

# Estudio de prevalencia de *Helicobacter pylori* y *Chlamydia pneumoniae* en placas de ateroma de pacientes diabéticos y no diabéticos con arteriosclerosis

D.A. de Luis, I. García Arata<sup>a</sup>, J. Haurie<sup>b</sup>, L. de Rafael<sup>a</sup>, J. González<sup>a</sup>, A. Becerra, C. Martín de Argila<sup>c</sup>, R. Aller<sup>c</sup> y D. Boixeda<sup>c</sup>

Servicio de Endocrinología y Nutrición. Hospital del Río Hortega e Instituto de Endocrinología y Nutrición (IEN). Facultad de Medicina. Valladolid. Servicios de <sup>a</sup>Microbiología, <sup>b</sup>Cirugía Vascular y <sup>c</sup>Gastroenterología. Hospital Ramón y Cajal. Universidad de Alcalá de Henares. Madrid.

---

**Fundamento.** La arteriosclerosis se comporta como un proceso inflamatorio crónico. Algunos estudios han sugerido que *Chlamydia pneumoniae* y *Helicobacter pylori* pueden representar un papel en la patogenia de la arteriosclerosis en pacientes diabéticos y no diabéticos. EL objetivo del estudio fue determinar mediante cultivo y reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la presencia de *C. pneumoniae* y *H. pylori* en arterias de pacientes con arteriosclerosis.

**Métodos y resultados.** El estudio presenta un diseño transversal, con 40 pacientes (22 diabéticos y 18 no diabéticos) sometidos a una intervención de revascularización. Se recogieron muestras de ateroma y se utilizaron los siguientes métodos de detección de la infección: PCR y cultivo de las placas de ateroma para detectar *C. pneumoniae* y *H. pylori*. Se utilizó la serología para determinar el contacto previo del paciente con el germen. En el grupo total, 29 pacientes (72,5%) presentaban serología positiva a *H. pylori* y 20 (50%) a *C. pneumoniae* ( $p < 0,05$ ). En los pacientes diabéticos, un 77,3% tenían una serología positiva a *H. pylori* y un 50% a *C. pneumoniae* ( $p < 0,05$ ). En pacientes no diabéticos, un 66,7% tenían serología positiva a *H. pylori* y un 50% a *C. pneumoniae*, sin encontrarse diferencias significativas. Se detectó *C. pneumoniae* por PCR en una placa de carótida de un paciente no diabético, con serología positiva y

cultivo negativo, que además tenía una serología positiva a *H. pylori* pero PCR y cultivo de placa negativos. Todos los pacientes, diabéticos y no diabéticos, presentaban PCR y cultivos de placas negativos para *H. pylori*.

**Conclusión.** En este estudio se demuestra la nula presencia de *H. pylori* y escasa de *C. pneumoniae* en placas de ateroma. La relación entre arteriosclerosis e infección por *C. pneumoniae*, pero no por *H. pylori*, podría explicarse por infección directa de la pared arterial.

**Palabras clave:**

Arteriosclerosis. Ateroma. Infección. *Chlamydia pneumoniae*. *Helicobacter pylori*.

---

## STUDY OF *HELICOBACTER PYLORI* AND *CHLAMYDIA PNEUMONIAE* FROM ARTERY ATHEROMAS FROM NON DIABETIC AND DIABETIC PATIENTS WITH ATHEROSCLEROSIS

**Background.** Atherosclerosis is similar to a chronic inflammatory response. Recent reports have suggested that *Chlamydia pneumoniae* (*Cp*) and *Helicobacter pylori* (*Hp*) may play a role in the pathogenesis of atherosclerosis in both non-diabetic and diabetic patients. The aim of the study was to determine, by culture and polymerase chain reaction (PCR), whether *Cp* and *Hp* are present in arteries from patients with atherosclerosis.

**Methods and results.** The design was a cross-sectional study, with 40 patients (22 diabetic and 18 non-diabetic) scheduled for a revascularization procedure. The methods of detection in atheroma

---

Correspondencia: Dr. D.A. de Luis.  
Caamaño, 51 bis, 3.º C. 47013 Valladolid.  
Correo electrónico: daniel.deluis@hrc.es

plaques included a PCR assay and culture of atheroma plaques to detect *Cp* and *Hp*. Serology was used to evaluate the patients previous contact with both microorganisms. In the overall group, 29 (72,5%) patients had a positive serology to *Hp* and 20 (50%) had a positive serology to *Cp* ( $p < 0,05$ ). In diabetic patients, 77,3% had a positive serology to *Hp* and 50% to *Cp* ( $p < 0,05$ ). In non-diabetic patients, 66,7% had a positive serology to *Hp* and 50% to *Cp* (difference non-significant). *Cp* was detected by PCR in a carotid atheroma of a single non-diabetic patient with positive serology and negative culture, who also had positive serology for *Hp* but negative PCR and culture. All diabetic and non-diabetic patients had negative PCR and culture for *Hp* in atheroma plaques.

**Conclusion.** This study provides evidence of the presence of *Cp*, but not *Hp*, in atheroma plaques. A chronic inflammatory response caused by persistent arterial infection may explain the association between *Cp* and atherosclerosis. The link between *Hp* and atherosclerosis may be explained by indirect effects.

## Introducción

La arteriosclerosis se comporta como un proceso inflamatorio crónico. El daño endotelial, la acumulación de macrófagos, la proliferación de células musculares lisas y la producción local de factores de crecimiento y moléculas de adhesión pueden considerarse como factores patogénicos en este proceso<sup>1</sup>.

Diversos estudios han sugerido que la infección por *Helicobacter pylori* puede contribuir en la patogenia de la enfermedad coronaria<sup>2-7</sup> y que la infección por *Chlamydia pneumoniae* se relaciona con el proceso arteriosclerótico en general<sup>8-10</sup>, debido a infecciones crónicas causadas por *C. pneumoniae* en el tracto respiratorio<sup>11</sup> y por *H. pylori* en el tubo digestivo<sup>12</sup>. Nuestro grupo ha demostrado la relación entre la infección por *H. pylori* y la existencia de un patrón de riesgo cardiovascular<sup>2,3</sup>. Además, algunos autores han conseguido demostrar la presencia de *C. pneumoniae* en arterias coronarias<sup>13</sup>; sin embargo, los hallazgos respecto al *H. pylori* han sido negativos<sup>14</sup>.

El objetivo de nuestro estudio fue determinar la presencia de *C. pneumoniae* y *H. pylori* en placas de ateroma de pacientes diabéticos y no diabéticos con arteriosclerosis.

## Métodos

### Pacientes

Durante 18 meses, se invitó a participar en el estudio a todos los pacientes que fueron sometidos a cirugía de revascularización por enfermedad isquémica de las carótidas y de las extremidades inferiores. Se reclutó a 40 pacientes (22 diabéticos y 18 no diabéticos) y en todos ellos se obtuvo un consentimiento informado.

### Obtención de muestras

Durante el acto quirúrgico se recogieron placas de ateroma de las carótidas y arterias de las extremidades inferiores en condiciones estériles. Los segmentos de arterias de 10 mm fueron colocados en un medio de transporte (Portagerm, BioMérieux, Marcy l'Étoile, Francia)<sup>15</sup> para análisis subsiguiente.

### Análisis de las placas

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** Las muestras fueron transportadas inmediatamente al laboratorio de Microbiología y congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  para ser procesadas posteriormente. Los segmentos arteriales fueron homogeneizados antes de realizar las técnicas diagnósticas (cultivo y PCR).

El procedimiento para la PCR consistió en la extracción del ADN de un homogeneizado de la muestra (50 a 100  $\mu\text{l}$ ) usando lisis con sodio dodecil sulfato (SDS), precipitación con CTAB (cetil-trimetil bromuro de amonio), extracción con fenol-cloroformo y resuspensión de la muestra en un volumen final de 60  $\mu\text{l}$  de agua destilada. De esta muestra de ADN se utilizaron 3  $\mu\text{l}$  para la PCR.

Para la PCR de *H. pylori*, a un volumen final de 100  $\mu\text{l}$  se añadieron: 0,25  $\mu\text{M}$  de desoxinucleósido trifosfato (dNTP), los cebadores (*primers*) 356F 5' CCA AAA GAC TTA GAC AAG TTG ATG 3' y 356R 5' CCT TCG TTG ATA GTR ATR TCT TC 3', 0,5 pM de cada uno, 1 búfer,  $\text{ClMg}_2$  1,5 mM, 2U de Taq polimerasa (Gibco, BL) y agua destilada estéril. La mezcla fue cubierta con 100  $\mu\text{l}$  de aceite mineral. Las condiciones de amplificación fueron 50 ciclos de  $94^{\circ}\text{C}$  durante 1 min,  $50^{\circ}\text{C}$  durante 1 min y  $72^{\circ}\text{C}$  durante 2 min. En cada ensayo de PCR se incluyeron un control positivo (ADN de *H. pylori* extraído de un cultivo) y un control negativo (agua destilada). Los cebadores de PCR amplifican específicamente un segmento de 356 pb pertenecientes al gen *ureA* de *H. pylori*<sup>16,17</sup>. De cada solución inicial de ADN se utilizaron 10  $\mu\text{l}$  en una PCR en dos pasos usando dos cebadores de *H. pylori*: 5' G CCA ATG GTA AAT TAG TTC (nucleótido 304) y 5' CTC CTT AAT TGT TTT TAC AT (nucleótido 714R); el tamaño esperado del producto de PCR era de 411 pb<sup>18</sup>.

Para *C. pneumoniae* se efectuó una PCR en un primer paso con el cebador 71-91: 5' ATA ATG ACT TCG GTT GTT 3'; 1448-1468: 5' TAT AAA TAG GTT GAG TCA 3' y, en un segundo paso, con el cebador 177-199: 5' AGT GTA ATT AGG CAT CTA ATA 3'; 1018-1035: 5' GCT GTA TTT CTA CAG TTG 3'. El segundo paso de la PCR se realizó utilizando diluciones 1:1.000 del producto de la primera PCR<sup>19</sup>.

Para el cultivo de *H. pylori*, 50 de los 100  $\mu\text{l}$  de homogeneizado fueron sembrados en una placa de Agar (BioMérieux) e incubados a  $35^{\circ}\text{C}$  en condiciones microaerófilas (Campy Pack Plus, BBL) durante 10 días.

Los cultivos de *C. pneumoniae* fueron realizados con células HeLa 229, sembradas 24 h antes de la inoculación<sup>20</sup>. Se añadió medio de cultivo (medio de Dubelcco modificado por Iscove) (GIBCO), y las placas se cultivaron durante 48 y 72 h. Los cultivos de *H. pylori* se realizaron en todas las muestras,

**Tabla 1**

| Pacientes | Localización arteria | Cultivo          |                      | PCR              |                      | Serología        |                      |
|-----------|----------------------|------------------|----------------------|------------------|----------------------|------------------|----------------------|
|           |                      | <i>H. pylori</i> | <i>C. pneumoniae</i> | <i>H. pylori</i> | <i>C. pneumoniae</i> | <i>H. pylori</i> | <i>C. pneumoniae</i> |
| 1         | Poplítea             | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | IgG +            | (-)                  |
| 2         | Carótida             | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | IgG +            | (-)                  |
| 3         | Carótida             | (-)              | (-)                  | (-)              | (+)                  | IgG +            | IgG +                |
| 4         | Carótida             | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | IgG +            | (-)                  |
| 5         | Carótida             | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | IgG +            | (-)                  |
| 6         | Carótida             | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | IgG +            | IgG +                |
| 7         | Carótida             | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | IgG+             | (-)                  |
| 8         | Poplítea             | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | IgG +            | (-)                  |
| 9         | Carótida             | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | IgG +            | (-)                  |
| 10        | Carótida             | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | IgG +            | (-)                  |
| 11        | Poplítea             | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | IgG +            | (-)                  |
| 12        | Carótida             | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | IgG +            | (-)                  |
| 13        | Carótida             | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | (-)              | IgG +                |
| 14        | Carótida             | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | (-)              | IgG +                |
| 15        | Carótida             | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | IgG +            | (-)                  |
| 16        | Aorta                | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | IgG +            | IgG +                |
| 17        | Poplítea             | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | (-)              | IgG +                |
| 18        | Aorta                | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | IgG +            | IgG +                |
| 19        | Poplítea             | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | IgG +            | IgG +                |
| 20        | Carótida             | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | IgG +            | (-)                  |
| 21        | Poplítea             | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | (-)              | IgG +                |
| 22        | Aorta                | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | (-)              | IgG +                |
| 23        | Aorta                | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | IgG +            | IgG +                |
| 24        | Poplítea             | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | IgG +            | (-)                  |
| 25        | Carótida             | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | IgG +            | IgG +                |
| 26        | Aorta                | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | (-)              | IgG +                |
| 27        | Aorta                | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | (-)              | IgG +                |
| 28        | Carótida             | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | (-)              | (-)                  |
| 29        | Carótida             | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | IgG +            | IgG +                |
| 30        | Aorta                | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | (-)              | IgG +                |
| 31        | Carótida             | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | (-)              | (-)                  |
| 32        | Aorta                | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | (-)              | IgG +                |
| 33        | Carótida             | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | IgG +            | IgG +                |
| 34        | Aorta                | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | IgG +            | (-)                  |
| 35        | Aorta                | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | IgG +            | IgG +                |
| 36        | Aorta                | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | IgG +            | (-)                  |
| 37        | Aorta                | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | IgG +            | (-)                  |
| 38        | Carótida             | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | IgG +            | (-)                  |
| 39        | Carótida             | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | IgG +            | (-)                  |
| 40        | Carótida             | (-)              |                      | (-)              | (-)                  | IgG +            | IgG +                |

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

mientras que los de *C. pneumoniae* sólo se efectuaron en los pacientes con una PCR positiva.

**Test serológicos.** Los títulos de IgG e IgM frente a *C. pneumoniae* se determinaron mediante inmunofluorescencia indirecta, considerándose como positiva una absorbancia superior a 0,100<sup>21</sup>. Las IgG específicas frente a *H. pylori* se midieron mediante un enzoinmunoensayo (ELISA, VARELISA, Elias Inc., Osceola, EE.UU.). El punto recomendado de corte fue 10 U/ml, con una sensibilidad del 92% y una especificidad del 94%<sup>22</sup>.

## Resultados

### Pacientes

Se obtuvieron placas de ateroma de todos los pacientes que entraron en el estudio (tabla 1). Ninguno

de los 40 pacientes tenía historia reciente de infección de las vías respiratorias; sin embargo, algunos presentaban antecedente de úlcera duodenal.

### Serología

Un total de 20 pacientes (50%) presentaron anticuerpos frente a *C. pneumoniae* (tabla 1). No se encontró correlación entre los títulos de anticuerpos y la evidencia de *C. pneumoniae* por PCR, ni de los títulos de anticuerpos y la gravedad de las lesiones de arteriosclerosis.

En el grupo total, 29 pacientes (72,5%) presentaron títulos positivos frente a *H. pylori*. No se encontró correlación entre los títulos de anticuerpos y la

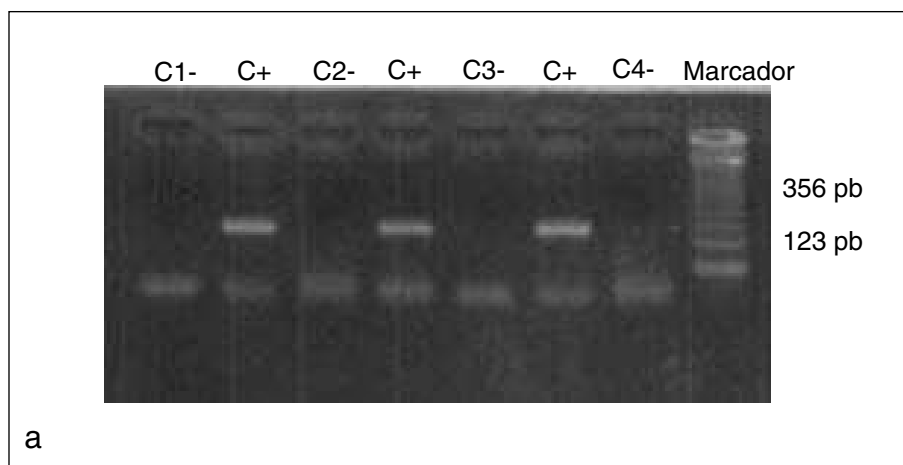


Figura 1a. Reacción en cadena de la polimerasa de *H. pylori*, con C+ (control positivo) y C1, C2, C3, C4 (placas de ateroma) negativas.

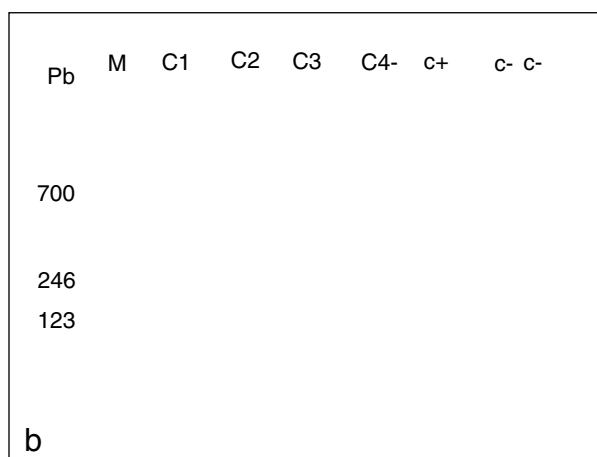


Figura 1b. Reacción en cadena de la polimerasa de *C. pneumoniae*, con C+ (control positivo), C- (control negativo), y C1, C2, C3, C4 (placas de ateroma), con una placa positiva C1.

gravidad de las placas de ateroma. El porcentaje de pacientes positivos a *H. pylori* fue superior al de pacientes positivos a *C. pneumoniae* (un 72,5 frente a un 50%;  $p < 0,05$ ). De los pacientes diabéticos, un 77,3% tuvo serología positiva a *H. pylori* y un 50% a *C. pneumoniae* ( $p < 0,05$ ). De los pacientes no diabéticos, un 66,7% tuvo serología positiva a *H. pylori* y un 50% a *C. pneumoniae*, sin detectarse diferencias significativas.

#### Reacción en cadena de polimerasa

Se demostró la presencia de *C. pneumoniae* en una placa de ateroma procedente de la carótida en el paciente número 3. Los cultivos de *C. pneumoniae* y *H. pylori* en las placas de ateroma de este paciente fueron negativos, presentando serología positiva a ambos gérmenes (fig. 1a). No se detectó la presencia de *H. pylori* en ninguna placa de ateroma (fig. 1b).

#### Discusión

Nuestro estudio, realizado en una muestra de pacientes diabéticos y no diabéticos, demuestra la escasa presencia de *C. pneumoniae* en placas de ateroma, en sólo un paciente, y la nula presencia de *H. pylori*. No obstante, en la bibliografía existen diversos estudios que han demostrado la presencia de *C. pneumoniae* en placas de ateroma (véase la referencia bibliográfica 23 para una revisión exhaustiva).

Parece que la infección crónica de la pared arterial por *C. pneumoniae* puede contribuir a la patogenia de la arteriosclerosis. Se ha demostrado que *C. pneumoniae* es capaz de infectar y reproducirse en células musculares lisas de la pared arterial, así como en células endoteliales y en macrófagos<sup>24</sup>. De acuerdo con la hipótesis inflamatoria de la arteriosclerosis, estas células generarían un foco inflamatorio en esta zona que iniciaría la lesión arteriosclerótica. En algunos estudios, el germen se ha aislado en pacientes con lesiones arterioscleróticas, pero no en pacientes sin evidencia de lesión arteriosclerótica<sup>25</sup>. La discrepancia entre la escasa presencia de *C. pneumoniae* en este estudio con otros trabajos con proporciones variables pero superiores de detección es difícil de explicar. Tal vez estén en relación con la diversidad de áreas de ateroma utilizados en nuestro trabajo (arterias carótida, aorta y poplítea) o con la infección por cepas de *C. pneumoniae* con menor virulencia en los pacientes estudiados.

En nuestro estudio no se detectó la presencia de *H. pylori* en placas de ateroma, un resultado que está en consonancia con los obtenidos por otros grupos<sup>14</sup>. No obstante, en la bibliografía se ha relacionado la infección crónica por este germen con un aumento del riesgo cardiovascular; es posible que este riesgo aumentado esté en relación con

otros efectos de la infección por *H. pylori*, como pueden ser modificaciones del perfil lipídico<sup>3</sup>. El aumento del riesgo cardiovascular puede estar relacionado con modificaciones típicas de procesos infecciosos crónicos o con alteraciones de las cifras de fibrinógeno, triglicéridos, factor de necrosis tumoral e interleucina 6<sup>25-34</sup>. Incluso se ha descrito que puede haber un aumento de los procesos de oxidación de lipoproteínas en este tipo de infecciones crónicas<sup>35,36</sup>.

Con respecto a la seroprevalencia de las infecciones por *H. pylori* y *C. pneumoniae*, y en consonancia con estudios previos<sup>23,37</sup>, se detectó una alta tasa de infección por *H. pylori* en pacientes diabéticos. Esto está probablemente relacionado con una mayor susceptibilidad a la infección en estos pacientes.

En conclusión, nuestro estudio demuestra la nula presencia de *H. pylori* y escasa de *C. pneumoniae* en placas de ateroma. La relación entre arteriosclerosis e infección por *C. pneumoniae* podría explicarse por la infección directa de la pared arterial, no así la infección por *H. pylori*.

## Bibliografía

- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 62: 801-809.
- De Luis DA, Lahera M, Cantón R, Boixeda D, San Román AL, Aller R et al. Association of *Helicobacter pylori* infection with cardiovascular and cerebrovascular disease in diabetic patients. *Diabetes Care* 1998; 21: 1129-1132.
- De Luis DA, García Abelló A, Lasunción MA, Aller R, Martín de Argila C, Boixeda D et al. Improvement in lipid and haemostasis patterns after *H. pylori* infection eradication in type 1 diabetic patients. *Clin Nutr* 1999; 18: 227-231.
- Martín de Argila C, Boixeda D, Cantón R, Gisbert JP, Fuertes A. High seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in coronary heart disease. *Lancet* 1995; 346: 310.
- Danesh J, Collins R, Peto R. Chronic infection and coronary heart disease: is there a link? *Lancet* 1997; 350: 430-436.
- Danesh J, Peto R. Risk factors for coronary heart disease and infection with *Helicobacter pylori*: meta analysis of 18 studies. *Br Med J* 1998; 316: 1130-1132.
- Pérez Poveda JJ, Gisbert J, Pajares JM. *Helicobacter pylori* y cardiopatía isquémica. *Gastroenterol Hepatol* 2000; 23: 99-103.
- Saikkku P, Leinonen M, Mattila K, Ekman MR, Nieminen MS, Mäkelä PH. Serological evidence of an association of a novel *Chlamydia*, TWAR, with coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet* 1988; 2: 936-938.
- Thom DH, Grayston JT, Siscovick DS, Wang SP, Weiss NS, Daling JR. Association of prior infection with *Chlamydia pneumoniae* and angiographically demonstrated coronary artery disease. *JAMA* 1992; 268: 68-72.
- Kuo CC, Shor A, Campbell LA, Fukushi H, Patton DL, Grayston JT. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic lesions of coronary arteries. *J Infect Dis* 1993; 167: 841-849.
- Hammerschlag MR, Chirgwin K, Roblin PM, Gelling M, Dumornay W, Mandel L. Persistent infection with *Chlamydia pneumoniae* following acute respiratory illness. *Clin Infect Dis* 1992; 14: 178-182.
- Peterson WL. *Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 1043-1048.
- Ramírez JA, and the *Chlamydia pneumoniae*/Atherosclerosis Study Group. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from the coronary artery of a patient with coronary atherosclerosis. *Ann Intern Med* 1996; 125: 979-982.
- Blasi F, Denti F, Erba M, Cosentini R, Raccanelli R, Rivaldi R et al. Detection of *Chlamydia pneumoniae* but not *Helicobacter pylori* in atherosclerotic plaques from aortic aneurysms. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2766-2769.
- Megraud F. Diagnosis of *H. pylori* infection. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31 (Supl 214): 44-46.
- Mobley HLT, Cortesia MJ, Rosenthal LE, Jones BD. Characterization of urease from *Campylobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 83-86.
- Clayton CL, Pallen MJ, Kleanthous H, Wren BW, Tabaqchali S. Nucleotide sequence of two genes from *Helicobacter pylori* encoding for urease subunits. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 362.
- Wang JT, Lin JT, Sheu JC, Yang JC, Chen DS, Wang TH. Detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy tissue by polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12: 367-371.
- Black CM, Fields PI, Messmer TO, Berdal BP. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in clinical specimens by polymerase chain reaction using nested PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13: 752-756.
- Krajden S, Bohnen J, Anderson J. Comparison of selective and non-selective media for recovery of *Campylobacter pylori* from antral biopsies. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 1117-1118.
- Wang SP, Kuo CC, Grayston JT. Formalized *Chlamydia trachomatis* organisms as antigen in the micro-immunofluorescence test. *J Clin Microbiol* 1979; 10: 259-261.
- Booth L, Holdstock G, MacBride H. Clinical importance of *Campylobacter pylori* and associated serum Ig-G and Ig-A antibody responses in patients undergoing upper gastrointestinal endoscopy. *J Clin Pathol* 1986; 39: 215-219.
- Taylor-Robinson D, Thomas JD. *C. pneumoniae* in arteries; the facts, their interpretations, and future studies. *J Clin Pathol* 1998; 51: 793-797.
- Gaydos CA, Summersgill JT, Sahney NN, Ramírez JA, Quinn TC. Replication of *Chlamydia pneumoniae* in vitro in human macrophages, endothelial cells, and aortic artery smooth muscle cells. *Infect Immun* 1996; 64: 1614-1620.
- Kweider M, Lowe GDO, Murray GD, Kinane DF, McGwn DA. Dental disease, fibrinogen and white cell count: links with myocardial infarction? *Scot Med J* 1993; 38: 73-74.
- Mattila KJ, Nieminen MS, Vltone W, Rsi VP, Kesaniemi Y, Syrjala S. Association between dental health and acute myocardial infarction. *Brit Med J* 1989; 298: 779-781.
- Crabtree JE, Shallcross TM, Healtley RV, Wyatt JJ. Mucosal tumour necrosis factor and interleukin-6 in patients with *Helicobacter pylori* associated gastritis. *Gut* 1991; 32: 1473-1477.
- Harlan JM, Harker LA, Reidy MA, Gadusek CM, Schwartz SM, Striker GE. Lipopolysaccharide-mediated bovine endothelial cell injury in vitro. *Lab Invest* 1983; 48: 269-274.
- Harlan JM, Harker LA, Striker GE, Weaver LJ. Effects of lipopolysaccharide on human endothelial cells in culture. *Thromb Res* 1983; 29: 15-26.
- Kapp A, Luger T, Mly DG, Travers RI, Skray RK. Hyperlipidemia fatty liver and bromosulphthalein retention in rabbits injected intravenously with bacterial endotoxins. *J Lipid Res* 1964; 5: 563-568.
- Fiser RH, Denniston JC, Beisel WR. Infection with *Diplococcus pneumoniae* and *Salmonella typhimurium* in monkeys: Changes in plasma lipids and lipoproteins. *J Infect Dis* 1972; 125: 54-60.
- Kaufman RL, Matson CF, Rowberg AH. Defective lipid disposal mechanisms during bacterial infection in Rhesus monkeys. *Metabolism* 1976; 25: 615-624.
- Samalkorpi K, Valtonen V, Kerttula Y, Nikkila E, Taskinen MR. Changes in serum lipoproteins pattern induced by acute infections. *Metabolism* 1988; 37: 859-865.
- Kerttula Y, Vaara M, Pihälä L. Effect of bacterial lipopolysaccharide on serum high density lipoprotein cholesterol in rabbits. *Atherosclerosis* 1984; 52: 123-126.
- Cathcart MK, McNally K, Morel DW, Chisolm GM. The role of superoxide anion in human monocyte-mediated oxidation and conversion of LDL to a cytotoxin. *J Immunol* 1988; 142: 1963-1969.
- Phull PS, Price AB, Thorniley MS, Green CJ, Jacyna MR. Plasma free radical activity and antioxidant vitamin levels in dyspeptic patients: correlation with smoking and *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998; 10: 573-578.
- De Luis DA, de la Calle H, Roy G, Martín de Argila C, Valdezate S, Cantón R, Boixeda D. *H. pylori* infection and insulin dependent diabetes mellitus. *Diab Res Clin Pract* 1998; 39: 143-146.