



SeroFIA™ *C. psittaci*

Ensaio de Imunofluorescência para a detecção de anticorpos IgG, IgA e IgM específicos para *C. psittaci* em soro humano

Manual de Instruções

Kit para 105 determinações
Refª 570-01P

Para uso em Diagnóstico In Vitro.
Apenas para uso profissional
Armazenar a 2-8°C. **Não congelar.**



Savyon® Diagnostics Ltd.

3 Habosem St. Ashdod 77610
ISRAEL

Tel.: +972.8.8562920

Fax: +972.8.8523176

E-mail: support@savyondiagnosics.com.

Utilização

SeroFIA™ *C. psittaci* é um ensaio de imunofluorescência semi-quantitativo para a determinação diferencial de anticorpos IgG, IgA e IgM específicos para *C. psittaci* numa amostra de soro humano única.

Para uso em Diagnóstico In Vitro .

Introdução

A Chlamydia, uma bactéria Gram-negativa altamente especializada, é composta por quatro espécies: *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* (TWAR), *C. psittaci* e *C. pecorum*.

A *C. trachomatis* inclui 15 serotipos que partilham epitopos imunogénicos em vários graus. A *C. trachomatis* é a principal doença sexualmente transmissível e está associada com a uretrite não gonorreica (NGU) e epididimite nos homens, cervicite, uretrite e doença inflamatória pélvica nas mulheres, síndrome de Reiter em indivíduos com haplotipo HLA-B27 e conjuntivite néonatal e pneumonia no recém-nascidos(2-6).

A *C. pneumoniae* é um importante patógeno respiratório no Homem e causa até 10% dos casos de pneumonia adquirida pela comunidade. Tem sido associada com doenças respiratórias agudas, pneumonia, asma, bronquite, faringite, síndrome respiratório agudo da anemia das células falciformes, doenças coronárias e síndrome de Guillain-Barre (7-9).

A *C. psittaci* infecta uma vasta gama de espécies, desde moluscos, aves e mamíferos e também causa pneumonia grave.

Os testes serológicos são usados por rotina no diagnóstico das infecções por Chlamydia. Servem como métodos não invasivos na identificação de infecções clamidiais distais e crónicas (10, 11), nas quais os métodos de detecção directos são raramente eficazes. Além disso, a presença de certos tipos de anticorpos também pode indicar o estado da doença.

A infecção clamidial primária é caracterizada por uma resposta predominantemente IgM nos espaço de 2 a 4 semanas e uma resposta IgG e IgA tardia no espaço de 6 a 8 semanas. Após uma infecção aguda por *C. pneumoniae* os anticorpos IgM geralmente desaparecem em 2 a 6 meses (12), os títulos de anticorpos IgG aumentam e geralmente diminuem lentamente; enquanto que os anticorpos IgA tendem a desaparecer rapidamente (13).

As reinfecções clamidiais são caracterizadas pela ausência de resposta IgM e respostas IgG e IgA imediatas (9). Os anticorpos IgA demonstraram ser um marcador imunológico de confiança para infecções primárias, crónicas e recorrentes. Em geral, estes anticorpos descem rapidamente a níveis base após o tratamento e erradicação da infecção clamidial (1-6, 10, 11).

A persistência de títulos de anticorpos IgA elevados é geralmente considerada como um sinal de infecção crónica (13). Num estudo efectuado em indivíduos de certa idade com infecções respiratórias estimou-se que um quinto dos casos de *C. pneumoniae* não seria detectado sem a determinação de anticorpos IgA (14). Os anticorpos IgG persistem por longos períodos e diminuem muito lentamente. Assim, a presença de anticorpos IgG é basicamente indicativa de uma infecção clamidial numa altura indeterminada. Contudo, um aumento de quatro vezes dos anticorpos IgG ou níveis elevados de anticorpos IgG podem indicar uma infecção crónica ou sistémica em curso.

O teste SeroFIA™ *C. psittaci* é um ensaio micro-IF baseado nos princípios da MIF. O SeroFIA™ *C. psittaci* utiliza como antígeno corpos elementares purificados de *C. psittaci* (SZ-1).

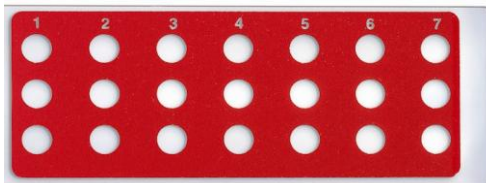
Princípio do teste

- Corpos elementares purificados (Ebs) de *C. psittaci* (C.ps) são fixados nos poços das lâminas SeroFIA™, cada um em sua fila da lâmina.
- As amostras diluídas são incubadas 30 minutos a 37°C com os respectivos antígenos.
- Os componentes séricos não ligados são eliminados por lavagem.
- Adiciona-se um conjugado anti IgG, IgM ou IgA humana marcado com Fluoresceína e incuba 30 minutos a 37°C.
- O conjugado não ligado é eliminado por lavagem.
- As lâminas são secas e adicionam-se 3 gotas de Meio de Montagem Fluído.
- As lâminas são examinadas num microscópio de fluorescência. As reacções positivas aparecem com uma fluorescência verde-maçã dos Ebs contra um fundo escuro.
- A determinação qualitativa consegue-se com uma única diluição do soro. Os resultados semi-quantitativos resultam de titulações seriadas.

Conteúdo do Kit

- Lâminas (3x7 poços/unidade):** Lâminas revestidas com antígenos *C. psittaci*. Cada lâmina está embalada numa saqueta de alumínio com um pacote de gel de sílica

5 unidades



- Tampão de Lavagem Concentrado (x20):** Tampão PBS-Tween, (pH 7.4-7.6) que contém NaCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄ e Tween 20.
1 frasco, 100ml
- Diluyente de Soro:** Tampão PBS. Contém gelatina, albumina bovina sérica, MgCl₂ e <0.1% azida sódica.
1 frasco, 80ml
- Controlo Negativo:** Soro humano negativo para anticorpos IgG, IgA e IgM para *C. pneumoniae*, *C. trachomatis*, *C. psittaci*. Contém <0.1% azida sódica. Pronto a usar.
1 frasco, 0.5 ml
- Controlo Positivo IgG:** Soro humano positivo para anticorpos IgG para *C. psittaci*. Contém <0.1% azida sódica. Pronto a usar.
1 frasco, 0.2ml
- Controlo Positivo IgA:** Soro humano positivo para anticorpos IgA para *C. psittaci*. Contém <0.1% azida sódica. Pronto a usar.
1 frasco, 0.2ml
- Controlo Positivo IgM:** Soro humano positivo para anticorpos IgM para *C. psittaci*. Contém <0.1% azida sódica. Pronto a usar.
1 frasco, 0.2ml
- IgG Conjugado-FITC:** Anti-IgG humana de Coelho conjugada a Fluoresceína (específica da cadeia γ). Pronto a usar.
1 frasco, 3.3ml
- IgA Conjugado-FITC:** Anti-IgA humana de Coelho conjugada a Fluoresceína (específica da cadeia α). Pronto a usar.
1 frasco, 3.3ml
- IgM Conjugado-FITC:** Anti-IgM humana de Coelho conjugada a Fluoresceína (específica da cadeia μ). Pronto a usar.
1 frasco, 3.3ml
- Reagente de Inativação IgG:** Anti-IgG humana com <0.1% azida sódica. (Só para IgM)
1 frasco, 4ml
- Meio de Montagem:** Contém <0.1% azida sódica.
1 frasco conta-gotas, 1.5ml
- Lamelas:** 1 unidade
- Manual de Instruções:** 1

Material Necessário mas Não Fornecido

- Placas de microtitulação limpas ou tubos para a diluição do soro dos doentes
- Centrífuga
- Micropipetas ajustáveis (5-50, 50-200, 200-1000 microlitros) e pontas descartáveis.

- Balão volumétrico (1 litro).
- Vortex.
- Banho a 37°C com tampa ou câmara húmida colocada numa incubadora a 37°C.
- Tabuleiro de plástico para a incubação das lâminas.
- Água destilada ou Bi-desionizada para a diluição do Tampão de Lavagem Concentrado.
- Esguichos de plástico.
- Suporte de lâminas e de coloração.
- Cronómetro.
- Microscópio de fluorescência com filtros adequados a leituras de fluorescência FITC e com magnitudes de 400x e 1000x.

Avisos e Precauções

Para uso em Diagnóstico *In Vitro*.

- Este kit contém soros humanos que foram testados e considerados negativos por técnicas aprovadas pela FDA, CE para antígeno HBV e para anticorpos HCV e VIH 1 e 2. Dado que nenhum método pode oferecer completa segurança que os produtos derivados de sangue humano não transmitem infecção, todos os componentes de sangue humano fornecidos neste kit têm de ser manuseados como soro ou sangue potencialmente infecciosos de acordo com as recomendações publicadas no manual CDC/NIH "Biosafety in Micro Biological and Biomedical Laboratories" 1988.
- O material antigénico clamidial que reveste as lâminas foi inativado e não contém organismos vivos detectáveis. Contudo, como nenhum método pode assegurar completamente que os produtos derivados de organismos patológicos não transmitem infecção, as lâminas devem ser manuseadas como qualquer material potencialmente infeccioso, de forma idêntica ou similar às recomendações publicadas no manual CDC/NIH, "Biosafety in Micro - biological and Biomedical Laboratories" 1988.
- A azida sódica pode formar azidas de chumbo ou cobre explosivas nas canalizações dos laboratórios. Para evitar a acumulação destes componentes, passar fluxos abundantes de água após a eliminação de soluções contendo azida
- Não pipetar com a boca.
- Evitar o contacto da pele com qualquer dos reagentes do kit.
- Utilizar luvas descartáveis ao manusear os soros e efectuar o teste. Lavar cuidadosamente as mãos após retirar as luvas.
- Qualquer equipamento, líquido ou outras substâncias que entrem em contacto directo com soro humano devem ser consideradas potencialmente contaminadas. Deverão ser esterilizadas ou inactivadas após utilização e antes de serem limpas. A inactivação pode ser conseguida em autoclave a 121°C durante, pelo menos, uma hora, ou fazendo um tratamento com uma solução de hipoclorito de sódio (lixívia) a 5% de concentração final, durante pelo menos, 30 minutos.
- O Conjugado-FITC contém Evans Blue que é carcinogénico. Evitar o contacto com a pele e olhos.
- O Meio de Montagem contém componentes corrosivos. Evitar o contacto com a pele e não inalar. Em caso de contacto com a pele e olhos lavar imediatamente com água abundante.

Armazenamento e Validade dos Reagentes

Todos os materiais fornecidos devem ser armazenados a 2-8°C. Se mantidos a 2-8°C os reagentes são estáveis até à data de validade indicada na embalagem. Não utilizar os componentes para além das datas de validade. A exposição dos componentes do kit à temperatura ambiente por poucas horas não causará danos aos reagentes.

Não expor os reagentes a luz forte. Não congelar os reagentes.

Colheita e Preparação das Amostras

Colheita do Soro

Preparar o soro a partir de amostras colhidas assepticamente por técnicas padrão (standard). Não deve ser usado soro inactivado pelo calor. Não é recomendada a utilização de soro lipémico, turvo ou contaminado. Soros com partículas e precipitados podem conduzir a falsos resultados. Tais amostras devem ser limpas por centrifugação ou filtração antes de serem testadas.

Armazenamento

As amostras devem ser armazenadas a 2-8°C e testadas em 7 dias (recomenda-se a adição de azida sódica 0.1%). Se se prever um período de armazenamento maior, aliquotar e armazenar as amostras a menos de -20°C. Evitar ciclos de congelamento-descongelamento

Validação do teste

Para que o teste seja válido devem ser reunidos os seguintes critérios. Caso isso não aconteça o teste deve ser considerado inválido e deve ser repetido.

1. O **Controlo Positivo** apresenta uma fluorescência verde-maçã moderada a intensa das partículas Eb da *Chlamydia psittaci*.
2. O **Controlo Negativo** apresenta reactividade negligenciável com *Chlamydia psittaci*.

Interpretação e Significado dos Resultados

Recomenda-se fazer primeiro a leitura dos poços controlo para assegurar a correcta interpretação dos resultados do teste. Ler a fluorescência das amostras clínicas e classificar da seguinte forma:

- | | |
|---|---|
| + | Moderada a intensa, distinta ou difusa, fluorescência verde-maçã dos corpos elementares |
| ± | Fluorescência definida mas esbatida dos corpos elementares. Deve ser considerada como o título final do soro.
O título final de um soro é definido como a última diluição que ainda apresenta marcação visível. A diluição seguinte apresentar-se-á como um soro negativo. |
| - | Fluorescência de fundo fraca ou ausente sem morfologia clara de <i>Chlamydia</i> . |

Procedimento para IgG

Preparação da Amostra

Para o despiste inicial (screening) diluir o soro 1:64 em Diluente de Soro, adicionando 10µl de soro a 630µl de Diluente de Soro. Para determinar os títulos finais fazer diluições seriadas a começar de 1:64.

Nota:

Para cada ensaio recomenda-se testar um poço com Controlo Negativo e um poço com Controlo Positivo IgG.

Controlo positivo pode ser utilizado como controlo end point da reacção, quando diluído de 1:64.

1. Colocar todos os componentes e amostras clínicas a serem testados à temperatura ambiente.
2. Diluir o Tampão de Lavagem Concentrado 1:20 adicionando 50ml de Tampão de Lavagem Concentrado a 950ml de água destilada ou Bi-desionizada. O tampão diluído pode ser armazenado a 2-8°C até 2 semanas.
3. Pipetar 10µl de controlos e soros diluídos nos poços apropriados.
4. Incubar as lâminas em câmara húmida a 37°C durante 30 minutos.
5. Remover as lâminas da câmara húmida e enxaguar cuidadosamente cada lâmina com um esguicho de Tampão de Lavagem diluído. Lavar as lâminas num copo de coloração submergindo-as em Tampão de Lavagem diluído. Deixar durante 10 minutos. Mergulhar as lâminas lavadas em água Bi-destilada. Remover e secar ao ar.
6. Pipetar 10µl de Conjugado- FITC em cada poço.
7. Incubar a 37°C, durante 30 minutos.
8. Repetir o enxaguamento e lavagem das lâminas como no passo 5.
9. Colocar 3 gotas de Meio de Montagem no centro de cada lâmina. Cobrir com a lamela fornecida. Remover as bolhas de ar pressionando suavemente a lamela.
10. Ler os resultados num microscópio de fluorescência a uma magnitude de 400x ou 1000x. Para obter melhores resultados, ler as lâminas no mesmo dia em que o ensaio é efectuado. Se tal não for possível, as lâminas podem ser armazenadas no escuro a 2-8°C até 3 dias.

Aspecto da Fluorescência no título 1:64	Interpretação
+	Presença de anticorpos IgG específicos para <i>C.psittaci</i>. É necessário o título final para determinar se é uma infecção corrente, recente ou passada ¹ .
±	Indicação de possível exposição a <i>C.psittaci</i>. É requerida uma segunda amostra para teste após 2-4 semanas ² .
-	Negativo. Níveis de anticorpos IgG para <i>C.psittaci</i> não detectáveis.

1. Títulos $\geq 1:64$ mostram evidência de Infecção corrente ou recente a *C.psittaci*.

2. Quando se testar uma segunda amostra, devem ser testadas em simultâneo a primeira e a segunda amostras. Se um resultado indeterminado é novamente obtido a amostra deve ser considerada negativa.

Nota: Em casos raros pode-se observar uma marcação clara e densa de partículas muito pequenas (menores que os EBs) no antigénio. Esta marcação pode representar reactividades devidas ao LPS. Devem ser feitos testes para anticorpos IgA e IgM ou testar uma segunda amostra de soro colhida 2-3 semanas depois. Se os IgM e IgA forem negativos e os resultados IgG se repetirem, a amostra deve ser considerada negativa.

Procedimento para IgA

Preparação da Amostra

Para o despiste inicial (screening) diluir o soro 1:32 em Diluente de Soro, adicionando 10 μ l de soro a 310 μ l de Diluente de Soro. Para determinar os títulos finais fazer diluições seriadas a começar de 1:32.

Nota:

Para cada ensaio recomenda-se testar um poço com Controlo Negativo e um poço com Controlo Positivo IgA.

Controlo positivo pode ser utilizado como controlo end point da reacção, quando diluído de 1:128.

- Colocar todos os componentes e amostras clínicas a serem testados à temperatura ambiente.
- Diluir o Tampão de Lavagem Concentrado 1:20 adicionando 50ml de Tampão de Lavagem Concentrado a 950ml de água destilada ou Bi-desionizada. O tampão diluído pode ser armazenado a 2-8°C até 2 semanas.
- Pipetar 10 μ l de controlos e soros diluídos nos poços apropriados.
- Incubar as lâminas em câmara húmida a 37°C durante 30 minutos.

- Remover as lâminas da câmara húmida e enxaguar cuidadosamente cada lâmina com um esguicho de Tampão de Lavagem diluído. Lavar as lâminas num copo de coloração submergindo-as em Tampão de Lavagem diluído. Deixar durante 10 minutos. Mergulhar as lâminas lavadas em água Bi-destilada. Remover e secar ao ar.
- Pipetar 10 μ l de Conjugado- FITC em cada poço.
- Incubar a 37°C durante 30 minutos.
- Repetir o enxaguamento e lavagem das lâminas como no passo 5.
- Colocar 3 gotas de Meio de Montagem no centro de cada lâmina. Cobrir com a lamela fornecida. Remover as bolhas de ar pressionando suavemente a lamela.
- Ler os resultados num microscópio de fluorescência a uma magnitude de 400x ou 1000x. Para obter melhores resultados, ler as lâminas no mesmo dia em que o ensaio é efectuado. Se tal não for possível, as lâminas podem ser armazenadas no escuro a 2-8°C até 3 dias.

Aspecto da Fluorescência no título 1:32	Interpretação
+	Presença de anticorpos IgA específicos para <i>C.psittaci</i>. Um título $\geq 1:32$ é considerado como possível evidência de infecção.
±	Indicação de possível exposição a <i>C.psittaci</i>. É requerida uma segunda amostra para teste após 2-4 semanas ¹ .
-	Negativo. Níveis de anticorpos IgA para <i>C.psittaci</i> não detectáveis.

- Quando se testar uma segunda amostra, devem ser testadas em simultâneo a primeira e a segunda amostras. Pacientes com infecção corrente a *C.psittaci* mostram um aumento de anticorpos. Se um resultado indeterminado é novamente obtido a amostra deve ser considerada negativa.

Nota: Em casos raros pode-se observar uma marcação clara e densa de partículas muito pequenas (menores que os EBs) no antigénio. Esta marcação pode representar reactividades devidas ao LPS. Devem ser feitos testes para anticorpos IgG e IgM ou testar uma segunda amostra de soro colhida 2-3 semanas depois. Se os IgM e IgG forem negativos e os resultados IgA se repetirem, a amostra deve ser considerada negativa.

Procedimento para IgM

Preparação da Amostra

- Adicionar 5 μ l de cada amostra a 45 μ l de Reagente de Inactivação IgG. Vortex suavemente.
- A cada um dos 50 μ l de soro tratados adicionar 50 μ l de Diluente de Soro. A diluição final obtida neste passo é 1:20.

Para determinar os títulos finais fazer diluições seriadas a começar de 1:20.

Nota:

Para cada ensaio recomenda-se testar um poço com Controlo Negativo e um poço com Controlo Positivo IgM.

Controlo positivo pode ser utilizado como controlo end point da reacção, quando diluído de 1:64.

1. Colocar todos os componentes e amostras clínicas a serem testados à temperatura ambiente.
2. Diluir o Tampão de Lavagem Concentrado 1:20 adicionando 50ml de Tampão de Lavagem Concentrado a 950ml de água destilada ou Bi-desionizada. O tampão diluído pode ser armazenado a 2-8°C até 2 semanas.
3. Pipetar 10µl de controlos e soros diluídos nos poços apropriados.
4. Incubar as lâminas em câmara húmida a 37°C durante 90 minutos.
5. Remover as lâminas da câmara húmida e enxaguar cuidadosamente cada lâmina com um esguicho de Tampão de Lavagem diluído. Lavar as lâminas num copo de coloração submergindo-as em Tampão de Lavagem diluído. Deixar durante 10 minutos. Mergulhar as lâminas lavadas em água Bi-destilada. Remover e secar ao ar.
6. Pipetar 10µl de Conjugado- FITC em cada poço.
7. Incubar a 37°C durante 30 minutos.
8. Repetir o enxaguamento e lavagem das lâminas como no passo 5.
9. Colocar 3 gotas de Meio de Montagem no centro de cada lâmina. Cobrir com a lamela fornecida. Remover as bolhas de ar pressionando suavemente a lamela.
10. Ler os resultados num microscópio de fluorescência a uma magnitude de 400x ou 1000x. Para obter melhores resultados, ler as lâminas no mesmo dia em que o ensaio é efectuado. Se tal não for possível, as lâminas podem ser armazenadas no escuro a 2-8°C até 3 dias.

Aspecto da Fluorescência no título 1:20	Interpretação
+	Presença de anticorpos IgM específicos para <i>C.psittaci</i>. Um título $\geq 1:20$ é considerado como possível evidência de infecção.
±	Indicação de possível exposição a <i>C.psittaci</i>. É requerida uma segunda amostra para teste após 2-4 semanas ¹ .
-	Negativo. Níveis de anticorpos M para <i>C.psittaci</i> não detectáveis.

1. Quando se testar uma segunda amostra (colhida 2-4 semanas depois), devem ser testadas em simultâneo a primeira e a segunda amostras. Se um resultado indeterminado é obtido novamente a amostra deve ser considerada negativa.

Significado dos Títulos de IgM Finais

Se forem necessários resultados semi-quantitativos devem ser efectuadas titulações para determinar o título final.

Para obter um perfil de anticorpos mais abrangente, IgM IgG e IgA devem ser também testados

Interpretação de resultados baseada nas combinações de anticorpos IgG, IgA e IgM.

Níveis de anticorpos <i>C.psittaci</i>			Interpretação dos Resultados
IgM	IgG	IgA	
Negativo	Negativo	Negativo	Nenhuma indicação de infecção por <i>C.psittaci</i> .
Positivo	Negativo ou Positivo	Negativo ou Positivo	Indicação de infecção corrente.
Negativo	Positivo	Negativo	Indicação de infecção passada ou corrente.
Negativo	Positivo ou Negativo	Positivo	Indicação de infecção corrente ou crónica.

Limitações do Teste

1. Para o diagnóstico final não deve ser usado um teste serológico único. Devem-se ter em conta todos os dados clínicos e laboratoriais.
2. As amostras obtidas muito cedo durante a infecção primária podem não conter anticorpos detectáveis. Se se suspeitar de infecção por Chlamydia deve-se obter uma segunda amostra 2-3 semanas mais tarde e ser testada em paralelo com a amostra inicial.
3. A reactividade do soro com múltiplas espécies de Chlamydia pode-se dever à exposição a mais do que uma espécie de Chlamydia ou a anticorpos com reactividade cruzada.
4. A determinação da intensidade de fluorescência geral e títulos finais pode ser afectada pelas condições do microscópio, fontes e tipos de luz.

Características de Desempenho

Estudo efectuado num centro médico independente com doentes com suspeita de infecção *C. psittaci*.

Resultados *C. psittaci* obtidos pelo SeroFIA™ IgG vs. MIF de referência

	MIF	Positivo	Negativo	Total
SeroFIA™				
Positivo		18	1	19
Negativo		2	10	12
Total		20	11	31

Sensibilidade: $18/20 \times 100 = 90\%$
 Especificidade: $10/11 \times 100 = 91\%$
 Concordância: $28/31 \times 100 = 90\%$

Resultados *C. psittaci* obtidos pelo SeroFIA™ IgA vs. MIF de referência

SeroFIA™ \ MIF	Positivo	Negativo	Total
Positivo	1	4	5
Negativo	1	24	25
Total	2	28	30

Especificidade: $24/38 \times 100 = 88\%$

Concordância: $25/30 \times 100 = 83\%$

Nota: Não se pode determinar a sensibilidade devido ao baixo número de amostras positivas.

Resultados *C. psittaci* obtidos pelo SeroFIA™ IgM vs. MIF de referência

SeroFIA™ \ MIF	Positivo	Negativo	Total
Positivo	3	2	5
Negativo	0	26	26
Total	3	28	31

Sensibilidade: $3/3 \times 100 = 100\%$

Especificidade: $26/28 \times 100 = 93\%$

Concordância: $29/31 \times 100 = 94\%$

Bibliografia

1. Piura, B., Sarov, I., Sarov, B., Kleinman, D., Chaim, W. and Insler, V. (1985) Serum IgG and IgA antibodies specific for *Chlamydia trachomatis* in salpingitis patients as determined by the immunoperoxidase assay. Eur. J. Epidemiol. 1: 110-116.
2. Tsunekawa, T. and Kumamoto, Y. (1989) A study of IgA and IgG titers of *C.trachomatis* in serum and prostatic secretion in chronic prostatitis. J.J.A. Inf. Dis. 63(2): 130-137.
3. Kaneti, J. et al (1988) IgG and IgA antibodies specific for *Chlamydia trachomatis* in acute epididymitis. Europ. Urol. 14: 323-327.
4. Kletter, Y., Caspi, D., Yarom, M., Sarov, B., Sarov I., and Tanay, A. (1988) Serum IgA and IgG Antibodies Specific to *Chlamydia* in Patients with Reiter's Syndrome (RS) In: Proceedings of The European Society for *Chlamydia* Research, Societa Editrice Esculapio, Bologna, p.170.
5. Stutman, H.R., Rettig, P.J. and Reyes, S. (1984) *Chlamydia trachomatis* as a cause of Pneumonitis and pleural effusion. J. Pediat. 104: 588-591.
6. Paran, H., Heimer, D. and Sarov, I. (1986) Serological, clinical and radiological findings in adults with bronchopulmonary infections caused by *Chlamydia trachomatis*. Isr. J.Med. Sci. 22: 823-827.
7. Grayston J. T., Campbell, L.A., Kuo, C.C., Mordhorst, C.H., Saikku, P., Thom, D.H. and Wang, S.P. (1990). A new respiratory tract pathogen. *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. J. Infect. Dis. 161:618-625.
8. Hahn D. L., Dodge, R. W. and Golubjatnikow, R. (1991). Association of *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR) infection with wheezing, asthmatic bronchitis, and adult-onset asthma. JAMA 266: 225-230
9. Saikku P., Mattila, K., Nieminen, M.S., Huttunen, J.K., Leinonen, M., Ekman, 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 infection. Lancet II: 983-986.

10. Sarov, I., Kleinman, D., Cevenini, R., Holcberg, G., Potashnik, G., Sarov, B. and Insler, V. (1986) Specific IgG and IgA antibodies to *Chlamydia trachomatis* in infertile women. Int. J. Fertil. 31 (3): 193-197.
11. Puolakkainen, M., Saikku, P., Leinonen, M., Nurminen, M., Vaananen, P. and Makela, P.H. (1984) *Chlamydia pneumoniae* and its serodiagnosis in infants. J. Infect. Dis. 149: 598-604.
12. Grayston, J.T., L.A. Campbell, C.H. Mordhorst, P. Saikku, D. Thom and S.P. Wang. (1989) A New Respiratory Pathogen: *Chlamydia pneumoniae* Strain TWAR. J.Inf.Dis. 161: 618-25
13. Saikku, P.,M. Leinonen, L. Tenkanen, E. Linnanmaki, M-R Ekman, V. Manninen, M. Manttari, M.H. Frick, J.K. Huttunen. (1992) Chronic *Chlamydiae pneumoniae* Infection as a Risk Factor for Coronary Heart Disease in the Helsinki Heart Study. Ann. of Int. Med. 116: 273-278.
14. Leinonen, M., H. Sryjala, P. Kujala and P. Saikku. (1991). Serological diagnosis of *Chlamydiae pneumoniae*)Cpn(pneumoniae in adults. In: Abstracts of 31st ICAAC, Chicago, Illinois, Sept 29 - Oct 2, 1991. Washington, D.C. Aner. Soc. Microbiol, p.209.



European Authorized Representative: Obelis s.a.
Boulevard Général Wahis 53
1030 Brussels, BELGIUM
Tel: +(32) 2. 732.59.54
Fax: +(32) 2.732.60.03
E-Mail : mail@obelis.net