



Chlamydia IgG SeroFIA™

Immunfluoreszenz-Assay zum Nachweis von spezifischen IgG-Antikörpern gegen *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* und *C. psittaci* in humanem Serum

Bedienungsanleitung

Testkit für 3 X 105 Bestimmungen
Katalog-Nr. 511-01

Zur Verwendung für die In vitro-Diagnostik
Nur für Fachpersonal
Bei 2-8°C lagern. **Nicht einfrieren.**



Savyon® Diagnostics Ltd.

3 Habosem St. Ashdod 77610
ISRAEL

Tel.: +972.8.8562920

Fax: +972.8.8523176

E-Mail: support@savyondiagnosics.com

Verwendungszweck

Chlamydia IgG SeroFIA™ ist ein semiquantitatives enzymgebundenes Immunfluoreszenz-Assay zur differenziellen Bestimmung von speziesspezifischen IgG-Antikörpern gegen *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* und *C. psittaci* in humanem Serum.

Zur In vitro Diagnostik

Einführung

Chlamydia, ein hochspezialisiertes Gram-negatives Bakterium, umfasst vier Subspezies: *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* (TWAR), *C. psittaci* und *C. pecorum*.

C. trachomatis umfasst 15 Serotypen, die unterschiedlichste Immunogene enthalten. *C. trachomatis* ist eine verbreitete sexuell übertragbare Erkrankung und wird bei Männern nicht-gonokokkaler Urethritis (NGU) und Epididymitis, bei Frauen Zervizitis, Urethritis und entzündlichen Erkrankungen des Beckens, bei Patienten mit HLA-B27-Haplotyp dem Reiter'schen Syndrom und bei Neugeborenen neonataler Konjunktivitis und Pneumonie zugeordnet (2-6).

C. pneumoniae ist ein verbreitetes respiratorisches Humanpathogen und liegt bis zu 10 % der Fälle ambulant erworbener Pneumonie zugrunde. Der Erreger wurde akuten respiratorischen Erkrankungen, Pneumonie, Asthma, Bronchitis, Pharyngitis, dem akuten Brustsyndrom der Sichelzellerkrankung, koronaren Herzkrankheiten und dem Guillain-Barre-Syndrom zugeordnet (7-9).

C. psittaci infiziert von Mollusken über Vögel bis hin zu Säugetieren eine breite Anzahl von Wirtsspezies und verursacht ebenfalls schwere Pneumonie.

Serologische Tests werden routinemäßig zur Diagnose von Chlamydieninfektionen verwendet. Sie dienen als nicht-invasives Medium zur Erkennung sowohl von distalen als auch chronischen Chlamydieninfektionen (10, 11), bei denen direkte Nachweisverfahren häufig erfolglos bleiben. Zusätzlich lässt die Präsenz bestimmter Antikörpertypen mögliche Rückschlüsse auf das Stadium der Erkrankung zu.

Die primäre Chlamydieninfektion ist durch eine prädominante IgM-Reaktion innerhalb von zwei bis vier Wochen und eine verzögerte IgG- und IgA-Reaktion innerhalb von sechs bis acht Wochen charakterisiert. Nach akuter *C. pneumoniae*-Infektion sind IgM-Antikörper in der Regel nach 2 bis 6 Monaten nicht mehr nachweisbar (12). Die IgG-Antikörpertiter steigen an und nehmen üblicherweise langsam ab, während die IgA-Antikörpertiter meist rasch abfallen (13).

Reinfektionen mit Chlamydien sind durch ein Ausbleiben der IgM-Reaktion und prompte IgG- und IgA-Reaktionen charakterisiert (9). IgA-Antikörper haben sich als verlässlicher immunologischer Marker für primäre, chronische und rekursive Infektionen erwiesen. Die Anzahl dieser Antikörper fällt in der Regel nach der Behandlung und Ausräumung der Chlamydieninfektion rasch auf Basiswerte ab (1-6, 10, 11).

Persistierend höhere IgA-Antikörpertiter gelten allgemein als Anzeichen für eine chronische Infektion (13). In einer Studie an älteren Patienten mit respiratorischen Infekten wurde geschätzt, dass ein Fünftel der *C. pneumoniae*-Fälle ohne IgA-Bestimmung nicht erkannt worden wäre (14). IgG-Antikörper persistieren über längere Zeiträume und nehmen sehr langsam ab. Die Präsenz von IgG-Antikörpern weist daher auf eine zeitlich nicht spezifizierbare Chlamydieninfektion hin. Eine Vervielfachung des IgG-Werts oder hohe IgG-Antikörpertiter weisen auf eine mögliche andauernde chronische oder systemische Infektion hin.

Der Savyon Chlamydia SeroFIA™-Test ist ein Mikro-IF-Assay auf der Grundlage des Mikro-Immunfluoreszenz-Prinzips. SeroFIA™ verwendet als Antigen gereinigte Elementarkörperchen von *C. pneumoniae* (TW-183), *C. trachomatis* (L2) und *C. psittaci* (SZ-1). Die SeroFIA™-Objektträger umfassen jeweils 3 Reihen mit 7 Wells, die jeweils *C. pneumoniae*-, *C. trachomatis*- bzw. *C. psittaci*-Antigene enthalten. Die Trennung der verschiedenen Chlamydien-Antigene hilft mögliche Verwechslungen zwischen den verschiedenen Chlamydienarten zu vermeiden und vereinfacht so das Ablesen der Ergebnisse bei gleichzeitiger Verringerung des Fehlerpotenzials.

Testprinzip

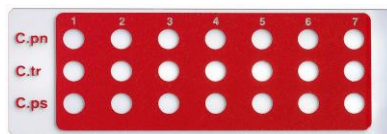
- Die Wells in den drei Reihen des SeroFIA™-Objektträgers sind jeweils mit bereinigten Elementarkörperchen (EBs) von *C. pneumoniae* (C. pn), *C. trachomatis* (C. tr) und *C. psittaci* (C. ps) beschichtet.
- Verdünnte Patientenserum werden für 30 Minuten bei 37°C mit den jeweiligen Antigenen in den einzelnen Reihen inkubiert.

- Ungebundene Serumkomponenten werden durch Auswaschen entfernt.
- Fluoreszeinkonjugiertes Anti-Human-IgG wird hinzugefügt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.
- Ungebundenes Konjugat wird durch Auswaschen entfernt.
- Die Objektträger werden luftgetrocknet und mit 3 Tropfen Mounting-Medium eingedeckt.
- Die Objektträger werden fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Positive Reaktionen erscheinen als hellgrün fluoreszierende Elementarkörperchen vor dunklem Hintergrund.
- Die qualitative Bestimmung erfolgt durch einfache Verdünnung der Seren. Die semiquantitativen Ergebnisse werden durch Endpunkttitration ermittelt.

Inhalts des Kits

- 1. Reaktions-Objektträger (3 x 7 Wells je Einheit):** Träger mit 3 Reihen, jeweils mit *C. pneumoniae*-, *C. trachomatis*- und *C. psittaci*-Antigenen beschichtet. Die Objektträger sind einzeln in Aluminiumhüllen mit Silikat-Gel verpackt.

15 Einheiten



- 2. Konzentrierter Waschpuffer (20-fach):** Ein PBS-Tween-Puffer (pH-Wert 7,4 bis 7,6), der NaCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄ und Tween 20 enthält.
1 Flasche, 100 ml
- 3. Serumverdünnung:** Ein PBS-Puffer. Enthält Gelatin, bovines Serumalbumin, MgCl₂ und <0,1% Natriumazid.
1 Flasche, 80 ml
- 4. Negativkontrolle:** Humanserum ohne IgG-, IgA- und IgM-Antikörper gegen *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* und *C. psittaci*. Enthält <0,1 % Natriumazid. Gebrauchsfertig.
1 Fläschchen, 0,5 ml
- 5. C. trachomatis-Positivkontrolle:** Humanserum mit IgG-Antikörpern gegen *C. trachomatis*. Enthält <0,1 % Natriumazid. Gebrauchsfertig.
1 Fläschchen, 0,2 ml
- 6. C. pneumoniae-Positivkontrolle:** Humanserum mit IgG-Antikörpern gegen *C. pneumoniae*. Enthält <0,1 % Natriumazid. Gebrauchsfertig.
1 Fläschchen, 0,2 ml
- 7. C. psittaci-Positivkontrolle:** Humanserum mit IgG-Antikörpern gegen *C. psittaci*. Enthält <0,1 % Natriumazid. Gebrauchsfertig.
1 Fläschchen, 0,2 ml
- 8. FITC-Konjugat:** Fluoreszein-markiertes Rabbit-Anti-Human-IgG (γChain-spezifisch).
Gebrauchsfertig.
1 Fläschchen, 3,3 ml
- 9. Mounting-Medium:** Enthält <0,1 % Natriumazid.
1 Tropfflasche, 1,5 ml
- 10. Deckgläser:** 1 x 15 Einheiten
- 11. Bedienungsanleitung:** 1

Zusätzlich benötigtes Material

1. Saubere Mikrotiterplatten oder Reagenzgläser zur Verdünnung der Patientenserum.
2. Laborzentrifuge.
3. Einstellbare Mikropipetten (5-50, 50-200 und 200 - 1000µl) und Einmalspitzen.
4. Volumetrischer Zylinder (1 Liter).
5. Vortexmischer.
6. Ein 37°C-Wasserbad mit Deckel oder eine Feuchtkammer in einem 37°C-Inkubator.
7. Kunststoffschiene zum Inkubieren des Objektträgers.
8. Destilliertes oder doppelt entionisiertes Wasser zur Verdünnung des konzentrierten Waschpuffers.
9. Kunststoff-Quetschflasche zum Auswaschen.
10. Trägerhalter und Färbekasten.
11. Zeitgeber.
12. Fluoreszenzmikroskop mit Filtern zum Ablesen der FITC-Fluoreszenz und 40facher sowie 100facher Vergrößerung.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Zur In vitro Diagnostik

1. Menschliche Seren, die in diesem Testkit enthalten sind wurden nach FDA, CE-genehmigten Methoden geprüft und als negativ für HBsAg-, HCV- und HIV- 1 & 2 Antikörper befunden. Dennoch ist bei Produkten menschlichen Ursprungs mit keinem der derzeit verfügbaren analytischen Verfahren mit letzter Sicherheit auszuschließen, dass diese Krankheiten übertragen können. Daher müssen alle in diesem Testkit enthaltenen Reagenzien menschlichen Ursprungs nach den Empfehlungen, veröffentlicht in der CDC/NIH Anleitung „Biosafety in Micro Biological and Biomedical Laboratories“ 1988, grundsätzlich als potenziell infektiöses Serum oder Blut angesehen und entsprechend behandelt werden.
2. Das Chlamydien-Antigen-Material zur Beschichtung der Objektträger wurde inaktiviert und enthält keine nachweisbaren lebenden Organismen. Es sind zurzeit jedoch keine Verfahren bekannt, mit denen sich Infektionen durch Derivate von pathologischen Organismen vollständig ausschließen lassen. Alle in diesem Kit enthaltenen Objektträger müssen daher als potenziell biogefährdende Materialien gemäß den bzw. im Sinne der Vorgaben im CDC/NIH-Handbuch „Biosafety in Micro Biological and Biomedical Laboratories, 1988“ gehandhabt und entsorgt werden.
3. Natriumazid kann in Laborleitungen explosives Blei- bzw. Kupferazid bilden. Um die Akkumulation derartiger Verbindungen zu vermeiden, den Abfluss und die Leitungen nach Entsorgung azidhaltiger Lösungen mit reichlich Wasser ausspülen.
4. Nicht mit dem Mund pipettieren.
5. Hautkontakt mit allen Reagenzien des Kits vermeiden.
6. Beim Umgang mit den Seren und der Ausführung des Tests stets Einmalhandschuhe tragen. Hände

nach dem Ausziehen der Handschuhe sorgfältig waschen.

7. Alle Materialien, Flüssigkeiten und sonstigen Substanzen, die in direktem Kontakt mit Humanserum geraten, sind als potenziell kontaminiert zu betrachten. Sie sind daher nach der Verwendung sowie vor der Entsorgung oder Reinigung zu sterilisieren und zu inaktivieren. Die Inaktivierung kann durch Autoklavieren bei 121°C für mindestens eine Stunde bzw. durch Behandlung mit einer Natriumhypochloritlösung mit 5-prozentiger Endkonzentration (Haushaltsbleiche) für mindestens 30 Minuten erfolgen.
8. Das FITC-Konjugat enthält Evans Blue, bei dem es sich um ein Karzinogen handelt. Haut- und Augenkontakt vermeiden.
9. Das Mounting-Medium enthält korrosive Bestandteile. Hautkontakt vermeiden und nicht einatmen. Bei Haut- oder Augenkontakt sofort mit viel Wasser ausspülen.

Lagerung und Stabilität der Reagenzien

Alle im Kit enthaltenen Materialien sind bei 2-8°C zu lagern. Bei 2 – 8 °C sind die Testreagenzien bis zum auf der Kit-Verpackung angegebenen Ablaufdatum stabil. Die Kit-Komponenten nach dem Ablaufdatum nicht mehr verwenden. Die Kit-Komponenten können für einige Stunden Raumtemperaturen ausgesetzt werden, ohne dass die Reagenzien verderben.

Die Reagenzien vor starker Lichteinstrahlung schützen. Die Reagenzien nicht einfrieren.

Probengewinnung und -Vorbereitung

Serumgewinnung

Seren unter Verwendung von Standardverfahren aus aseptisch gewonnenen Proben vorbereiten. Keine hitzeinaktivierten Seren verwenden. Von der Verwendung lipämischer, trüber und kontaminierter Seren wird abgeraten. Bestimmte Materialien und Präzipitate in den Seren können zu falschen Ergebnissen führen. Derartige Proben sind durch Zentrifugieren oder Filtrieren vor dem Test zu reinigen.

Lagerung

Die Proben sind bei 2 – 8°C zu lagern und innerhalb von 7 Tagen zu testen (das Hinzugeben von 0,1% Natriumazid wird dringend empfohlen). Zur längeren Aufbewahrung in Aliquots aufteilen und unter –20°C lagern. Die Proben möglichst nicht wiederholt auftauen und einfrieren.

Probenvorbereitung

Zur Grobanalyse Seren durch Hinzugeben von 10µl Serum zu 630µl Serumverdünner 1:64 verdünnen. Zur Bestimmung der Endpunkttiter Seren von 1:64 in Serumverdünner seriell verdünnen.

Testverfahren

Anmerkung:

*Es wird empfohlen, bei jedem Testdurchlauf jeweils einen Well mit Negativkontrolle sowie einen Well der Positivkontrolle für *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* und *C. psittaci* in der entsprechenden Reihe zu testen.*

Die Positivkontrolle kann bei einer 1:64-Verdünnung auch als Endpunkttiter-Kontrolle dienen.

1. Alle Komponenten und die zu testenden klinischen Proben auf Raumtemperatur bringen.
2. Durch Hinzugeben von 50ml konzentrierten Waschpuffer zu 950ml doppelt entionisierten oder destillierten Wasser den konzentrierten Waschpuffer auf 1:20 verdünnen. Der verdünnte Puffer kann bei 2-8°C bis zu zwei Wochen lang gelagert werden.
3. 10µl der Kontrollmedien und verdünnten Seren in die Wells in den jeweiligen Reihen pipettieren.
4. Objektträger für 30 Minuten bei 37°C in einer Feuchtkammer inkubieren.
5. Objektträger aus der Feuchtkammer entnehmen und einzeln mit einem Strahl verdünnten Waschpuffers aus einer Quetschflasche vorsichtig abspülen. Objektträger durch Eintauchen in einen Färbekasten mit Waschpuffer waschen. Objektträger 10 Minuten eingetaucht lassen. Anschließend die gewaschenen Objektträger in doppelt destilliertes Wasser tauchen. Entnehmen und an der Luft trocknen lassen.
6. 10µl FITC-Konjugat in jeden Well geben.
7. 30 Minuten bei 37°C inkubieren.
8. Objektträger erneut wie in Schritt 5 spülen und waschen.
9. 3 Tropfen Mounting-Medium mittig auf jeden Objektträger geben. Mit dem beiliegenden Deckglas abdecken. Luftblasen durch leichten Druck auf das Deckglas entfernen.
10. Ergebnisse auf einem Fluoreszenzmikroskop mit 400facher oder 1000facher Vergrößerung ablesen. Um beste Ergebnisse zu gewährleisten, die Objektträger am Tag des Tests auswerten. Falls dies nicht möglich ist, können montierte bei 2-8°C im Dunkeln bis zu drei Tage lang gelagert werden.

Validierung des Tests

Zur Validierung des Tests müssen die nachstehenden Kriterien erfüllt werden. Wenn die Kriterien nicht erfüllt werden, ist der Test als ungültig anzusehen und muss wiederholt werden.

1. Die Positivkontrollen zeigen eine moderate bis intensive hellgrün-fluoreszierende Färbung von Chlamydia-EB-Partikeln der entsprechenden Chlamydienspezies.
2. Die Negativkontrollen zeigen eine vernachlässigbare Reaktivität (Färbung) der einzelnen Chlamydienspezies.

Interpretation und Bedeutung der Ergebnisse:

Um die korrekte Interpretation der Ergebnisse zu gewährleisten, sollten zuvor Kontrollwells ausgewertet werden.

Die Fluoreszenz der klinischen Proben untersuchen und wie folgt klassifizieren:

- + Moderate bis intensive, scharfe oder diffuse hellgrüne Fluoreszenz der Elementarkörperchen.
- ± Deutliche, jedoch schwache Fluoreszenz der Elementarkörperchen. Als Endpunkttiter des Serums zu betrachten.
Der Endpunkttiter eines Serums ist definiert als die höchstmögliche Verdünnung, bei der sich eine sichtbare Färbung ergibt. Bei der nächsthöheren Verdünnung zeigt sich ein negatives Serumbild.
- Keine Fluoreszenz oder matte Hintergrundfluoreszenz ohne deutliche Chlamydienmorphologie

Fluoreszenz bei Titer 1:64			Interpretation
C. pn	C. tr	C. pn	

+	-	-	Präsenz spezifischer IgG-Antikörper gegen C. pn, C. tr bzw. C. ps. Die Endpunkttitration dient der Bestimmung von akuten, kürzlichen oder abgelaufenen Infektionen.
-	+	-	
-	-	+	

+	+	-	Präsenz spezifischer IgG-Antikörper gegen Chlamydien. Weist auf multiple Infektionen bzw. speziesübergreifende Kreuzreaktionen hin. Zur Bestimmung der prädominanten Chlamydienspezies ist eine Endpunkttitration vorzunehmen.
-	+	+	
+	-	+	
+	+	+	

-	-	-	Negativ. Keine nachweisbaren IgG-Antikörper gegen C. pn, C. tr bzw. C. ps.
---	---	---	--

Anmerkung: In seltenen Fällen zeigt sich bei einem oder mehreren der Antigene eine deutliche und intensive Färbung von sehr kleinen Partikeln (kleiner als die Elementarteilchen). Dies weist auf mögliche LPS-bedingte Reaktionen hin. In diesem Fall ist ein Test auf IgA- und IgM-Antikörper durchzuführen bzw. eine nach zwei bis drei Wochen entnommene zweite Serumprobe zu testen. Wenn sich bei negativen IgM- und IgA-Ergebnissen dieselben IgG-Ergebnisse zeigen, ist die Probe als negativ anzusehen.

Bedeutung der Endpunkttiter

Die Endpunkttitration dient der Bestimmung von akuten, kürzlichen oder abgelaufenen Infektionen, insbesondere in Fällen von *C. pneumoniae*-Infektionen. Wenn sich Reaktionen mit (fluoreszierende Färbung) mit mehr als einer Chlamydienspezies zeigen, gibt das Antigen mit dem höchsten Endpunkttiter (mindestens vierfach höher) an, welche Chlamydienspezies der Infektion vermutlich zugrunde liegt. Es wird empfohlen, die Patientenergebnisse wie folgt zu interpretieren:

Chlamydia trachomatis und Chlamydia psittaci	
> 1:64	Nachweis einer akuten oder kürzlichen Infektion.

Chlamydia pneumoniae	
≥1:64 und ≤1:512	Nachweis einer zeitlich nicht spezifizierten Infektion. Nach zwei bis drei Wochen entnommene zweite Probe testen. Wenn die zweite Probe einen Titer von >1:512 oder eine vierfache Zunahme gegenüber der ersten Probe zeigt, ist eine akute Infektion indiziert. Unveränderte Titer weisen auf eine abgelaufene Infektion hin.
>1:512	Hinweis auf akute Infektion.

Grenzen des Tests

1. Zur finalen Diagnose sind stets mehrere serologische Tests zu verwenden. Dabei sind alle klinischen Daten und Laborwerte zu berücksichtigen.
2. In Proben, die zu einem frühen Zeitpunkt der Primärinfektion entnommen wurden, sind möglicherweise keine Antikörper nachweisbar. Bei Verdacht auf Chlamydieninfektion ist nach zwei bis drei Wochen eine weitere Probe zu entnehmen und parallel mit der ersten zu testen.
3. Mögliche Reaktionen des Serums mit mehreren Chlamydienspezies weisen auf die Präsenz mehrerer Chlamydienspezies oder kreuzreaktive Antikörper hin.
4. Die Mikroskoplinsen und die Lichtbedingungen können die Bestimmung der Gesamtfluoreszenzintensität und der Endpunkttiter beeinflussen.

Leistungsmerkmale

Die Studie erfolgte in einer unabhängigen medizinischen Einrichtung an Patienten mit Verdacht auf Infektion mit *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* oder *C. psittaci*.

Vergleich der Ergebnisse für *C. trachomatis* zwischen IgG SeroFIA™ und Referenz-MIF-Verfahren

MIF \ SeroFIA™	Positiv	Negativ	Gesamt
Positiv	47	2	49
Negativ	5	46	51
Gesamt	52	48	100

Empfindlichkeit: $47/52 \times 100 = 90,3 \%$

Spezifität: $46/48 \times 100 = 95,8 \%$

Gesamtübereinstimmung: $93/100 \times 100 = 93 \%$

Vergleich der Ergebnisse für *C. pneumoniae* zwischen IgG SeroFIA™ und Referenz-MIF-Verfahren

MIF \ SeroFIA™	Positiv	Negativ	Gesamt
Positiv	120	2	122
Negativ	0	60	60
Gesamt	120	62	182

Empfindlichkeit: $120/120 \times 100 = 100 \%$

Spezifität: $60/62 \times 100 = 96,7 \%$

Gesamtübereinstimmung: $180/182 \times 100 = 98,9 \%$

Vergleich der Ergebnisse für *C. psittaci* zwischen IgG SeroFIA™ und Referenz-MIF-Verfahren

MIF \ SeroFIA™	Positiv	Negativ	Gesamt
Positiv	18	1	19
Negativ	2	10	12
Gesamt	20	11	31

Empfindlichkeit: $18/20 \times 100 = 90 \%$

Spezifität: $10/11 \times 100 = 91 \%$

Gesamtübereinstimmung: $28/31 \times 100 = 90 \%$

Bibliographie:

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 epididymits. 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 broncho-pulmonary 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., Holberg, 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