



SeroCP™ IgG (RT)

**ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
pro stanovení protilátek IgG proti *Ch.
pneumoniae* v lidském séru.**

Návod k použití

Testovací souprava pro 96 stanovení.
(Katalogové č. 1191-01)

Skladujte při 2 – 8°C. **Nezmrazujte.**
Pouze pro *in vitro* stanovení.
Pouze pro profesionální použití.

Dovází: GALI spol. s r.o.
Ke Stadionu 179, Semily 513 01
Tel. 481 689 050
Fax. 481 689 051
E-mail: info@gali.cz

Vyrábí: Savyon Diagnostics Ltd.
3 Habosem St. Ashdod 7761003
ISRAEL
Tel. +972.8.8562920
Fax. +972.8.8523176
E-mail: support@savyondiagnosics.com

Použití

SeroCP™ IgG (RT) souprava se používá pro stanovení specifických IgG protilátek proti *Ch. pneumoniae* ve vzorku lidského séra.

Souprava SeroCP™ IgG (RT) je kvalitativní Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) test, který se používá jako diagnostická pomůcka při stanovení infekce *Ch. pneumoniae*. Souprava SeroCP™ IgG (RT) je novou konfigurací ELISA testu, který přináší následující výhody: inkubace při pokojové teplotě, krátká doba testu a využití konjugátů připravených k použití.

Pro *in vitro* diagnostické účely.

Úvod

Chlamydia pneumoniae (TWAR183) je nově objevený infekční činitel s rozsáhlými klinickými projevy zahrnující infekci horních a dolních cest dýchacích (1). Většina infekcí způsobených *Ch. pneumoniae* je mírná, asymptomatická a proto též špatně detekovatelná. *Ch. pneumoniae* může způsobovat mnoho onemocnění jako je např.: faryngitida, sinusitida, akutní bronchitida a společně pneumonie. Nedetekované a neléčené infekce mohou být příčinou dlouhých persistentních onemocnění. Nedávno získaná data naznačují souvislost mezi *Ch. pneumoniae* a chronickým onemocněním (2).

Prevalence *Ch. pneumoniae* mezi dětmi je nízká a prudce se zvyšuje v dospívání, pokračuje zvýšením ve středním věku a ve vysoké hodnotě přetrvává (>50%) do staršího věku.

Potíže spojené s odběrem vzorků a určením místa infekce dělají z přímých metod metody špatně proveditelné, a proto se stále více používají metody nepřímé, kde se protilátky stanovují ze séra pacienta. Serologické testy slouží jako neinvazivní nástroj při určování distálních a chronických infekcí (3), kde přímé metody nejsou dostatečně citlivé (4). Kromě toho přítomnost určitých typů protilátek může také stanovit stádium onemocnění.

Primární chlamydiová infekce je charakterizována převládající imunitní odpovědí IgM během 2-4 týdnů a s následnou imunitní odpovědí IgA a IgG protilátek během 6-8 týdnů. Po proběhnutí akutní chlamydiové infekce vymizí IgM protilátky během 2-6 měsíců (5), titry IgG protilátek se zvyšují a obvykle se snižují pomalu; kdežto IgA protilátky mizí rychleji (6). Pokud se předpokládá primární chlamydiová infekce má detekce IgM protilátek vysoký diagnostický význam (7). Nicméně jejich nepřítomnost nevylučuje možnost pokračující infekce, hlavně při opakovaných nebo chronických případech.

Při reinfekci, IgA a IgG protilátky stoupají rychle, často v rozmezí jednoho až dvou týdnů (8).

IgA protilátky se projeví jako účinný imunologický marker primární, chronické nebo opakující se infekce. Tyto protilátky obvykle rychle klesají na základní hladinu po následném léčení a odeznění chlamydiové infekce (3). Přetrvání zvýšené hodnoty IgA protilátek je hlavně považováno jako znak chronické infekce (6).

IgG protilátky přetrvávají po dlouhou dobu a klesají velmi pozvolna. Proto je přítomnost IgG protilátek hlavním znakem chlamydiové infekce v neurčitěm čase. Jakékoli zvýšení hodnot IgG protilátek může určovat přicházející chronickou nebo systémovou infekci.

SeroCP™ RT je ELISA soupravou, ve které se používají purifikovaná elementární tělíska *Ch. pneumoniae* (TWAR-183) jako antigeny pro stanovení protilátkové odpovědi u lidí. Pro kompletní diagnózu probíhající, chronické nebo proběhlé infekce se doporučuje stanovení IgA, IgM a IgG protilátek proti *Ch. pneumoniae*.

Princip testu

- SeroCP™ RT destičky jsou pokryty specifickými peptidy *Ch. pneumoniae*.
- Naředěné testované sérum se inkubuje v Sero CP™ RT jamkách mikrotitrační destičky 30 min. při pokojové teplotě (RT). Specifická protilátka přítomná v séru pacienta se naváže na antigen navázaný na mikrodestičce.
- Nespecifické protilátky jsou odstraněny promytím.
- Dále se přidává křenová peroxidáza (HRP) konjugovaná s anti-lidskou IgG, inkubace 30 min. při pokojové teplotě. Jestliže v prvním kroku vznikl komplex antigen-protilátka, HRP značená protilátka se naváže na protilátku a vytvoří komplex.
- Nenavázaný konjugát je odstraněn promytím.
- V dalším kroku je do jamek přidáván chromogenní substrát, který při pozitivní enzymatické reakci vytvoří modré zbarvení.

- Enzymatická reakce je ukončena stop činidlem (1M H₂SO₄). Modré zabarvení se změní na žluté. Absorbance se měří při 450/620 nm.
- Hodnota absorbance je proporcionálně úměrná hladině specifických protilátek navázaných na kautované antigeny specifické pro *Ch. pneumoniae*.

Součásti kitu: pro Manuální/Automatizované použití

Souprava na 96 stanovení Kat.č. A1191-01M / A1191-01D

1. **Mikrotitrační destička kautovaná specifickými antigeny *ch. pneumoniae*:** 96 odlamovatelných jamek (8x12), zabalené v hliníkové fólii se sušidlem.
1 destička / 1 destička
2. **Koncentrovaný promývací pufr 20X):** PBS - Tween pufr.
1 lahvička, 100 ml / 1 lahvička, 100 ml
3. **Roztok na ředění sér-RT (modrý):** v pracovní koncentraci. S obsahem méně než 0.05% proclinu jako konzervačního prostředku.
1 lahvička, 30 ml / 1 lahvička, 60 ml
4. **HRP-konjugát připraven k použití (zelený):** Křenovou peroxidázou (HRP) značený anti-lidský IgG (gamma řetězec specifický). S obsahem méně než 0.05% proclinu jako konzervačního prostředku.
1 lahvička, 10ml
5. **Cut Off Kontrola:** *C. pneumoniae* IgG sérum připravené k použití pro cut off determinaci. S obsahem méně než 0.05% proclinu a méně než 0,1% azidu sodného jako konzervačního prostředku.
1 lahvička, 2,5 ml / 1 lahvička, 2,5 ml
6. **Negativní kontrola:** V pracovní koncentraci. Lidské sérum negativní na IgG. S obsahem méně než 0.05% proclinu a méně než 0,1% azidu sodného jako konzervačního prostředku..
1 lahvička, 2 ml / 1 lahvička, 2 ml
7. **Pozitivní kontrola:** V pracovní koncentraci. Lidské sérum pozitivní na IgG. S obsahem méně než 0.05% proclinu a méně než 0,1% azidu sodného jako konzervačního prostředku.
1 lahvička, 2 ml / 1 lahvička, 2 ml
8. **TMB substrát:** v pracovní koncentraci, obsahuje 3,3',5,5'- tetramethylbenzidín jako chromogen a peroxid jako substrát
1 lahvička, 14 ml / 1 lahvička, 16 ml
9. **Stop roztok:** V pracovní koncentraci.. Obsahující 1M H₂SO₄.
1 lahvička, 15 ml / 1 lahvička, 16 ml
10. **Fólie na přikrytí destiček:** **1 / není**
11. **Návod k použití:** **1 / 1**

Potřebný materiál, nedodávaný v soupravě

1. naprosto čisté zkumavky pro ředění séra pacienta
2. vhodné mikropipety nebo multi-kanálové pipety (5-50, 50-200 a 200-1000 µl) a špičky
3. jednolitrová volumetrická láhev
4. 50 ml volumetrický válec
5. promývač ELISA destiček nebo promývací nádoba
6. filtrační papír
7. vortexové míchadlo
8. reader s filtrem 450/620 nm pro měření mikrodestiček
9. destilovaná nebo dvakrát deionizovaná voda pro ředění promývacího pufru

Přehled kroků: Manuálně/Automatizovaně

Manuální postup:

Jamky mikrotitrační destičky jsou kautovány specifickými antigeny *Ch. pneumoniae*

↓

Přidejte 2x50µl Cut Off kontroly
přidejte 1x50µl negativní kontroly, 1x50µl pozitivní kontroly, a všech nařaděných vzorků

↓

destičku přikryjte a inkubujte 30 min. při pokojové teplotě

↓

5x promyjte promývacím pufr

↓

přidejte 50µl HRP konjugátu připraveného k použití

↓

destičku přikryjte a inkubujte 30 min. při pokojové teplotě

↓

5x promyjte promývacím pufr

↓

přidejte 100µl TMB-Substrátu

↓

Destičku přikryjte a inkubujte 30min. při pokojové teplotě

↓

Přidejte 100µl Stop roztoku

↓

Absorbanci odečítejte při 450/620 nm

↓

Vypočítejte a interpretujte výsledky

Automatizovaný postup:

Jamky mikrotitrační destičky jsou kautovány specifickými antigeny *Ch. pneumoniae*

↓

Přidejte 2x100µl Cut Off kontroly
přidejte 1x100µl negativní kontroly, 1x100µl pozitivní kontroly, a všech nařaděných vzorků

↓

destičku inkubujte 20 min. při pokojové teplotě

↓

5x promyjte promývacím pufr

↓

přidejte 50µl HRP konjugátu připraveného k použití

↓

destičku inkubujte 30 min. při pokojové teplotě

↓

5x promyjte promývacím pufr

↓

přidejte 100µl TMB-Substrátu

↓

destičku inkubujte 30min. při pokojové teplotě

↓

Přidejte 100µl Stop roztoku

↓

Absorbanci odečítejte při 450/620 nm

↓

Vypočítejte a interpretujte výsledky

Upozornění

Pouze pro *in vitro* diagnostické použití

- Tato souprava obsahuje lidská séra, která byla testována technikami podle FDA a CE. Séra jsou negativní na HBsAg a protilátky proti HCV a HIV 1 & 2, nicméně, jelikož žádná známá metoda nemůže zaručit s úplnou jistotou, že výrobky derivované z lidské krve nepřenesou infekci, se všemi komponenty z lidské krve, obsaženými v této soupravě se musí zacházet jako s potenciálně infekčním sérem nebo krví, způsobem identickým (nebo podobným) s doporučením publikovaným v CDC/NIH manuálu „Biobezpečnost mikrobiologických a lékařských laboratořích“, 1988.
- Roztok chromogenního substrátu působí dráždivě na pokožku a mukózní membrány. Vyvarujte se přímého kontaktu.
- Kyselina sírová (1M H₂SO₄) je pro oči a pokožku dráždivá. V případě kontaktu s oční sliznicí vyplachujte oko proudem vody a kontaktujte lékaře.
- Všechny součásti kitu jsou kalibrovány na danou šarži. Kombinování součástí kitů různých šarží může ovlivnit výsledek stanovení.

Uchovávání a trvanlivost reagensů

1. Všechny dodávané materiály je nutno skladovat při teplotě 2 až 8°C. Reagensy, uchovávané při teplotě 2 až 8°C, jsou stabilní do data expirace, vyznačeného na obalu soupravy. Expozice složek soupravy (v originálních obalech) pokojové teplotě po dobu několika hodin nezpůsobí zničení reagensů. **Reagensy nezmrazujte.**
2. Životnost kitu po otevření je 90 dní.
3. Nepoužité stripy se musí skladovat v hliníkové fólii společně se sušidlem.
4. V koncentrovaném promývacím pufru 20x se mohou během skladování tvořit krystalky. Toto je běžné. Krystalky rozpustíte zahřátím pufru na 37°C ještě před jeho ředěním. Naředěný pufr skladujte při 2-8°C a to po dobu maximálně 21 dní.

Odběr vzorků

Vzorky sér se odebírají asepticky standardními technikami. Tepelně inaktivovaná séra nemohou být použita. Nedoporučuje se použití lipemických, zakalených a kontaminovaných sér. Drobné částice a sraženiny v séru mohou způsobovat chybné výsledky. Tyto vzorky by měly být před stanovením vyčeřeny centrifugací nebo filtrací.

Skladování vzorků

Vzorky by se měly skladovat při teplotě 2-8°C pokud jsou testovány během 7 dní (doporučuje se přidávek 0,1% azidu sodného). Pro delší uchování je nutno alikvoty séra uchovávat při teplotě -20°C. Vyhněte se opakovanému mrazení a rozmrazování séra.

Pracovní postup pro Manuální použití

Tento pracovní postup je pro manuální použití, pro automatizované použití viz pracovní postup níže.

A. Příprava reagensů.

1. Všechny testovací reagensy a vzorky před použitím vytemperujte na laboratorní teplotu. Před použitím dobře promíchejte Cut Off kontrolu, negativní kontrolu, pozitivní kontrolu a testované vzorky sér.
2. Určete celkové množství jamek potřebných na testování. Kromě vzorků pacienta musí být v každém měření zahrnuty dvě jamky pro Cut Off kontrolu, jedna jamka pro negativní kontrolu a jedna jamka pro pozitivní kontrolu.
3. Vyjměte mikrodestičku z hliníkové folie rozstřížením jednoho konce blízko sváru. Odeberte potřebné množství stripů (odpovídající množství testovaných vzorků) z 96 jamkového rámečku.
4. Zřeďte 1/20 koncentrovaný promývací pufr deionizovanou nebo destilovanou vodou. Pro příklad: pro přípravu 1L promývacího pufru přidejte k 50ml koncentrovaného roztoku promývacího pufru 950ml dvakrát deionizované nebo destilované vody.

B. Inkubace vzorků sér a kontrol.

5. Naředěte každý vzorek pacienta roztokem na ředění sér – RT v poměru 1/110 následovně: Přidejte 10μl séra pacienta k 1090μl roztoku na ředění sér.
6. Pipetujte Cut Off kontrolu v duplikátu: 50μl do každé jamky. Pipetujte 50μl negativní kontroly, 50μl pozitivní kontroly a 50μl sér naředěných v poměru 1/110 do příslušných jamek na stripu.
7. Přikryjte strip víčkem a inkubujte 30 min. při laboratorní teplotě (22 – 28°C).
8. Odstraňte přebytečné tekutiny z jamek.
9. **Promývací krok:** naplňte každou jamku promývacím pufrům (300-350μl) po okraj a poté tekutinu odstraňte. Postup opakujte 4x.
10. Osušte stripy a rámeček jemným poklepáním na absorpčním papíru.

C. Inkubace s konjugátem.

11. Pipetujte 50μl HRP konjugátu připraveného k použití do každé jamky.
12. Přikryjte strip víčkem a inkubujte 30 min. při laboratorní teplotě (22 – 28°C).
13. Odstraňte přebytečné tekutiny z jamek a proveďte promývací krok, jak je uvedeno v bodě 9-10.

D. Inkubování s TMB-substrátem.

14. Pipetujte 100μl roztoku TMB-Substrátu do každé z jamek, přikryjte víčkem a inkubujte při laboratorní teplotě (22 – 28°C) po dobu 30 min.
15. Reakci ukončete přidáním 100 μl Stop roztoku (1M H₂SO₄) do každé z jamek.

E. Odečtení výsledků.

16. Proměřte absorbanci při 450/620 nm a výsledek zapište. Odečtení může být provedeno do 30 min od zastavení chromogenní reakce.

Pozn.: Před odečtením nesmí jamka obsahovat žádná bublinky. Dno destičky musí být opatrně očištěno.

Pracovní postup pro Automatizované použití

Objemy lahvíček a reagensů byly uzpůsobeny pro automatizované použití.

A. Příprava reagensů.

1. Všechny testovací reagensie a vzorky před použitím vytemperujte na laboratorní teplotu. Před použitím dobře promíchejte Cut Off kontrolu, negativní kontrolu, pozitivní kontrolu a testované vzorky sér.
2. Určete celkové množství jamek potřebných na testování. Kromě vzorků pacienta musí být v každém měření zahrnuty dvě jamky pro Cut Off kontrolu, jedna jamka pro negativní kontrolu a jedna jamka pro pozitivní kontrolu.
3. Vyjměte mikrodestičku z hliníkové folie rozstřížením jednoho konce blízko sváru. Odeberte potřebné množství stripů (odpovídající množství testovaných vzorků) z 96 jamkového rámečku.
4. Zředte 1/20 koncentrovaný promývací pufr deionizovanou nebo destilovanou vodou. Pro příklad: pro přípravu 1L promývacího pufru přidejte k 50ml koncentrovaného roztoku promývacího pufru 950ml dvakrát deionizované nebo destilované vody.

B. Inkubace vzorků sér a kontrol.

5. Naředte každé sérum pacienta v poměru 1/110 následovně: Odpipetujte 1090 μ l roztoku na ředění sér-RT do každé zkumavky na vzorky. Přidejte 10 μ l séra pacienta do každé zkumavky.
6. Pipetujte 100 μ l negativní kontroly, 100 μ l pozitivní kontroly, 2 x 100 μ l (v duplikátu) Cut Off kontroly a 100 μ l sér naředěných v poměru 1/110 do příslušných jamek na stripu.
7. Inkubujte 20 min. při laboratorní teplotě (22 – 28°C).
8. Eliminujte "assay drift", který může být způsoben předchozími kroky.
9. **Promývací krok:** Proveďte 5 promývacích cyklů za využití 500 μ l promývacího pufru.
10. Proveďte 2 aspirační cykly pro vysušení.

C. Inkubace s konjugátem.

11. Pipetujte 50 μ l HRP konjugátu připraveného k použití do každé jamky.
12. Inkubujte 30 min. při laboratorní teplotě (22 – 28°C).
13. Proveďte promývací krok tak, jak je uvedeno v bodě 9-10.

D. Inkubování s TMB-substrátem.

14. Odpipetujte 100 μ l roztoku TMB-Substrátu do každé z jamek a inkubujte ve tmě při laboratorní teplotě (22-28°C) po dobu 30 min.
15. Reakci ukončete přidáním 100 μ l roztoku Stop roztoku (1M H₂SO₄) do každé z jamek.

E. Odečtení výsledků.

16. Proměřte absorbanci při 450/620 nm a výsledek zapište. Odečtení může být provedeno do 30 min od zastavení chromogenní reakce.

Veďte prosím na vědomí, že každý automatický přístroj má své specifické technické požadavky. Prosím aplikujte automatizovaný pracovní postup pro tuto soupravu do operačního protokolu Vašeho automatického přístroje.

Validita testu

Aby byl test považován za validní, musí být splněny následující podmínky. Pokud nejsou splněny tyto podmínky, není test validní a musí být zopakován.

1. O.D. Pozitivní kontrola $\geq 0,8$
2. Poměr O.D. Pozitivní kontrola / O.D. Cut Off kontrola > 2
3. O.D. Negativní kontrola $< 0,3$

Výpočet výsledků testu

1. Vypočítejte průměrnou hodnotu absorbance Cut Off kontrol, které byly analyzovány v duplikátu.
2. Aby byly výsledky získané z různých testů normalizované, vypočítává se hodnota COI (cut off index) podle následujícího vztahu:

$$COI = \frac{O.D. (optická hustota, absorbance) vzorku séra}{Průměr O.D. Cut Off kontrol}$$

Interpretace výsledků

Tabulka 1:

COI	Výsledek	Interpretace výsledků
<1.0	Negativní nedetekovatelné IgG protilátky	Není identifikována probíhající infekce <i>Ch. pneumoniae</i>
1-1.1	Hraniční nízká hladina IgG protilátek	Indikuje možnost expozice k <i>Ch. pneumoniae</i> Po 2-4 týdnech se odebere a testuje druhý vzorek séra ¹
>1.1	Pozitivní zvýšená hladina IgG protilátek	Ukazuje na současnou či v minulosti prodělanou infekci <i>Ch. pneumoniae</i> ²

1. Současně s testováním druhého vzorku je třeba testovat i vzorek první (původní).
2. Ve snaze odlišit, zda se jedná o současnou či v minulosti prodělanou infekci, je doporučeno analyzovat druhý vzorek po 2 – 4 týdnech.

Ve snaze dosáhnout komplexnějšího protilátkového profilu, je třeba testovat i protilátky třídy IgM a IgA

Tabulka2: Interpretace výsledků založených na detekci IgG, IgA a IgM protilátek.

Hladiny <i>Ch. pneumoniae</i> protilátek			Interpretace výsledků
IgM	IgG	IgA	
Negativní	Negativní	Negativní	Žádné náznaky infekce <i>Ch. pneumoniae</i>
Pozitivní	Negativní nebo Pozitivní	Negativní nebo Pozitivní	Indikuje současnou infekci
Negativní	Pozitivní	Negativní	Indikuje proběhlou nebo současnou infekci
Negativní	Pozitivní nebo Negativní	Pozitivní	Indikuje probíhající nebo chronickou infekci

Chování testu

Porovnání soupravy SeroCP™ IgG (RT) se soupravou SeroCP™ Quant IgG

Souprava SeroCP™ IgG (RT) byla hodnocena proti soupravě SeroCP™ Quant IgG (Savyon Diagnostics, Katalogové číslo A292-01).

Ve studii bylo použito 48 vzorků sér od symptomatických pacientů a 96 vzorků sér od zdravých dárců.

Byla vypočítána senzitivita a specifita:

Senzitivita: 40/44 = 91%

Specifita: 44/47 = 93,6%

Přesnost

Tabulka 3: Intra-assay (uvnitř běhu), níže je uvedena přesnost testu SeroCP™ RT – IgG:

Vzorek	Počet opakování	Střední hodnota	CV%
Pozitivní	12	1.143	3.74
Negativní	12	0.219	3.95

Tabulka 4: Inter-assay (mezi běhy), níže je uvedena přesnost testu SeroCP™ RT – IgG:

Vzorek	Počet opakování	Střední hodnota	CV%
Pozitivní	12	1.483	4.04
Negativní	12	0.260	8.39

Omezení testu

- Jednotlivé sérologické testy nemohou být používány jako jediné kritérium pro stanovení diagnózy. Musí se brát v úvahu všechny klinické a laboratorní výsledky.
- Vzorky, které byly odebrány příliš brzo během primární infekce nemusí obsahovat detekovatelné množství protilátek. Pokud je podezření na chlamydiovou infekci, měl by se během 2-4 týdnů odebrat další vzorek na analýzu. Ten by se měl testovat paralelně s prvním vzorkem.

- Interferující substance: Použití lipemických, zakalených či kontaminovaných vzorků sér není doporučeno. Drobné částice a sraženiny v séru mohou způsobovat chybné výsledky. Tyto vzorky by měly být před stanovením vyčeřeny centrifugací nebo filtrací.

Literatura

- Myhra, W., Mordhors, C.H., Wang, S.P., Grayston, J.T., (1990). Clinical features of *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR, infection in Denmark 1975-1987. In: Bowie WR, Caldwell HD, Jones RP, et al., eds. Chlamydial infections. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 422-425.
- Saikku, P., Leinonen, M., Tenkanen, L., Linnanmaki, E., Ekman, M.R., Manninen, V., Manttari, M., Frick, M.H. and Huttunen, J.K. (1992). Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki heart study. Ann. Intern. Med. 116: 273-278.
- Sarov, I., Kleinman, D., Cevenini, R., Hocberg, G., Potashnik, G., Sarov, B. and Insler, V. (1986). Specific IgG and IgA antibodies to *Chlamydia trachomatis* in infertile women. In. J. Fertil. 31 (3): 193-197.
- Campbell, L.A. (1993). PCR detection of *Chlamydia pneumoniae* In Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications (Persing, D.H., Smith, T.F., Tenover, F.C. and White, T.J., Eds). ASM Press. pp. 247-252
- Henry-Suchet, J., Askienazy-Elbhar, M., Thibon, M., Revol, C. and Akue, B.A. (1994). Post-therapeutic evolution of serum *chlamydia* antibody titers in women with acute salpingitis and tubal infertility. Fertility and Sterility. 62: No. 3.
- Saikku, P., Matila, K., Nieminen, M.S., Huttunen, J.K., Leinonen, M., Eckman, M.R., Makela, P.H. and Valtonen, V. (1988). Serological Evidence of an Association of a Novel *Chlamydia* TWAR with Chronic Coronary Heart Disease and Acute Myocardial Infarction. Lancet. 2: 983-986.
- Grayston, J.T., Campbell, L.A., Mordhorst, C.H., Saikku, P., Thom, D. and Wang, S.P. (1989). A New Respiratory Pathogen: *Chlamydia pneumoniae* Strain TWAR. J. Inf. Dis. 161: 618-625.
- Saikku, P., Leinonen, M., Tenkanen, L., Linnanmaki, E., Ekman, M.R., Mannin, V., Manttari, M., Frick, M.H. and Huttunen, J.K. (1992). Chronic *Chlamydia pneumoniae* Infections as a Risk Factor for Coronary Heart Disease in the Helsinki Heart Study. Ann. of Int. Med. 116: 273-278.



European Authorized Representative: Obelis s.a.
 Boulevard Général Wahis 53, B-1030 Brussels
 Tel: +32.2.732.59.54 Fax: +32.2.732.60.03
 E-mail: mail@obelis.net Mobile: +32.475.45.46.60