Chlamydia pneumoniae-IgG-ELISA *plus* medac

Český

CE
0123

VÝROBCE

medac
Gesellschaft für klinische
Spezialpräparate mbH
Theaterstraße 6
D-22880 Wedel

www.medac-diagnostika.de
E-Mail: diagnostics@medac.de
Tel.: ++49/4103/8006-0
Fax: ++49/4103/8006-359

ADRESA PRO PŘÍJEM OBJEDNÁVEK

E-Mail: auftrag@medac.de
Tel.: ++49/4103/8006-111
Fax: ++49/4103/8006-113

Chlamydia pneumoniae–IgG–ELISA *plus* medac

Enzymoimunologický test na kvantitativní průkaz protilátek IgG proti ***Chlamydia pneumoniae*** v séru a v plazmě

Katalogové číslo: 430–PLUS

POUZE PRO DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ IN VITRO

ÚVOD

Chlamydie patří ke gramnegativním bakteriím. Žijí intracelulárně v epiteliích sliznic, v endoteliích, v buňkách hladkých svalů cév a podle novějších poznatků i v určitých strukturách tkání centrálního nervového systému. Chlamydie jsou závislé na fosfátech jejich hostitelských buněk, které jsou bohaté na energii. Nazývají se proto energetičtí parazité.

Rod Chlamydie se vyskytuje ve čtyřech druzích: ***C. trachomatis***, ***C. pneumoniae***, ***C. psittaci*** a ***C. pecorum***. ***C. trachomatis*** a ***C. pneumoniae*** jsou obligátní lidské patogeny. ***C. psittaci*** vyvoláva infekce u člověka a u mnohých zvířat. ***C. pecorum*** byla dosud prokázána pouze u zvířat.

C. pneumoniae je rozšířena po celém světě. K širokému spektru onemocnění patří atypická pneumonie, sinusitida, otitis media, faryngitida, bronchitida, chronická obstrukční onemocnění dýchacích cest, reaktivní artritida a infekty podobné chřipce. Příčinná účast ***Chlamydia pneumoniae*** na infekčně podmíněném astmatu, sarkoidóze, rakovině plic, arterioskleróze, akutním infarktu myokardu, mozkové příhodě, roztroušené skleróze a pozdních formách Alzheimera je předmětem diskusí.

Podle Graystona a Saikku (1989), kteří jako první opsáli tento druh chlamydií, prodělává skoro každý člověk ve svém životě několikrát infekci vyvolanou ***C. pneumoniae***. Převážně slabý a/nebo difuzně probíhající symptomatický chod tyto infekce ztěžuje její včasné odhalení, a proto může dojít ke chronickým průběhům onemocnění se závažnými následky.

Diagnostika infekcí vyvolaných ***C. pneumoniae*** se zakládá na izolaci agens v buňkových kulturách, na přímém průkazu antigénu a nukleové kyseliny a na serologii. Kultivace agens z materiálu stěrů, která probíhá v několika pasážích, je časově náročná, vhodná pouze pro

specializované laboratoře a jen zřídka uspěšná. Přímá imunofluorescence a testy ELISA na průkaz antigénu se používají vzhledem na jejich nízkou citlivost a specifitu jen ojedinelě. Kommerční, standardizované molekulárně biologické metody, ku příkladu PCR se ještě neprosadili.

Jelikož metody kultivace agens a průkazu antigenu u diagnostiky infekcí vyvolaných ***C. pneumoniae*** nejsou postačitelné, považuje se serologie za metodu volby.

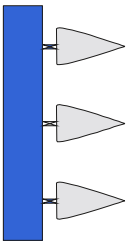
Za takzvaný „zlatý standard" u druhově specifické platí doposud mikroimmunfluorescence (MIF). U MIF se jedná o časově náročný subjektivně hodnocený test, který vyžaduje mnoho skušeností. Testy MIF nejsou standardizované. Různé preparace antigénů a různé kritériá u cut-off pro proběhlé, nedávno proběhlé a akutní infekce vedou k signifikatním diskrepancím ve výsledcích laboratoří.

V současné laboratorní rutinné práci dominují testy ELISA. Kvalita diagnostické výpovědě je závislá přitom od použitého antigénu jako i od způsobu vyhodnocení výsledků testu. Test **Chlamydia pneumoniae-IgG-ELISA *plus* medac** je založen na vysoce očištěném a specifickém antigénu, který je rovněž základem testu **Chlamydia pneumoniae-IgA-ELISA *plus* medac** a **Chlamydia pneumoniae-IgM-sELISA medac**.

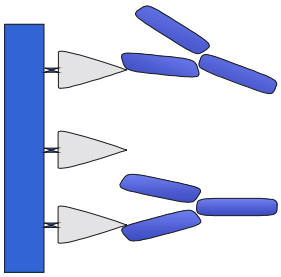
Na základě výsledků průkazu protilátek IgM-, IgA- und IgG proti ***C. pneumoniae*** v různých kombinacích lze usuzovat o průběhu infekce.

Kromě toho je kvantifikace z jednoho bodu (AU/ml) u testu firmy medac nejlepším předpokladem pro reprodukovatelné výsledky a tudíž pro měření průběhu tvorby protilátek.

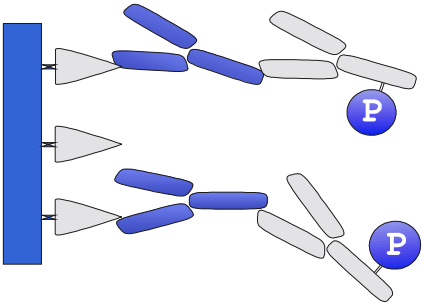
PRINZIP TESTU



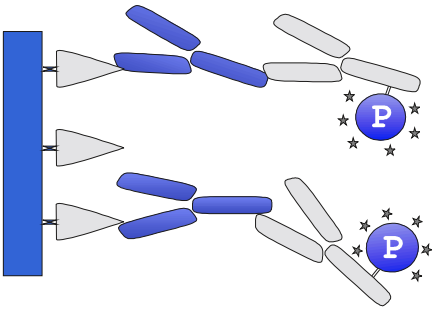
Mikrotitrační destička je pokryta specifickým antigenem ***C. pneumoniae.***



Specifické protilátky ***C. pneumoniae*** ze vzorku pacienta se vážou na antigén.



Na peroxidázu vázané proti-humánní protilátky IgG se vážou na protilátky IgG (P = peroxidáza).



Inkubace se substrátem TMB (*). Reakce se zastaví kyselinou sírovou. Vyhodnocení se provází fotometricky.

Výhody testu

- ☞ Vysoká citlivost a specifita.
- ☞ Kvantifikace z jednoho bodu, standardní křivka není nutná.
- ☞ Lámací mikrotitrační proužky umožňují optimální využití testu.

OBSAH SOUPRAVY
KATALOGOVÉ ČÍSLO: 430-PLUS

1. **MTP**
   Mikrotitrační destička: 12 testovacích proužků po 8 jamkách, (označená jako **QPG**, s držícím rámem a lepenkovým desikantem, v hliníkovém vakuovém balení), lámací, dno tvaru písmena U, pokryta specifickým antigenem ***C. pneumoniae*** a FKS, připravena k použití.

2. **CONTROL** | **-**
   Negativní kontrola: 1 lahvička s obsahem 1,5 ml, lidské sérum, připravena k použití, zbarvená modře, obsahuje NBCS, fenol, ProClin™ 300 a gentamycín sulfát.

3. **CONTROL** | **+**
   Pozitivní kontrola: 1 lahvička s obsahem 1,5 ml, lidské sérum, připravena k použití, zbarvená modře, obsahuje FCS, BSA, fenol, ProClin™ 300 a gentamycín sulfát.

4. **CAL**
   Kalibrátor: 1 lahvička s obsahem 1,5 ml, lidské sérum, připraven k použití, zbarvený modře, obsahuje FCS, BSA, fenol, ProClin™ 300 agentamycín sulfát.

5. **WB**
   Promývací roztok: 1 láhev s obsahem 100 ml, PBS/Tween (10x), pH 7,2 – 7,4, obsahuje ProClin™ 300.

6. **BAC-DIL**
   Roztok na ředění vzorků: 1 láhev s obsahem 110 ml, PBS/Tween/NBCS, pH 7,0 – 7,2, připraven k použití, zbarvený modře, obsahuje ProClin™ 300.

7. **CON**
   Konjugát: 3 lahvičky s obsahem každá po 4,5 ml, kozí protihumánní protilátky IgG, konjugované HRP, připraven k použití, zbarvený do zeleně, obsahuje BSA, fenol, ProClin™ 300 a gentamycín sulfát.

8. **TMB**
   Substrát TMB: 1 lahvička s obsahem 10 ml, připraven k použití.

9. **STOP**
   Roztok na zastavení reakce: 2 lahvičky každá s obsahem po 11 ml, 0,5 M kyselina sírová H_2SO_4, připraven k použití.
   Muze bjt korozivnf pro kovy.

1. SKLADOVÁNÍ A STABILITA

Materiál/Reagencie	STAV	SKLADOVÁNÍ	STABILITA
Skušební souprava	neotevřena	2...8 °C	do uplynutí použitelnosti
Mikrotitrační destička	otevřena	2...8 °C v sáčku s desikantem	12 týdnů
Kontroly/ Kalibrátor	otevřena	2...8 °C	12 týdnů
Promývací roztok	zředěný	2...8 °C	12 týdnů
Roztok na ředění vzorků	otevřena	2...8 °C	12 týdnů
Konjugát	otevřena	2...8 °C	12 týdnů
Substrát TMB	otevřena	2...8 °C	12 týdnů
Roztok na zastavení reakce	otevřena	2...8 °C	do uplynutí použitelnosti

Reagencie nepoužívejte po uplynutí data jejich použitelnosti.

2. DALŠÍ POŽADOVANÉ REAGENCIE A MATERIÁLY

2.1. Destilovaná nebo deionizovaná voda.

2.2. Mikropipety pro požadované objemy.

2.3. Čisté skleněné nebo plastické nádoby na ředění promývacího roztoku a vzorků.

2.4. Vhodné zařízení na promývání mikrotitračních destiček (multikanálové pipety nebo promývačky na testy ELISA).

2.5. Inkubátor na teplotu 37 °C.

2.6. Fotometr na mikrotitrační destičky s filtry na 450 nm und 620 – 650 nm.

3. PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

Před zahájením testu vytemperujte všechny komponenty testu na pokojovou teplotu.

Stanovte požadovaný počet mikrotitračních jamek.

3.1. Mikrotitrační destička
Po každém vyjmutí proužků je třeba lepenkový desikant znovu vložit do hliníkového sáčku a dokonale ho uzavřít. Skladování a životnost nepoužitých mikrotitračních jamek je uvedena pod bodem 1.

3.2. Promývací roztok

Smíchejte jednu objemovou část promývacího roztoku (10x) s 9 částmi destilované nebo deionizované vody (např. 50 ml promývacího roztoku (10x) se 450 ml vody). Na 8 jamek budete potřebovat 10 ml promývacího roztoku.

Krystaly v promývacím roztoku (10x) se musí před použitím rozpustit zahřáním (max. na 37 °C) a/nebo promíchaním při pokojové teplotě.

Reagencie specifické pro test (mikrotitrační destička, kontroly, kalibrátor a konjugát) nezaměňujte s reagenciemi jiných šarží. Oproti tomu se roztok na ředění vzorků, promývací roztok, substát TMB a roztok na zastavení reakce u všech testů ELISA firmy medac na Chlamydie und Mycoplasmata mohou zásadně zaměňovat.

Reagencie jiných výrobců nelze v tomto testu zásadně použit.

Validní a reprodukovatelné výsledky získáte pouze tehdy, pokud přesně dodržíte pracovní předpisy.

4. TESTOVACÍ MATERIÁL

4.1. Test je vhodný pro vzorky séra a EDTA plazmy. Vzorky pacientů uchovávejte maximálně 7 dní při teplotě 2–8 °C. Delší uchovávaní se musí provádět při teplotě ≤ –20 °C. Vzorky se nesmí opakovaně zamrazovat a odmrazovat.

4.2. Před testem není nutné provádět žádnou úpravu vzorků, např. deaktivaci. Testované vzorky však nesmí být kontaminovány mikroorganismy ani nesmí obsahovat lidské erytrocyty.

4.3. Vzorky se ředí v poměru 1:250 roztokem na ředění vzorků. Doporučujeme připravit nejdřív ředění v poměru 1:50 (napríklad 10 µl vzorků + 490 µl roztoku na ředění vzorků) a potom zředit dále v poměru 1:5 (například 10 µl vzorků naředěného v poměru 1:50 + 40 µl roztoku na ředění vzorků). Vzorky s hodnotami nad intervalem měření můžete zředit libovolne výše.

5.A. PRACOVNÍ POPIS TESTU

5.1. Sáček s mikrotitrační destičkou otevřte na zipovém závěru a vyjměte požadovaný počet mikrotitračních jamek (viz 3.1.).

Mikrotitrační jamky jsou připraveny k použití a nemusí se promývat.

5.2. Do jamky A1 napipetujte 50 µl roztoku na ředění vzorků pro stanovení pozadí (viz 6.A.) Do jamek destičky dále napipetujte po jednou 50 µl negativní kontroly, po jednou 50 µl pozitivní

kontroly a po jednou 50 µl vzorků a do dvou jamek po 50 µl kalibrátora.

V případě potřeby lze mikrotitrační destičku před dalším zpracováním uchovávat při pokojové teplotě max. 30 min.

5.3. Inkubujte mikrotitrační jamky 60 min (± 5 min) při 37 °C (± 1 °C) (vlhká komora nebo pod inkubační fólií).

5.4. Po inkubaci promyjte mikrotitrační jamky třikrát po 200 µl promývacího roztoku. Dbejte na to, aby se všechny jamky naplnily. Po skončení promývání vyklepejte mikrotitrační jamky na filtračním papíru.

Jamky nesmí vyschnout! Pokračujte v práci okamžitě!

5.5. Do všech jamek přidejte konjugát (zbarvený zeleně).

Při manuálním zpracování testu napipetujte do každé jamky po 50 µl konjugátu.

Poznámka:
Při práci na automatizovaných přístrojových systémech se musí vzhledem na silnější vypařování v inkubačních komorách naprogramovat pro každou jamku 60 µl konjugátu.

Při validaci testu pro automatizované zpracování se ukázalo, že tento test je principiálně vhodný rovněž pro tuto aplikaci. Nicméně doporučujeme verifikovat kompatibilitu testu s přístrojovým systémem, na kterém se bude pracovat.

5.6. Znovu inkubujte 60 min (± 5 min) při 37 °C (± 1 °C) (vlhká komora nebo pod inkubační fólií).

5.7. Po inkubaci promyjte mikrotitrační jamky znovu (viz 5.4.).

5.8. Napipetujte do každé jamky po 50 µl substrátu TMB a inkubujte 30 min (± 2 min) při 37 °C (± 1 °C) ve tmě (vlhká komora nebo pod inkubační fólií). Pozitivní vzorky se zbarví modře.

5.9. Reakci zastavte přidáním do každé jamky po 100 µl roztoku na zastavení reakce. Následuje změna barvy z modré na žlutou.

Před fotometrickým měřením vyčistěte ze spodu mikrotitrační jamky a dbejte na to, aby v jamkách nebyly žádné bubliny vzduchu.

Měření je třeba provést během 15 minut po přidání roztoku na zastavení reakce!

5.B. TABULKA ZNÁZORŇUJÍCÍ PRACOVNÍ POSTUP

	Pozadí (A1)	Negativní kontrola	Pozitivní kontrola	Kalibrátor	Vzorek
Roztok na ředění vzorků	50 µl	–	–	–	–
Negativní kontrola	–	50 µl	–	–	–
Pozitivní kontrola	–	–	50 µl	–	–
Kalibrátor	–	–	–	50 µl	–
Vzorek	–	–	–	–	50 µl
Inkubace 60 min při 37 °C, 3 x promyjte po 200 µl promývacího roztoku					
Konjugát	50/60 µl*)	50/60 µl*)	50/60 µl*)	50/60 µl*)	50/60 µl*)
Inkubace 60 min při 37 °C, 3 x promyjte po 200 µl promývacího roztoku					
Substrát	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Inkubace 30 min při 37 °C ve tmě					
Roztok na zastavení reakce	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Fotometrické odečtení při 450 nm (ref.vln. délka 620–650 nm)					

*) manuální/automatizovatelné zpracování (viz 5.5.)

6.A. HODNOCENÍ TESTU (VALIDITA)

* Vyhodnocení se provádí kvantitativně v arbitrérnych jednotkách (AU/ml).

* Fotometrické vyhodnocení se provádí při vlnové délce 450 nm (referenční vlnová délka 620 – 650 nm).

* Od všech hodnot OD odečtěte hodnotu OD pozadí (jamka A1).

* Údaje specifické pro každou šarži

  K testu je přiložen list údajů specifický pro každou šarži. List obsahuje následující data:
  - standardní křivku specifickou pro každou šarži
  - parameter křivky a und b
  - předepsanou hodnotu OD kalibrátora
  - spodní hraniční hodnotu OD kalibrátora
  - předepsaný interval v jednotkách AU/ml pro pozitivní kontrolu

* Kritériá validity

- Hodnota OD **pozadí** musí být **< 0,100.**
- Hodnota OD **negativní kontroly** musí být **< 0,100.**
- Hodnota unit **pozitivní kontroly** musí ležet vevnitř předepsaného intervalu podle listu údajů specifického pro každou šarži.
- Střední hodnota OD kalibrátora musí ležet nad hraniční hodnotou podle listu údajů specifického pro každou šarži.

Pokud tyto kritériá validity nejsou splněna, musí se test opakovat!

* Korektura naměřených hodnot

Hodnoty OD pozitivní kontroly a vzorků pacientů se musí korigovat následovně:

$$OD_{korigovaná} = \frac{\text{předepsaná hodnota OD kalibrátora}}{\text{naměřená hodnota OD kalibrátora}} \times OD_{naměřená}$$

* Kvantifikace naměřených výsledků

Pro korigované hodnoty OD určete zodpovídající konzentrace v jednotkách AU/ml ze standardní křivky z listu údajů specifickém pro šarži.

Alternativně lze vypočítat konzentrace rovněž pomocí tohto vzorce:

$$\text{Konzentrace [AU/ml]} = b/\left(\frac{a}{OD_{korigovaná}} - 1\right)$$

Do většiny fotometrů na testy ELISA novšího typu lze tento vzorec naprogramovat, čímž je možný přímý výpočet pomocí fotometru.

Interval měření se nachází v rozmezí od 22 do 500 AU/ml. Vzorky s hodnotami unit pod intervalem měření se hodnotí jako < 22 AU/ml, vzorky nad intervalem měření jako > 500 AU/ml. Tyto hodnoty se nesmí extrapolovat.

Cut-off leží u 25 AU/ml.

Hraniční zóna = 22 – 28 AU/ml.

Poznámka! Důležité upozornění!

Vzhledem na matematický algoritmus kvantitatívního výpočtu může dojít v následujících případech k negativním nebo nedefinovatelným hodnotám AU:

- Při silně pozitivních vzorkách s opravenými hodnotami OD ≥ a můžete obdržet negativní nebo nedefinovatelné hodnoty AU (nepovolené dělení nulou). Tyto vzorky se musí přetestovat při vyšším ředění nebo se musí hodnotit jako > 500 AU/ml.

6.B. INTERPRETACE VÝSLEDKU/HRANICE METODY

* Vzorky s hodnotami unit pod hraniční zónou se hodnotí jako **NEGATIVNÍ.**

* Vzorky s hodnotami unit vevnitř hraniční zóny se hodnotí jako **HRANIČNÍ.**

  Séra těchto hodnot se musí kontrolovat po 14 dnech dodatečním odběrem a měřením vzorku.

* Vzorky s hodnotami unit nad hraniční zónou se hodnotí jako **POZITIVNÍ.**

* Výsledky testu je třeba interpretovat vždycky společně s výsledkem IgA a IgM a v souvislosti s klinickým obrazem pacienta a dalšími diagnostickými parametry.

* Vysoké koncentrace hemoglobinu, bilirubinu a lipidů neovlivňují výsledky testu.

* Křížové reakce s protinukleárními protilátkami, heterofilními protilátkami a protilátkami proti ***C. psittaci*** a ***C. trachomatis*** v jednotlivých případech nelze vyloučit.

6.C. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ SPECIFICKÝCH PRO IgM/IgA/IgG

Možné výsledky IgM COI*	 IgA AU/ml	 IgG AU/ml	**Interpretace**
>1,1 +	<22 –	<22 –	Serologický příznak skorého stadia infekce nebo polyklonální stimulace buněk B. Kontrola IgM, IgA a IgG po 14 dnech.
>1,1 +	>28 +	<22 –	Serologický příznak akutní infekce. Kontrola IgG po 14 dnech.
>1,1 +	<22 –	>28 +	Serologický příznak akutní infekce.
>1,1 +	>28 +	>28 +	Serologický příznak akutní infekce.
<0,9 –	>28 +	>28 +	Serologický příznak probíhající infekce[1]. Kontrola IgA a IgG po 14 dnech.
<0,9 –	<22 –	>28 +	Serologický příznak proběhlé infekce. V případě klinického podezření kontrola protilátek IgA a IgG po 14 dnech.
<0,9 –	>28 +	<22 –	Serologický příznak skorého stadia infekce nebo solitárně perzistujícího IgA[2]. Kontrola IgM, IgA a IgG po 14 dnech.
<0,9 –	<22 –	<22 –	Žádný serologický příznak probíhající nebo proběhlé infekce[3]. V případě klinického podezření kontrola IgM, IgA a IgG po 14 dnech.

*** Cut-off-Index**

Poznámka:
Hraniční výsledky mohou poukazovat na začínající se nebo na odeznívající infekci. Doporučujeme kontrolu po 14 dnech.

[1] Probíhající infekce může znamenat:
- chronická infekce s perzistujícími agens: Hodnoty unit protilátek zůstávají na konstantní úrovni po celé týdny.

- akutní infekce: Hodnoty AU protilátek vzrastají.
  Dvojnásobní vzestup **hodnoty AU u IgG** se považuje za statisticky signifikantně zvýšený.
  Dvaapůlnásobní vzestup **hodnoty AU u IgA** se považuje za statisticky signifikantně zvýšený.
- vysoké konzentrace IgG: akutní infekce nelze vyloučit. Podle Graystona et al. (1989) mluví titry testu MIF-IgG ≥ 1:512 ve prospěch akutní infekce.

[2] V jednotlivých případech mohou solitární protilátky IgA perzistovat. Tento imunologický fenomén se vyskytuje u různých bakteriálních infekcích. Klinickou relevanci je těžké posoudit.

[3] V případě čertvých, akutních infekcích ***C. pneumoniae*** může být serologický nález protilátek i v případě pozitivního klinického obrazu a pozitivního průkazu agens negativním. Pokud se vyžaduje serologické potvrzení pozitivního průkazu agens, evtl. v prípadě kontroly průběhu protilátek doporučujeme po 14 dnech test na serologickou konversi.

7. CHARAKTERISTICKÉ VLASTNOSTI TESTU

V rámci diagnostické evaluace jsme obdrželi následující charakteristiky testu.

7.A. SPECIFITA A CITLIVOST

V rámci diagnostického hodnocení bylo testováno 560 vzorků pro porovnání s testem první generace **C. pneumoniae-IgG-ELISA *plus* medac.**

Toto porovnání přineslo následující hodnoty*:

Citlivost	=	100%
Specifita	=	96,8%
Korelace	=	99,5%

*Hraniční výsledky jsme nebrali do úvahy.

7.B. PŘESNOST

Vzorek	Variace intraassay				Vzorek	Variace interassay (n = 11)		
	Ø AU/ml	S	VK (%)	n		Ø AU/ml	S	VK (%)
PK	60,6	2,9	4,8	22	**PK**	74,7	5,8	7,8
1	13,3	0,5	4,1	22	**5**	12,5	1,1	9,2
2	55,3	4,6	8,4	22	**6**	58,5	4,4	7,6
3	141,9	12,5	8,8	22	**7**	119,7	8,9	7,4
4	397,4	39,3	9,9	22	**8**	432,3	28,9	6,7

VŠEOBECNÉ RADY TÝKAJÍCÍ SE MANIPULACE

* Aby se predešlo vzájemné kontaminaci jednotlivých reagencií, nezaměňujte lahvičky ani jejich šroubové uzávěry.

* Reagencie je třeba ihned po použití uzavřít, aby nedocházelo k jejich vypařování a mikrobiální kontaminaci.

* Po skončení testu se musí reagencie uložit tak, jak je uveděno v pokynech, aby se zachovala jejich garantovaná životnost.

* Aby se predešlo záměne reagencií různých testovacích systémů nebo šarží, musí se všechny komponenty jednoho setu po jednotlivém použití skladovat společně v původním balení (viz také 3.).

INFORMACE TÝKAJÍCÍ SE BEZPEČNOSTI A OCHRANY ZDRAVÍ

* Je nevyhnutné dodržovat místní předpisy týkající se bezpečnosti práce.

* Reagencie lidského původu byli testovány na HBsAg, na protilátky proti HIV 1/2 a protilátky proti HCV a bylo zjištěno, že nejsou reaktivní. Přesto se musí s těmito reagenciemi a také s těmi, které obsahují součásti zvířecího původu, (viz obsah soupravy), pracovat jako s potencielně nákažlivými, aby se předešlo riziku nákazy.

RADY TÝKAJÍCÍ SE LIKVIDACE

Zbytky chemikálií a preparátů jsou obecně považovány za speciální odpad. Likvidace tohoto druhu odpadu se řídí národními a regionálními zákony a předpisy. Obraťte se na orgány místní správy nebo na organizace zabývající se odpady, které vám podají informace, jak likvidovat tyto nebezpečné odpady.

Datum vydání: 01.04.2016

LITERATURA

Balin, B.J., Gérard, H.C., Arking, E.J., Appelt, D.M., Branigan, P.J., Abrams, J.T., Whittum-Hudson, J.A., Hudson, A.P.: Identification and localization of ***Chlamydia pneumoniae*** in the Alzheimer's brain. Med. Microbiol. Immunol. 187, 23-42 (1998).

Blasi, F., Damato, S., Cosentini, R., Tarsia, P., Raccanelli, R., Centanni, S., Allegra, L., and the Chlamydia InterAction with COPD (CIAC) Study Group: ***Chlamydia pneumoniae*** and chronic bronchitis: association with severity and bacterial clearance following treatment. Thorax 57, 672-676 (2002).

Christiansen, G., Boesen, T., Hjerno, K., Daugaard, L., Mygind, P., Madsen, A.S., Knudsen, K., Falk, E., Birkelund, S.: Molecular biology of ***Chlamydia pneumoniae*** surface proteins and their role in immunopathogenicity. Am. Heart J. 138, 491-495 (1999).

Danesh, J., Collins, R., Peto, R.: Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? Lancet 350, 430-436 (1997).

Elkind, M.S., Lin, I.F., Grayston, J.T., Sacco, R.L.: ***Chlamydia pneumoniae*** and the risk of first ischemic stroke. The Northern Manhattan stroke study. Stroke 31, 1521-1525 (2000).

Gérard, H.C., Schumacher, H. R., El-Gabalawy, H., Goldbach-Manksy, R., Hudson, A.P.: ***Chlamydia pneumoniae*** present in the human synovium are viable and metabolically active. Microb. Pathog. 29, 17-24 (2000).

Grayston, J.T., Aldous , M.B., Easton, A., Wang, S.P., Kuo C.C., Campbell, L.A., Altman, J.: Evidence that ***Chlamydia pneumoniae*** causes pneumonia and bronchitis. J. Infect. Dis. 168, 1231-1235 (1993).

Grayston, J. T., Wang, S. P., Kuo, C. C., Campbell, L. A.: Current knowledge on ***Chlamydia pneumoniae***, strain TWAR, an important cause of pneumonia and other acute respiratory diseases. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 8, 191-202 (1989).

Gupta, S., Leatham, E.W., Carrington, D., Mendall, M.A., Kaski, J.C., Camm, A.J.: Elevated ***Chlamydia pneumoniae*** antibodies, cardiovascular events, and azithromycin in male survivors of myocardial infarction. Circulation 69, 401-407 (1997).

Gurfinkel, E., Bozovich, G., Daroca, A., Beck, E., Mautner, B.: Randomised trial of roxithromycin in non-Q-wave coronary syndromes: ROXIS pilot study. Lancet 350, 404-407 (1997).

Hahn, D.L., Peeling, R.W., Dillon, E., McDonald, R., Saikku, P.: Serologic markers for ***C. pneumoniae*** in asthma. Ann. Allergy Asthma Immunol. 84, 227-233 (2000).

Hunter, S.F., Hafler, D.A.: Ubiquitous pathogens: links between infection and autoimmunity in MS? Neurology 55, 164-165 (2000).

Jitsuiki, K., Yamane, K., Nakajima, M., Nakanishi, S., Tasaki, N., Watanabe, H., Kurihara, H., Kohno, N.: Association of ***Chlamydia pneumoniae*** infection and carotid intima-media wall thickness in Japanese Americans. Circ. Journal 70, 815-819 (2006).

Kuo, C. C., Jackson, L.A., Campbell, L.A., Grayston, J.T.: ***Chlamydia pneumoniae***(TWAR). Clin. Microbiol. Rev. 8, 451-461 (1995).

Layh-Schmitt, G., Bendl, C., Hildt, U., Dong-Si, T., Jüttler, E., Schnitzler, P., Grond-Ginsbach, C., Grau, A.J.: Evidence for infection with ***Chlamydia pneumoniae*** in a subgroup of patients with multiple sclerosis. Ann. Neurol. 47, 652-655 (2000).

Maass, M., Bartels, C., Engel, P.M., Mamat, U., Sievers, H.H.: Endovascular presence of viable ***Chlamydia pneumoniae*** is a common phenomenon in coronary artery disease. J. Am. Coll. Cardiol. 31, 827-832 (1998).

Muhlestein, J.B.: The link between ***Chlamydia pneumoniae*** and atherosclerosis. Infect. Med. 14, 380-382, 392, 426 (1997).

Saikku, P.: Chronic ***Chlamydia pneumoniae*** infections. In: Chlamydia Research. Angelika Stary (ed.). Proceedings of the Third Meeting of the European Society for Chlamydia Research, Vienna, Austria, 11.-14. September. 215-218 (1996).

Saikku, P., Leinonen, M., Mattila, K., Ekman, M.R., Nieminen, M.S., Mäkela, P.H., Huttunen, J.K., Valtonen, V.: Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. Lancet 2, 983-986 (1988).

Saikku, P., Leinonen, M., Tenkanen, L., Linnanmäki, E., Ekman, M.R., Manninen, V., Manttari, M., Frick, M.H., Huttunen, J.K.: Chronic ***Chlamydia pneumoniae*** infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. Ann. Intern Med. 116, 272-278 (1992).

Samra, Z., Soffer, Y.: IgA antichlamydial antibodies as a diagnostic tool for monitoring of active chlamydial infection. Eur. J. Epidemiol. 8, 882-884 (1992).

Sriram, S., Stratton, C.W., Yao, S.: ***Chlamydia pneumoniae*** infection in the central nervous system in multiple sclerosis. Ann. Neurol. 46, 6-14 (1999).

Villareal, C., Whittum-Hudson, J.A., Hudson, A.P.: Persistent Chlamydiae and chronic arthritis. Arthritis Res. 4, 5-9 (2002).