmaterialet var for IgG henholdsvis 71,3 %, 69,6 %, 60,8 % og 44,7 % ved hver av de valgte grenseverdier. For IgA var tilsvarende prevalenser henholdsvis 71,7 %, 51,1 %, 44,3 % og 18,1 %.

Det var signifikante forskjeller i seroprevalens mellom kjønnene i totalmaterialet. For IgG ved grenseverdi $EIU \geq 32$ var seroprevalens 55,6 % blant kvinnene og 74,7 % blant mennene

($p=0,007$). For IgA ved grenseverdi $EIU \geq 16$ var seroprevalens 20,6 % blant kvinnene og 52,9 % blant mennene ($p<0,001$). Tilsvarende forskjeller ses også ved de andre grenseverdiene. Det var også signifikante forskjeller i antistoffnivåer mellom kvinner og menn. IgG-nivået ($\log_{10}[EIU]$) var 1,554 blant kvinnene og 1,770 blant mennene ($p<0,001$), tilsvarende verdier for IgA ($\log_{10}[EIU]$) var 0,948 og 1,193 ($p<0,001$).

Det var ingen signifikante forskjeller i seroprevalens av IgG eller IgA mellom de 5 gruppene, uansett valg av grenseverdi (tabell 3).

Det var ingen signifikante forskjeller i antistoffnivåer (angitt i $\log_{10}[EIU]$) av IgG og IgA mellom gruppene (tabell 4).

Diskusjon

Dette er en tverrsnittsstudie som inkluderer pasienter i alderen 40 – 60 år som alle fikk utført koronar angiografi ved Regionsykehuset i Tromsø (nå Universitetssykehuset Nord-Norge) i løpet av perioden 1/1-93 – 31/12-96. Alle var henvist til koronar angiografi som ledd i utredning av koronarsuspekterte brystmerter. Pasientene i gruppene 0-åre, 1-åre, 2-åre og 3-åre var inne til førstegangs angiografi, de ACB-opererte hadde alle gjennomgått koronar angiografi og/eller PTCA en eller flere ganger tidligere. De ble inndelt i 5 grupper ut fra funn ved angiografi, og ytterligere karakterisert ved hjelp av gjennomgang av sykehusets journal på hver enkelt pasient. Gruppene var godt matchet (tabell 1) med det var høyest antall kvinner i gruppen 0-åre. Kvinner har oftere brystmerter uten dokumenterbar patologi ved koronar angiografi. Dessuten er arbeids-EKG dårligere egnet til å avsløre ischemisk hjertesykdom hos kvinner sammenlignet med menn [52], og alle som får utført koronar angiografi har gjennomgått en slik test forut for denne undersøkelsen. Det er et relativt lavt antall kvinner som får utført koronar bypass sammenlignet med antall menn, og denne forskjellen er større jo yngre pasientgrupper man studerer. Dette forklarer det lave antall kvinner i gruppen ACB-opererte. Forskjellene i medikamentbruk med færrest brukere av ASA og statiner i gruppen 0-åre, og flest i gruppen ACB-opererte var som forventet. Man må anta at pasienter med angiografisk påvisbar årsak til sine brystmerter har de mest karakteristiske og sannsynligvis alvorligste symptomene, og at medikamentell behandling igangsettes på bakgrunn av dette.

Måling av CRP brukes i dag i utstrakt grad i klinikken, først og fremst i diagnostikken av akutte infeksjøs tilstander. Lavgradig, kronisk inflammasjon står sentralt i dagens

forklaringsmodeller for aterosklerosens patogenese, og basalt CRP-nivå er derfor ansett som en mulig risikofaktor både for utvikling av fremtidig koronarsykdom, og for utvikling av akutt koronarsyndrom hos allerede koronarsyke individer. I vår studie ble det påvist signifikant høyere \log_{10} [CRP]-nivå blant pasientene med angiografisk verifisert koronarsykdom sammenlignet med pasienten uten signifikante stenoser i sitt koronartre. Dette funnet sammenfaller bra med flere tidligere studier. Cavusogly Y et al [11], Anderson JL et al [12] og Zhu J et al [53] fant alle høyere CRP-nivåer blant angiograferte pasienter med påvist stenose i en eller flere koronarkar sammenlignet med angiograferte pasienter uten signifikante stenoser. Hoffmeister A et al [10] og Rifai N et al [54] har rapportert lignende observasjoner, men her bestod kontrollgruppene av antatt koronarfriske individer uten at dette var bekreftet ved angiografi. Årsaken til at pasienter med koronar hjertesykdom ser ut til å ha høyere basalt CRP-nivå enn pasienter uten koronar hjertesykdom, er foreløpig ukjent. Det kan være et uttrykk for en kronisk lavgradig inflammasjon i aterosklerotiske lesjoner spredt rundt om i hele karsystemet. Det kan også tenkes at de forhøyede CRP-nivåene er relatert til klassiske risikofaktorer for koronar hjertesykdom. Forhøyede CRP-nivåer er blitt assosiert med røyking, overvekt, lav sosioøkonomisk klasse, lavt HDL-kolesterol og hypertriglyceridemi [55], og forhøyet CRP kan således være et epifenomen knyttet til en eller flere av disse risikofaktorene. Hvis hypotesen om at aterosklerose skyldes kronisk infeksjon er riktig, kan de forhøyede CRP-nivåene indikere en infeksjonsrelatert akutt fase respons. Om forhøyet CRP i seg selv fører til, eller påskynder den aterosklerotiske prosessen vet man per i dag ikke svaret på, og man vet heller ikke hvilken rolle CRP eventuelt spiller i aterogenesen. Funksjonen til CRP in vivo er lite kjent, men det er kjent at proteinet kan virke pro-inflammatorisk via aktivering av komplementkaskaden [56]. Pasceri V et al [56] påviste at CRP induserer ekspresjon av adhesjonsmolekyler på overflaten av humane endotelceller, noe

som vil kunne føre til økt emigrasjon av granulocytter, monocytter og lymfocytter fra blodbanen til karveggen.

Det ble ikke observert signifikante forskjeller i \log_{10} [CRP]-nivå mellom gruppene med henholdsvis 1-, 2- og 3-åre sykdom. Dette funnet er forenelig med tidligere studier, blant annet av Hoffmeister A et al [10], Cavusoglu Y et al [11] og Rifai N et al [54] som heller ikke påviste forskjeller i CRP-nivå mellom tilsvarende grupper koronarpasienter. En mulig forklaring på dette er at de økte CRP-nivåene skyldes diffust utbredt aterosklerose i hele karsystemet, og ikke grad av obstruksjon fra enkeltlesjoner i koronartreet. Funnet ved koronar angiografi sier ingen ting om hvor utbredt aterosklerosen er i resten av kroppen, selv om man kan anta at det eksisterer en viss korrelasjon mellom grad av koronar aterosklerose og omfanget i kroppen for øvrig.

De ACB-opererte hadde høyere \log_{10} [CRP]-nivå enn de øvrige koronarpasientene sett under ett. Så vidt vi har kunnet bringe på det rene, har ingen rapportert tilsvarende observasjoner tidligere. Milazzo et al påviste i en studie fra 1999 [57] at koronar-bypass opererte pasienter med basalt CRP-nivå > 3 mg/l hadde signifikant høyere risiko for residiv av ischemi sammenlignet med de som hadde basalt CRP-nivå < 3 mg/l. Det er mulig at vi har fanget opp nettopp den gruppen av ACB-opererte pasienter som har størst risiko for residiv, og at disse har høyere basalt CRP-nivå enn øvrige koronarsyke pasienter. De ACB-opererte representerer den gruppen pasienter med antatt alvorligst koronarsykdom. Dette på bakgrunn av at det både har blitt funnet indikasjon for koronar-bypass kirurgi, samt at pasientene senere har blitt angiografert på grunn av residivangina. Denne observasjonen står i kontrast til det faktum at det tidligere ikke er funnet noen korrelasjon mellom utbredelse av koronar aterosklerose og CRP-nivåer. Selve operasjonen kan utelukkes som årsak, da den for disse

pasientene ligger flere år tilbake i tid. Som nevnt over eksisterer det flere faktorer som både er assosiert med økt risiko for aterosklerose og økte basale CRP-nivåer. Kanskje er det en opphopning av mange slike risikofaktorer blant individene i denne gruppen, noe som kan forklare deres alvorlige koronarsykdom. Det kan også tenkes at disse pasientene har en spesielt hissige form av aterosklerotisk sykdom, med høy grad av inflammasjon i de aterosklerotiske lesjonene. Alle pasientene i denne gruppen hadde aterosklerotiske lesjoner i ett eller flere av sine bypass-graft. Disse lesjonene må ha oppstått i løpet av relativt kort tid, dette på bakgrunn av at graftene var lesjonsfrie på operasjonstidspunktet som i gjennomsnitt lå 5,9 år forut for den aktuelle angiografien. Ut fra dette kan man anta at disse lesjonene i større grad består av lipoide (bløte) plaque, noe som skulle tilsi at graden av inflammasjon i disse er relativt høy. Ser man på resultatene i vår studie, så er det en tendens til at $\log_{10}[\text{CRP}]$ -nivåene stiger med økende alvorlighetsgrad av koronarsykdom. Dette sammen med observasjonene gjort på de ACB-opererte, gjør at man kan spekulere på om det allikevel eksisterer en korrelasjon mellom basale CRP-nivåer og utbredelse av koronar aterosklerose.

I vår studie fant man ingen forskjeller i CRP nivå mellom de som brukte og de som ikke brukte ASA regelmessig. Uten sammenligning for øvrig, så er dette funnet i tråd med observasjoner gjort av Feldman M et al [58], som i en placebo-kontrollert prospektiv studie ikke fant at behandling med aspirin i lave doser hadde noen effekt på basalt CRP-nivå. Her kan man anta at de doser ASA som benyttes som profylakse ved koronar hjertesykdom (vanligvis 75 eller 160 mg pr. dag) er for lave til å ha noen nevneverdig anti-inflammatorisk effekt.

Ridker et al [59] påviste i en studie at et års behandling med lovastatin ga signifikant reduksjon i basale CRP-nivåer med gjennomsnittlig 14,8 %. Ved sammenligning av CRP-

nivåene blant brukerne og ikke-brukerne av statiner i vår studie, fant man ingen signifikante forskjeller i CRP-nivåer. Faktisk var CRP nivået noe høyere blant de som brukte statiner. Det var færrest statinbrukere i gruppen 0-åre, denne gruppen hadde samtidig signifikant lavere CRP-nivå enn de øvrige, og så man bare på pasientene med angiografisk verifisert koronarsykdom, ble den nevnte forskjellen jevnet ut.

Røyking er kanskje den viktigste konfunderende faktoren når man skal sammenligne basale CRP-nivåer. Selv om det ikke var signifikante forskjeller mellom gruppene med tanke på røyking, viser tallene at det var flest ikke-røykere i gruppen 0-åre, og flest røykere og x-røykere i de øvrige gruppene. Røyking gir økning i basalt CRP-nivå, sannsynligvis via induksjon av kronisk inflammasjon i bronkier og alveoler. I totalmaterialet fant vi signifikant høyere CRP-nivå hos henholdsvis x-røykerne og røykerne sammenlignet med ikke-røykerne. Røykerne hadde høyere CRP-nivå sammenlignet med x-røykerne, men denne forskjellen var ikke statistisk signifikant. Disse resultatene sammenfaller bra med Rohde LEP et al [60] som fant at ikke-røykere hadde lavere CRP enn x-røykere som igjen hadde lavere enn røykere. Andre studier har vist at personer som aldri har røkt, har lavere CRP-nivå enn personer som enten er røykere eller tidligere har røkt [61, 62]. Data om hver enkelt pasients røykestatus ble innhentet fra sykehusets pasientjournaler, noe som gjør at opplysningene er beheftet med usikkerhet. Pasienter har nok en tendens til å underrapportere sitt eget forbruk av sigaretter, samtidig som leger sannsynligvis har en tendens til å dele inn i henholdsvis røyker eller ikke-røyker, uten å ta hensyn til om pasienten tidligere har røkt. Dessuten er det sannsynlig at flere av x-røykerne i studien nylig hadde sluttet å røyke i forbindelse med debut av symptomgivende hjertesykdom, altså relativt kort tid før de fikk utført koronar angiografi.

Skal man måle såkalt basalt CRP-nivå, skal dette gjøres i fravær av en hver form for akutt inflammasjon. Blant pasientene i denne studien hadde man ingen opplysninger om hvorvidt de nettopp hadde gjennomgått for eksempel en banal øvre luftveisinfeksjon, noe som jo vil gi en betydelig CRP-økning. Av de 237 pasienten som ble inkludert i studien, hadde kun fire pasienter en CRP som var høyere enn 10 mg/l, altså høyere enn den grenseverdien som vanligvis blir benyttet for å indikere akutt inflammatorisk sykdom. Altså er det mye som tyder på at man virkelig har målt basalt CRP-nivå hos den store majoriteten av pasienter i studien.

Flere forskjellige mikroorganismer har blitt assosiert med økt risiko for aterosklerose, blant annet Cytomegalovirus (CMV), *Helicobacter pylori* og *Chlamydia pneumoniae* [12]. Et fellestrekk for disse agensene er at alle kan etablere kronisk infeksjon, og per i dag er det satt mest fokus på *Chlamydia pneumoniae*.

Tre ulike serologiske metoder er i dag kommersielt tilgjengelig for påvisning av *C.pneumoniae* luftveisinfeksjoner: Komplementfiksasjon (KBR), Microimmunofluorescens (MIF) og Enzyme Immuno Assay (EIA). Av disse regnes MIF som gullstandarden [26], dette til tross for at MIF er beheftet med usikkerhet som følge av mangel på standardisering. Forskjellige produsenter benytter ulike antigener og ulike inkubasjonsbetingelser, i tillegg skjer avlesningen manuelt, noe som gir rom for subjektiv tolkning av resultatene. I vår studie valgte vi å benytte EIA metodikk, og det var flere årsaker til dette: 1) EIA-metodikk egner seg godt når man skal analysere store prøveserier. 2) EIA benytter maskinell avlesning i fotometer, man unngår dermed subjektiv tolkning av resultatene. 3) Ved bruk av EIA får man ut resultatet som eksakte titre, noe som ikke er tilfelle ved MIF. Dette gjør det mulig å sammenligne grupper med tanke på antistoffnivåer. 4) Halvorsen et al [63] viste i sin studie at

det er godt samsvar mellom MIF og EIA når det gjelder påvisning av IgA- og IgG-antistoffer mot *C.pneumoniae* hos pasienter med gjennomgått myokardinfarkt.

Produsenten av EIA metodikken angir at lagring av serum i frosset tilstand utover et år, kan påvirke resultatet av testen ved at det kan dannes lipidaggregater som kan gi uspesifikke resultater [48, 49]. Alle sera i studien var blitt lagret over et år forut for analysering. Hvordan dette har påvirket resultatene er umulig å si noe sikkert om, men man kan anta at eventuelle uspesifikke resultater har fordelt seg likt mellom alle gruppene. Det må i denne forbindelse nevnes at majoriteten av tidligere seroepidemiologiske studier har benyttet seg av serum som har vært nedfrosset betydelig lengre enn hva tilfellet var for vår studie.

Det eksisterer få data vedrørende seroprevalens av *C.pneumoniae* antistoffer i den norske befolkningen. Økende seroprevalens med økende alder er dokumentert i studier fra forskjellige deler av verden, og alle angir at mer enn 50 % av den voksne befolkning har *C.pneumoniae* antistoffer [22, 64, 65]. I vår studie varierte, som forventet, seroprevalensen i totalmaterialet avhengig av hvilke grenseverdier for seropositivitet man benyttet. De hyppigst brukte grenseverdier i litteraturen er henholdsvis ≥ 32 samt ≥ 64 for IgG og ≥ 16 samt ≥ 32 for IgA [63]. La man grenseverdiene ≥ 32 for IgG og ≥ 16 for IgA til grunn, ble seroprevalens henholdsvis 69,6 % for IgG og 44,3 % for IgA, og det var bra samsvar mellom prevalensene i vårt materiale og prevalenser i populasjoner undersøkt i studier fra Finland [22] og Island [65]. Det ble observert forskjeller i seroprevalens mellom menn og kvinner i vårt materiale, og denne observasjonen samsvarer bra med de aller fleste prevalensstudier som tidligere er gjort, av ukjente årsaker har menn høyere seroprevalens av antistoffer mot *C.pneumoniae* enn kvinner [66, 67].

Det ble ikke påvist forskjeller i seroprevalens av antistoffer mot *C.pneumoniae* mellom pasienter med angiografisk påvist og pasienter uten angiografisk påvist koronar aterosklerose, denne observasjonen var uavhengig av valgt grenseverdi for seropositivitet. Dette resultatet er i tråd med en studie fra Italia der Cellesi et al [68] heller ikke påviste forskjeller mellom disse gruppene pasienter.

Så man på forskjellene i seroprevalens mellom individene i gruppene 1-åre, 2-åre, 3-åre og ACB-opererte, ble det heller ikke her funnet signifikante forskjeller. Det er ikke gjort mange studier på dette tidligere, men Ericson K et al [69] påviste ingen forskjeller i seroprevalens mellom pasienter med mikroskopisk gradert mild og alvorlig koronar aterosklerose, og resultatet er således i tråd med denne studien.

Ved sammenligning av gruppene med hensyn på nivåer av IgA- og IgG-antistoffer mot *C.pneumoniae*, fant man ingen forskjeller mellom gruppene. Dette er i tråd med en større meta-analyse utført av Danesh J et al [70], som konkluderte med at de ikke var noen sterk assosiasjon mellom IgA og IgG titre og tilstedeværelse av koronar hjertesykdom.

En innvending mot vår studie er at gruppene inneholder relativt få individer, og at eventuelle forskjeller i seroprevalens derfor blir vanskelig å påvise. De hyppigst brukte grenseverdier i litteraturen er henholdsvis ≥ 32 samt ≥ 64 for IgG og ≥ 16 samt ≥ 32 for IgA, men disse verdiene benyttes primært for å indikere akutt luftveisinfeksjon. Hvordan serologiske data skal tolkes med tanke på tilstedeværelsen av kronisk infeksjon, hersker det større uenighet om. Høye IgG-titer kan like godt være et uttrykk for tidligere infeksjon som for kronisk infeksjon, og flere forskere ser nå på persisterende høye IgA-titer som en mulig bedre indikasjon på kronisk infeksjon [67]. Per i dag eksisterer det ingen allment akseptert

serologisk markør for kronisk infeksjon med *C.pneumoniae* [71], og når det gjelder IgA eksisterer det ingen allment akseptert grenseverdi for hva som kan klassifiseres som kronisk infeksjon.

Morfologisk kan aterosklerotiske lesjoner deles inn i fibrøse og lipoide plaque. Man antar at lipoide plaque er mer ustabile enn de fibrøse, og dermed løper en større risiko for ruptur med påfølgende trombose. Hvis et slikt plaque befinner seg i koronartreet, vil ruptur og trombose kunne føre til såkalt akutt koronarsyndrom. Det er et viktig poeng at koronar angiografi ikke skiller mellom disse to typene lesjoner, og egner seg derfor dårlig for å vurdere risiko for utvikling av akutt koronarsyndrom. Årsaken til at lipoide plaque er mer ustabile enn fibrøse, er at de inneholder mer lipid og mindre kollagene fibre i kjernen. En annen faktor som også kan være med på å destabilisere et ateromatøst plaque, er inflammasjon. Selv om infeksjon med for eksempel *C.pneumoniae* ikke viser seg å spille en kausal rolle i aterogenesen, kan tilstedeværelsen av mikroorganismen i eksisterende plaque være med på å indusere eller forsterke en eksisterende inflammasjon. Således kan kronisk infeksjon med *C.pneumoniae* være en risikofaktor for utvikling av ustabil AP og AMI hos pasienter som allerede har aterosklerotiske lesjoner i sitt koronartre.

Konklusjon

Pasienter med angiografisk verifisert koronar aterosklerose hadde signifikant høyere CRP-nivå sammenlignet med pasienter uten påvisbare stenoser, og ACB-opererte pasienter hadde signifikant høyere CRP-nivå sammenlignet med de øvrige koronarpasientene.

I vårt materiale var det en tendens til stigende CRP-nivå med økende antall affiserte koronarkar. Disse funnene indikerer økende grad av inflammasjon med økende alvorlighetsgrad av koronar hjertesykdom.

Røyking oppfattes som en viktig konfunderende faktor, da våre data viser at røykere og x-røykere har signifikant høyere basalt CRP-nivå enn personer som ikke har røykt.

Prevalens av *C.pneumoniae* IgA- og IgG-antistoffer var høy i alle grupper, men det var ingen signifikante forskjeller mellom gruppene. Det var heller ikke forskjeller i *C.pneumoniae* IgA- og IgG-antistoffnivå mellom gruppene. Det er usikkert om antistoffpåvisning med EIA-metodikk er en egnet metode for påvisning av kronisk *C.pneumoniae* infeksjon. For å påvise en mulig kausal sammenheng mellom *C.pneumoniae* og utvikling av aterosklerose behøves en mer sensitiv markør som for eksempel sirkulerende *C.pneumoniae* DNA.

Referanser

- [1] Willerson JT, Cohn JN. Cardiovascular medicine 2nd ed 2000. Churchill Livingstone: 503-20
- [2] Hurt's The Heart Arteries and Veins, 9th ed 1998. McGraw-Hill: 551-71
- [3] Desmond J. Diseases of the Heart, 2nd ed 1996. Baillière Tindall: 370-8
- [4] Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Basic Pathology, 6th ed 1997. W.B. Saunders Company: 283-9
- [5] Woolf N. Pathology, Basic and Systemic, 1998. Saunders: 327-35
- [6] Burtis CA et al. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, 5th ed 2001. W.B. Saunders Company: 325-351
- [7] Koenig W, Sund M, Frölich M, Fischer HG, Löwel H, Döring A, Hutchinson WL, Pepys MB. C-Reactive Protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men. *Circulation* 1999; 99: 237-42
- [8] Wood WG, Ludemann J, Mitusch R, Heinrich J, Maass R, Frick U. Evaluation of sensitive immunoluminometric assay for the determination of C-reactive protein (CRP) in serum and plasma and the establishment of reference ranges for different groups of subjects. *Clin Lab* 2000; 46: 131-40
- [9] Borque L, Bellod L, Rus A, Seco ML, Galisteo-González F. Development and validation of an automated and ultrasensitive immunoturbidimetric assay for C-reactive protein. *Clin Chem* 2000; 46: 1839-42

- [10] Hoffmeister A, Rothenbacher D, Bazner U, Frolich M, Brenner H, Hombach V, Koenig W. Role of novel markers of inflammation in patients with stable coronary heart disease. *Am J Cardiol* 2001; 87: 262-6
- [11] Cavusogly Y, Gorenek B, Alpsoy S, Unalir A, Ata N, Timuralp B. Evaluation of C-reactive protein, fibrinogen and antithrombin III as risk factors for coronary artery disease. *Isr Med Assoc J* 2001; 3: 36-8
- [12] Anderson JL, Carlquist JF, Muhlestein JB, Horne BD, Elmer SP. Evaluation of C-reactive protein, an inflammatory marker, and infectious serology as risk factors for coronary artery disease and myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 35-41
- [13] Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R. Association of Fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: Meta-analyses of prospective studies. *JAMA* 1998; 279: 1477-82
- [14] Keshavamurthy CB, Kane GR, Magdun AP, Sahoo PK. Serum fibrinogen and C-reactive protein levels predicts major adverse cardiac events in unstable angina. *Indian Heart J* 2000; 52: 36-9
- [15] Yu H, Rifai N. High-sensitive C-reactive protein and atherosclerosis. From theory to therapy. *Clin Biochem* 2000; 33: 601-10
- [16] Koukkunen H, Penttila K, Kemppainen A, Halinen M, Penttila I, Rantanen T, Pyorala K. C-reactive protein, fibrinogen, interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha in the prognostic classification of unstable angina pectoris. *Ann Med* 2001; 33: 37-47
- [17] Muhlestein JB, Horne BD, Carlquist JF, Madsen TE, Bair TL, Pearson RR, Anderson JL. Cytomegalovirus seropositivity and C-reactive protein have independent and combined predictive value for mortality in patients with angiographically demonstrated coronary artery disease. *Circulation* 2000; 102: 1917-23

- [18] Lagrand WK, Visser CA, Hermens WT, Niessen HWM, Verheugt FWA, Wolbink GJ, Hack E. C-reactive protein as a cardiovascular risk factor: More than an epiphenomenon?. *Circulation* 1999; 100: 96-102
- [19] Ridker PM. High-sensitive C-reactive protein: Potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease. *Circulation* 2001; 103: 1813-18
- [20] Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000; 342: 836-43
- [21] Kutlin A, Tsumura N, Emre U, Roblin PM, Hammerschlag MR. Evaluation of Chlamydia immunoglobulin (IgM), IgG, and IgA rELISAs Medac for diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; 4: 213-216
- [22] Tuuminen T, Varjo S, Ingmann H, Weber T, Oksi J, Viljanen M. Prevalence of *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* immunoglobulin G and A antibodies in a healthy finnish population as analyzed by Quantitative Enzyme Immunoassays. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7: 734-738
- [23] Kauppinen M, Saikku P. Pneumoni due to *Chlamydia pneumoniae*: Prevalence, clinical features, diagnosis and treatment. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 244-52
- [24] Heiskanen-Kosma T, Korppi M, Laurila A, Jokinen C, Kleemola M, Saikku P. *Chlamydia pneumoniae* is an important cause of community-acquired pneumonia in school-aged children: serological results of a prospective, population-based study. *Scand J Infect Dis* 1999; 31: 255-59
- [25] Saikku P, Mattila K, Nieminen MS, Huttunen JK, Leinonen M, Ekman MR, Mäkelä PH, Valtonen V. Serological evidence of an association of a novel Chlamydia,

- TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet* 1988; 2: 983-86
- [26] Verkooyen RP, Willemse D, Hiep-van Casteren SCAM, Mousavi Joulandan SA, Snijder RJ, van den Bosch JMM, van Helden HPT, Peeters MF, Verbrugh HA. Evaluation of PCR, culture, and serology for diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* respiratory infection. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2301-2307
- [27] Degre M, Hovig B, Bukholm G, Rollag H. *Medisinsk Mikrobiologi*, 2. utg, 2000. Gyldendal Akademisk: 241-8
- [28] Thom DH, Wang S-P, Grayston JT, Siscovick DS, Stewart DK, Kronmal RA, Weiss NS. *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR antibody and angiographically demonstrated coronary artery disease. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1991; 11: 547-551
- [29] Saikku P, Leinonen M, Tenkanen L, Linnanmäki E, Ekman M-R, Manninen V, Mänttari M, Frick H, Huttunen JK. Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki heart study. *Ann Int Med* 1992; 116: 273-78
- [30] Ossewaarde JM, Feskens EJM, De Vries A, Vallinga CE, Kromhout D. *Chlamydia pneumoniae* is a risk factor for coronary heart disease in symptom-free elderly men, but *Helicobacter pylori* and Cytomegalovirus are not. *Epidemiology and Infection* 1998; 120: 93-99
- [31] Patel P, Mendall MA, Carrington D, Strachan DP, Leatham E, Molineaux N, Levy J, Blakeston C, Seymour CA, Camm AJ, Northfield TC. Association of *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* infections with coronary heart disease and cardiovascular risk factors. *BMJ* 1995; 311: 711-14

- [32] Davidson M, Kuo C-C, Middaugh JP, Campbell LA, Wang S-P, Newman WP, Finley JC, Grayston JT. Confirmed previous infection with *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) and its presence in early coronary atherosclerosis. *Circulation* 1998; 98: 628-33
- [33] Strachan DP, Carrington D, Mendall MA, Ballam L, Morris J, Butland BK, Sweetnam PM, Elwood PC. Relation of *Chlamydia pneumoniae* serology to mortality and incidence of ischaemic heart disease Over 13 Years in the Caerphilly prospective heart disease study. *BMJ* 1999; 318: 1035-39
- [34] Wimmer MJL, Sandmann-Strupp R, Saikku P, Haberl RL. Association of chlamydial infection with cerebrovascular disease. *Stroke* 1996; 27: 2207-10
- [35] Ramirez JA. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from the coronary artery of a patient with coronary atherosclerosis. *Ann Int Med* 1996; 125: 979-982
- [36] Maass M, Bartels C, Engel PM, Mamat U, Sievers H-H. Endovascular presence of viable *Chlamydia pneumoniae* is a common phenomenon in coronary artery disease. *J Am Coll Card* 1998; 31: 827-32
- [37] Maass M, Bartels C, Kruger S, Krause E, Engel PM, Dalhoff K. Endovascular presence of *Chlamydia pneumoniae* DNA is a generalized phenomenon in atherosclerotic vascular disease. *Atherosclerosis* 1998; 140: S25-30
- [38] LaBiche R, Koziol D, Quinn TC, Gaydos C, Azhar S, Ketron G, Sood S, DeGraba TJ. Presence of *Chlamydia pneumoniae* in human symptomatic and asymptomatic carotid atherosclerotic plaque. *Stroke* 2001; 32: 855-60
- [39] Nadrchal R, Makristathis A, Apfalter P, Rotter M, Trubel W, Huk I, Polterauer P, Hirschl AM. Detection of *Chlamydia pneumoniae* DNA in atheromatous tissues by polymerase chain reaction. *Wiener Klinische Wochenschrift* 1999; 111: 153-6
- [40] Muhlestein JB, Anderson JL, Hammond EH, Zhao L, Trehan S, Schwobe EP, Carlquist JF. Infection with *Chlamydia pneumoniae* accelerates the development of

atherosclerosis and treatment with azithromycin prevents it in a rabbit model. *Circulation* 1998; 97: 633-6

- [41] Moazed TC, Campbell LA, Rosenfeld ME, Grayston JT, Kuo C-C. *Chlamydia pneumoniae* infection accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Infect Dis* 1999; 180: 238-41
- [42] Laitinen K, Laurila A, Pyhälä L, Leinonen M, Saikku P. *Chlamydia pneumoniae* infection induces inflammatory changes in the aorta of rabbits. *Infection and Immunity* 1997; 65: 4832-5
- [43] Fong IW. Antibiotics effects in a rabbit model of *Chlamydia pneumoniae*-induced atherosclerosis. *J Infect Dis* 2000; 181: S514-8
- [44] Gurfinkel E, Bozovich G, Livellara S, Testa E, Beck E, Mautner B. Antibiotic effects on unstable angina. The final report of ROXIS trial. *Eur Heart J* 1999; 20: 121-7
- [45] Anderson JL, Muhlestein JB. The ACADEMIC study in perspective (Azithromycin in Coronary Artery Disease: Elimination of Myocardial Infection with Chlamydia). *J Infect Dis* 2000; 181: S569-71
- [46] 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: 404-7
- [47] N High Sensitivity CRP. Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Tyskland 2000
- [48] *Chlamydia pneumoniae* IgG EIA. Labsystems OY, Helsinki, Finland 2000
- [49] *Chlamydia pneumoniae* IgA EIA. Labsystems OY, Helsinki, Finland 2000
- [50] Epi Info 6, versjon 6.04d. Centers for Disease Control & Prevention, Atlanta, Georgia, USA 2001
- [51] Microsoft Excel. Microsoft Office XP 2001

- [52] Kwok Y, Kim C, Grady D, Segal M, Redberg R. Meta-analysis of exercise testing to detect coronary artery disease in women. *Am J Cardiol* 1999; 83: 660-6
- [53] Zhu J, Quyyumi AA, Norman JE, Csako G, Waclawiw MA, Shearer GM, Epstein SE. Effects of total pathogen burden on coronary artery disease risk and C-reactive protein levels. *Am J Cardiol* 2000; 85: 140-6
- [54] Rifai N, Joubran R, Yu H, Asmi M, Jouma M. Inflammatory markers in men with angiographically documented coronary heart disease. *Clin Chem* 1999; 45: 1967-73
- [55] De Backer J, Mak R, De Bacquer D, Van Renterghem L, Verbraekel E, Kornitzer M, De Backer G. Parameters of inflammation and infection in a community based case-control study of coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2000; 160: 457-63
- [56] Pasceri V, Willerson JT, Yeh ETH. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 2000; 102: 2165-8
- [57] Milazzo D, Biasucci LM, Luciani N, Martinelli L, Canosa C, Schiavello R, Maseri A, Possati G. Elevated levels of C-reactive protein before coronary artery bypass grafting predict recurrence of ischemic events. *Am J Cardiol* 1999; 84: 459-61
- [58] Feldman M, Jialal I, Devaraj S, Cryer B. Effects of low-dose aspirin on serum C-reactive protein and Thromboxane B₂ concentrations: A placebo-controlled study using a highly sensitive C-reactive protein assay. *J Am Coll Card* 2001; 37: 2036-41
- [59] Ridker PM, Rifai N, Clearfield M, Downs JR, Weis SE, Miles JS, Gotto AM. Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *N Eng J Med* 2001; 344: 1959-65
- [60] Rohde LEP, Hennekens CH, Ridker PM. Survey of C-reactive protein and cardiovascular risk factors in apparently healthy men. *Am J Cardiol* 1999; 84: 1018-

- [61] Wong ND, Pio J, Valencia R, Thakal G. Distribution of C-reactive protein and its relation to risk factors and coronary heart disease risk estimation in the National Health and Nutrition Examination survey (NHANES) III. *Prev Cardiol* 2001; 4: 109-14
- [62] de Maat MPM, Pietersma A, Kofflard M, Sluiter W, Kluft C. Association of plasma fibrinogen levels with coronary artery disease, smoking and inflammatory markers. *Atherosclerosis* 1996; 121: 185-91
- [63] Halvorsen DS, Børvik T, Njølstad I, Gutteberg TJ, Vorland LH, Hansen J-B. *Chlamydia pneumoniae* IgA- and IgG antibodies in young survivors of myocardial infarction. A comparison of antibody detection by a microimmunofluorescence test and an enzyme immunoassay. *J Int Med* 2002; 251: 142-7
- [64] Grayston JT, Campbell LA, Kuo CC, Mordhorst CH, Saikku P, Thom DH, Wang SP. A new respiratory tract pathogen: *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. *J Infect Dis* 1990; 161: 618-25
- [65] Einarsson S, Sigurdsson HK, Magnusdottir SD, Erlendsdottir H, Briem H, Gudmundsson S. Age specific prevalence of antibodies against *Chlamydia pneumoniae* in Iceland. *Scand J Infect Dis* 1994; 26: 393-7
- [66] Gnarpe J, Gnarpe H, Gause-Nilsson I, Lundorg P, Steen B. Seroprevalence of antibodies to *Chlamydia pneumoniae* in elderly people: A two-decade longitudinal and cohort difference study. *Scand J Infect Dis* 2000; 32: 177-9
- [67] Saikku P. Diagnosis of acute and chronic *Chlamydia pneumoniae* infections. 8th international symposium on chlamydial infections 1994: 163-72
- [68] Cellesi C, Sansoni A, Casini S, Migliorini L, Zacchini F, Gasparini R, Montomoli E, Bonacci A, Bravi A. *Chlamydia pneumoniae* antibodies and angiographically

demonstrated coronary artery disease in a sample population from Italy.
Atherosclerosis 1999; 145: 81-5

- [69] Ericson K, Saldeen TGP, Lindquist O, Pahlson C, Mehta JL. Relationship of *Chlamydia pneumoniae* infection to severity of human coronary atherosclerosis. *Circulation* 2000; 101: 2568-74
- [70] Danesh J, Wincup P, Walker M, Lennon L, Thomson A, Appleby P, Wong Y-K, Bernardes-Silva M, Ward M. *Chlamydia pneumoniae* IgG titres and coronary heart disease: Prospective study and meta-analysis. *BMJ* 2000 July; 321(22): 208-13
- [71] Dowell S, Peeling RW, Boman J, Carlone G, Fields BS, Guarner J, Hammerschlag MR, Jackson L, Kuo C-C, Maass M, Messmer TO, Talkington DF, Tondella ML, Zaki SR. Standardizing *Chlamydia pneumoniae* assays: Recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada). *Clin Infect Dis* 2001; 33: 492-503

Tabeller

Tabell 1 Karakteristika for inkluderte pasienter

	0-åre (n=34)	1-åre (n=57)	2-åre (n=49)	3-åre (n=55)	ACB-oppr. (n=42)	p-verdi
Kjønn, kvinner/menn	15 / 19	16 / 41	12 / 37	15 / 40	5 / 37	0,037
Alder (år) [*]	50,7 (4,7)	51,6 (5,3)	52,7 (4,7)	52,2 (5,3)	52,5 (4,6)	0,394
Røyk, Nei / Ja / X-røyker (%)	35,3 / 41,2 / 23,5	19,3 / 33,3 / 45,6	30,6 / 36,7 / 32,7	21,8 / 47,3 / 30,9	14,3 / 40,5 / 45,2	0,202
Systolisk BT (mmHg) [*]	121 (18)	123 (18)	124 (23)	119 (17)	127 (22)	0,339
Diastolisk BT (mmHg) [*]	74 (11)	76 (11)	76 (12)	77 (13)	73 (13)	0,534
S-kolesterol (mmol/l) [*]	6,18 (1,38)	6,27 (1,02)	6,18 (1,15)	6,82 (1,56)	6,16 (0,96)	0,029
Braker statiner, ja (%)	2,9	10,5	30,6	18,2	40,5	<0,001
Braker ASA, ja (%)	50,0	70,2	65,3	78,2	78,6	0,038
Tidligere infarkt ^{**}	2 (5,9)	21 (36,8)	26 (53,1)	28 (50,9)	30 (71,4)	<0,001

* Kontinuerlige variable er angitt som gjennomsnitt (standardavvik)

** Angitt som antall (andel i %)

Tabell 2 Gjennomsnittlig CRP-nivå i de forskjellige gruppene målt med High sensitivity CRP metodikk

	0-åre (n=34)	1-åre (n=57)	2-åre (n=49)	3-åre (n=55)	ACB-oppr. (n=42)	p-verdi
CRP (mg/l) *	1,39 (1,34)	1,83 (1,80)	2,17 (2,46)	2,75 (4,24)	3,60 (3,64)	
Log ₁₀ [CRP] *	- 0,060 (0,437)	0,103 (0,376)	0,110 (0,428)	0,198 (0,418)	0,339 (0,470)	0,001

* Angitt som gjennomsnitt (standardavvik)

Tabell 3

Prevalens (%) av *C.pneumoniae*(CP) IgA- og IgG-positive sera analysert med EIA-metodikk ved 4 ulike grenseverdier. Grenseverdiene er oppgitt som inverse titre og svarer til grenseverdiene anbefalt av Labsystems som produsent av EIA-metodikken, samt de hyppigst brukte grenseverdier i litteraturen.

	0-åre (n=34)	1-åre (n=57)	2-åre (n=49)	3-åre (n=55)	ACB-oppr. (n=42)	p-verdi
CP IgG(≥ 30)	76,5	78,9	67,3	67,3	66,7	0,505
CP IgG(≥ 32)	73,5	77,2	63,3	67,3	66,7	0,550
CP IgG(> 45)	70,6	64,9	57,1	54,5	59,5	0,561
CP IgG(≥ 64)	50,0	50,9	36,7	40,0	47,6	0,531
CP IgA(≥ 8)	64,7	71,9	67,3	74,5	78,6	0,648
CP IgA(> 12)	47,1	52,6	46,9	54,5	52,4	0,924
CP IgA(≥ 16)	41,1	42,1	42,9	49,1	45,2	0,936
CP IgA(≥ 32)	14,7	19,3	18,4	10,9	28,6	0,254

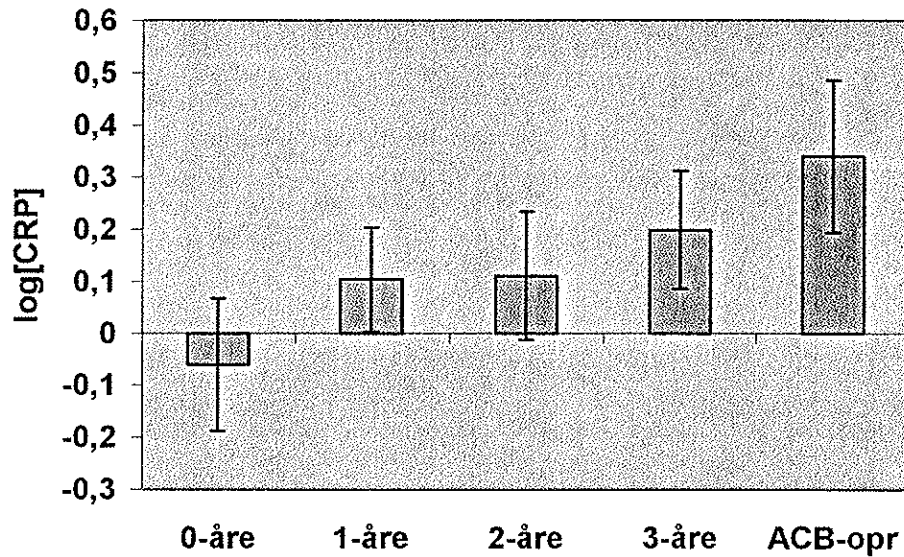
Tabell 4 Gjennomsnittlig nivå av IgA- og IgG-antistoffer (målt i EIU) mot *C. pneumoniae*

	0-åre (n=34)	1-åre (n=57)	2-åre (n=49)	3-åre (n=55)	ACB-opr. (n=42)	p-verdi
CP IgG (EIU)*	76,7 (53,6)	85,6 (67,4)	70,7 (64,8)	75,8 (68,9)	78,5 (68,9)	
Log ₁₀ [EIU]*	1,767 (0,352)	1,774 (0,414)	1,669 (0,417)	1,702 (0,413)	1,649 (0,570)	0,629
CP IgA (EIU)*	16,5 (14,4)	18,7 (14,5)	19,5 (19,2)	19,1 (16,6)	22,3 (19,4)	
Log ₁₀ [EIU]*	1,061 (0,387)	1,139 (0,358)	1,121 (0,385)	1,137 (0,365)	1,165 (0,445)	0,826

* Angitt som gjennomsnitt (standardavvik)

Figurer

Figur 1 Log transformerte CRP-verdier (95 % konfidensintervall) i de forskjellige gruppene



Figur 2 Log transformerte CRP-verdier (95 % konfidensintervall) blant henholdsvis ikke-røykere, x-røykere og røykere i totalmaterialet

