

# Valutazione del ruolo delle IgM, IgG, IgA sieriche e delle IgA dello sputo nella diagnosi di polmonite comunitaria da *Chlamydia pneumoniae*: studio italiano policentrico

Gino Ciarrocchi<sup>1</sup>, Fernando De Benedetto<sup>2</sup>, Vincenzo Fogliani<sup>3</sup>, Enrico Magliano<sup>4</sup>, Raffaele Del Prete<sup>5</sup>, Giuseppe Miragliotta<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Sezione di Sierologia, Laboratorio Diagnostico, Ospedale "Umberto I°" - Ancona,

<sup>2</sup>Dipartimento di Pneumologia Ospedale "S. Camillo De Lellis" Chieti;

<sup>3</sup>Unità di Pneumologia e Fisiopatologia Respiratoria, Ospedale di Milazzo,

<sup>4</sup>Dipartimento di Microbiologia, Laboratorio Diagnostico, Ospedale "Niguarda Ca' Granda" - Milano,

<sup>5</sup>Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Clinica Medica, Immunologia e Malattie Infettive, Università degli Studi di Bari.

**Evaluation of the role of specific IgM, IgG and IgA in the diagnosis of community-acquired pneumonia due to *Chlamydia pneumoniae* in the Italian population**

**Key words:** Antibodies, CAP, *Chlamydia pneumoniae*, Diagnosis, Serology.

## SUMMARY

To evaluate the incidence of *Chlamydia pneumoniae* as etiologic agent of community acquired pneumonia (CAP), specific IgM and IgG antibodies anti-*C. pneumoniae* in serum and IgA in both serum and sputum were detected by a new ELISA-like test (EIA CP-IgG, IgA, IgM – Eurospital, Italy). The study was carried out from January 1999 to July 2001 in sixteen Italian Hospitals on a total of 141 patients with clinical signs of CAP.

At a primary inspection (time T-0) serum and sputum samples were taken from 115/141 patients, whereas serum was collected from only 100/141 patients after 30 days (time T-30). At T-0 24/115 (20.8%) patients showed serological markers suggesting primary *C. pneumoniae* infection. In 23/24 patients the overall serological pattern found at T-0 was confirmed at T-30. In 32/115 patients (27.8%) serological markers of *C. pneumoniae* suggesting secondary infection were found positive and were confirmed 30 days later.

Our data support the possible role played by *C. pneumoniae* as an important etiologic agent of CAP throughout different geographic areas of Italy. The test was suitable for the laboratory diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* infection. In particular, the presence of specific IgA anti-*Chlamydia pneumoniae* in both serum and sputum revealed to be useful to define different stages and evolution of infection.

## INTRODUZIONE

*Chlamydia pneumoniae* è un microrganismo intracellulare obbligato, identificato come possibile agente eziologico di polmonite "acquisita in comunità" (15, 16). È responsabile della cosiddetta "polmonite atipica" caratterizzata da quadri clinici di gravità variabile da forme lievi fino a manifestazioni severe che si evolvono nella Sindrome Respiratoria Acuta (ARDS) con un alto tasso di mortalità, particolarmente negli anziani (6, 10, 23). In aggiunta, *C. pneumoniae* è stato dimostrato giocare un ruolo nelle malattie quali faringite, sinusite, otite ed asma (1,4,11,12,30). *C. pneumoniae* è stata coinvolta nelle malattie croniche malattie coronariche, sclerosi a placche e la malattia di Alzheimer (2,17,22). La diagnosi dell'infezione da *C. pneumoniae* è principalmente clinica e radiologica (14); tuttavia, soltanto lo studio microbiologico può confermare il sospetto eziologico. I metodi per la rilevazione dei sogget-

ti infettati dal microrganismo si basano principalmente sulle prove sierologiche (5,21,29,32). La coltura di *C. pneumoniae* dai campioni clinici, riconosciuta come il "gold standard", è problematica date le caratteristiche biologiche del microrganismo o alla qualità dei campioni (29).

L'amplificazione genica (Polymerase Chain Reaction) nella diagnosi dell'infezione da *C. pneumoniae* è sicuramente di grande importanza, per la elevata sensibilità e specificità quando paragonata all'esame colturale, ma non è un metodo standardizzato né facilmente disponibile (9,20,24).

Lo scopo del presente studio è stato quello di definire il ruolo di IgM e IgG sieriche e di IgA sieriche e dell'espettorato nella diagnosi delle infezioni respiratorie da *C. pneumoniae*.

## MATERIALI E METODI

### Popolazione studiata

Lo studio è stato effettuato da Gennaio del 1999 a Luglio del 2001, su un totale di 141 pazienti (90 maschi e 51 femmine), di età variabile da 15 a 90 anni con il sospetto clinico di CAP, arruolati dopo consenso informato in 16 Ospedali Italiani (figura I). Ogni ospedale ha reclutato fino a 10 casi successivi di CAP, accertati in conformità con la definizione di CAP come "infezione acuta del parenchima polmonare associata con sintomi dell'infezione acuta, accompagnata dalla presenza di un infiltrato visibile alla radiografia del torace o da reperti auscultatori compatibili con polmonite, che si presenta in un paziente ospedalizzato o residente in una struttura per lungodegenti da almeno 14 giorni prima dell'inizio dei sintomi (3). Per ogni paziente studiato, sono stati registrati i dati clinico-anamnestici e sierologici.

### Indagini di Laboratorio

Per rilevare le immunoglobuline specifiche IgG, IgA e IgM anti-*C. pneumoniae* è stato utilizzato un nuovo test ELISA (Cp IgG-IgA-IgM EUROSPITAL, Trieste, Italia). In questo test ELISA i pozzetti delle micropiastre sono rivestiti con corpi elementari purificati di *C. pneumoniae* ceppo TW-183. I campioni del siero sono stati raccolti al momento del reclutamento del paziente (tempo-0, T-0) e, successivamente, dopo 30 giorni (T-30). I sieri sono stati diluiti 1:105 con tampone specifico per immunoglobuline. Per la rilevazione di IgM è stata aggiunta la soluzione tampone specifica allo scopo di eliminare IgG e il Fattore Reumatoide. I sieri diluiti sono stati divisi in due aliquote e congelati a -20°C fino all'esecuzione del test. Per rilevare la presenza di IgA, a T-0 è stato raccolto l'espettorato spontaneo. Questo è stato fluidificato 1:10 aggiungendo il diluente-specifico del campione contenuto nel kit EIA-Cp IgA. Ogni campione è stato vortexato fino a completa fluidificazione e quindi lasciato riposare per 15 minuti. Dopo centrifugazione per 10 minuti a 3000 giri il "buffy-coat" (campione trattato) ottenuto è stato raccolto e congelato a -20°C in due aliquote. Successivamente sono state eseguite diluizioni 1:10 e 1:20 e il test è stato effettuato secondo le istruzioni fornite nel kit.

Allo scopo di calcolare il "cut-off value" (COV) e per convalidare il test, sono stati aggiunti ai campioni dei pazienti un controllo positivo (PC) e un siero negativo pre-diluito di controllo (NC) in triplo.

I risultati sono stati espressi come "Index Values" (IV) secondo la formula:

$$IV = \frac{\text{densità ottica (OD) a 450 nm}}{\text{COV}}$$

COV si ottiene dalla media delle OD a 450 nm dei tre controlli negativi (NC) moltiplicato per 2; i

risultati di  $IV > 1.1$  sono stati considerati positivi; i risultati tra 1.0 - 1.1 valori limite e, infine,  $IV < 1.0$  risultati negativi. Nel nostro studio, per facilitare la lettura dei risultati, gli IV sono stati moltiplicati per 100 ed è stato determinato il valore di soglia (TV) = 100.

Su questa base l'infezione primaria è suggerita da:

IgM > 100 a T-0; sierconversione di IgM (e di IgG/IgA) a T-30; IV IgG+IgA+IgM o IgA+IgM > 100 a T-0 e/o a T-30.

L'infezione secondaria è suggerita da:

IgM < 100; IV di IgA e di IgG  $\geq 200$  a T-0; IV di IgA e/o di IgG  $\geq 300$  a T-30.

### RISULTATI

Poiché soltanto i risultati omogenei e paragonabili sono stati presi in considerazione, sono stati studiati a T-0 115/141 ed a T-30 100/141 pazienti che hanno soddisfatto pienamente i criteri clinico-anamnestici di CAP. Per ognuno dei pazienti sono stati esaminati a T-0 e a T-30 due campioni del siero e soltanto un campione di espettorato a T-0. La figura II (sinistra) mostra il pattern dei marker sierologici rilevati a T-0 in 24/115 (20.8%) dei pazienti che suggerisce infezione primaria da *C. pneumoniae*. Nella sezione destra è indicato il pattern dei marker sierologici rilevati in 23/24 dei pazienti a T-30 che conferma i risultati precedentemente osservati. Nella figura III si rileva che 32/115 (27.8%) dei pazienti hanno esibito a T-0 il pattern dei marker sierologici che suggerisce infezione secondaria (assenza di anticorpi specifici IgM). Questi risultati sierologici sono stati confermati a T-30.

In 26/78 (33.3%) campioni di espettorato raccolti IV per IgA è risultato positivo. In particolare, 17/19 (94.7%) degli espettorati provenivano da pazienti con marker sierologici di infezione primaria e 9/14 (64.2%) degli espettorati da pazienti con infezione secondaria (figura IV).

Per quanto riguarda l'età dei pazienti, l'età media nell'infezione primaria è 42 ed in quella secondaria 68 ( $p < 0.00001$ ). Quando è stata valutata l'incidenza dell'infezione di *C. pneumoniae* per gruppo d'età, l'infezione primaria è stata rilevata nel 66.6% (16 casi) 15-45 anni e nel 33.3% (8 casi) 46-95 anni, suggerendo quindi la riduzione dei casi con l'aumentare dell'età. Una tendenza opposta è stata trovata valutando i markers sierologici dell'infezione secondaria: 12.5% nel gruppo d'età 15-45 anni e 87.5% nel gruppo d'età 46-95 anni (tabella 1). La tabella 2 mostra la distribuzione dell'IV per IgG, IgA ed IgM in pazienti con l'infezione primaria da *C. pneumoniae* a T-0 ed a T-30. A T-0 è stato trovato rispettivamente IV positivo per IgM in 17/24 (70.9%) dei pazienti

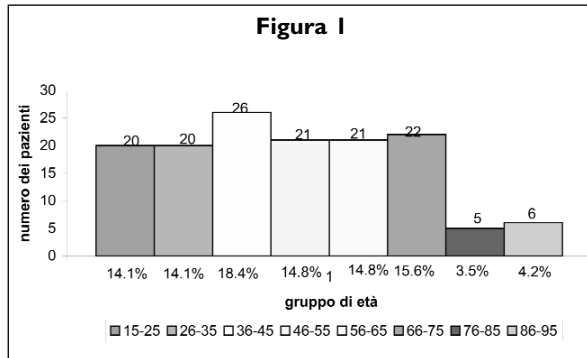


Figura I. Pazienti (nr=141) divisi per gruppi di età

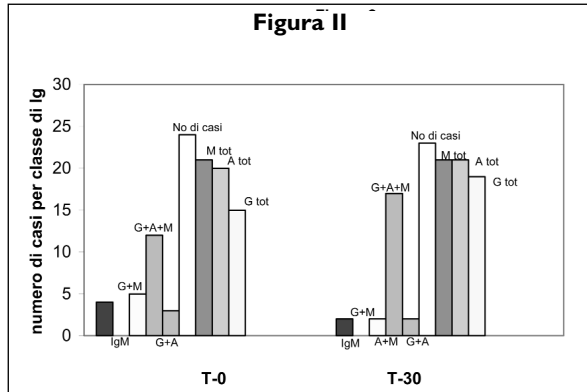


Figura II. Incidenza di infezione primaria da C. pneumoniae al tempo T-0 e T-30 stabilita sulla base dei marker sierologici

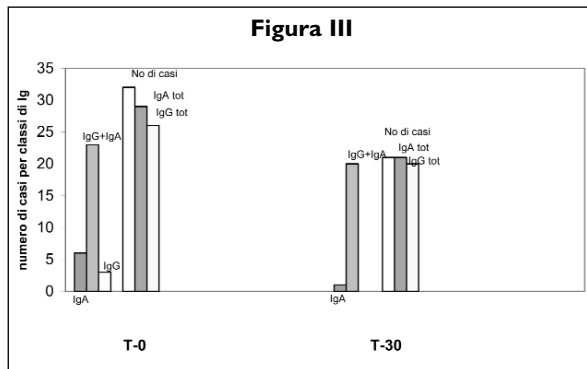


Figura III. Incidenza di infezione secondaria da C. pneumoniae al tempo T-0 e T-30 stabilita sulla base dei marker sierologici

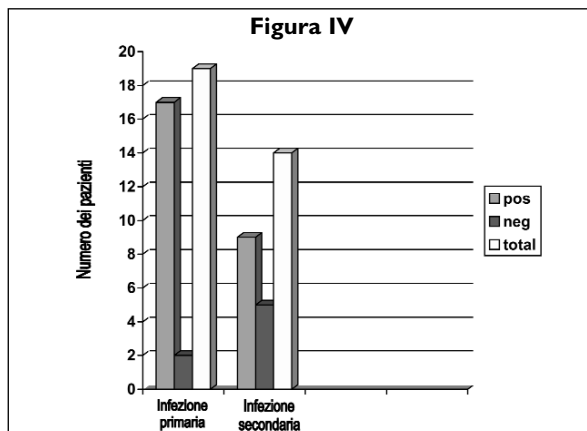


Figura IV. IgA anti-C. pneumoniae IgA nei campioni di espettorato raccolti da pazienti studiati

Tabella 1. Incidenza di infezione primaria e secondaria da Chlamydia pneumoniae in differenti gruppi di età.

età	Infezione primaria = 24 casi	Infezione secondaria = 32 casi
15-25	4	0
26-35	6	1
36-45	6	3
<b>totale</b>	<b>16 (66.6%)</b>	<b>4 (12.5%)</b>
46-55	2	6
56-65	4	7
66-75	1	9
76-85	1	2
86-95	0	4
<b>totale</b>	<b>8 (33.4%)</b>	<b>28 (87.5%)</b>

Tabella 2. Distribuzione degli Index values (IV) al tempo T-0 and T-30 nei pazienti con infezione primaria da Chlamydia pneumoniae.

Index Values a T-0	IgG nr.=24	IgA nr.=24	IgM nr.=24
>500	0	0	0
400 - 500	0	3 (12.5%)	2 (8.3%)
300 - 400	1 (4.1%)	6 (25%)	1 (4.2%)
200 - 300	5 (20.8%)	5 (20.8%)	3 (12.5%)
100 - 200	8 (33.4%)	9 (37.5%)	11 (45.8%)
<100	10 (41.6%)	9 (37.5%)	7 (29%)

Index Values a T-30	IgG nr.=23	IgA nr.=23	IgM nr.=23
<100	5 (21.7%)	3 (13%)	2 (8.6%)
100 - 200	13 (56.5%)	15 (65.2%)	17 (74%)
200 - 300	4 (17.3%)	3 (13%)	1 (4.3%)
300 - 400	1 (4.3%)	2 (8.8%)	1 (4.3%)
400 - 500	0	0	2 (8.7%)
>500	0	0	0

Tabella 3. Distribuzione degli Index Values al tempo T-0 and T-30 nei pazienti con infezione secondaria da Chlamydia pneumoniae.

Index Values a T-0	IgG nr.=32	IgA nr.=32	IgM nr.=32
>500	0	0	0
400 - 500	0	7 (21.8%)	0
300 - 400	1 (3%)	3 (9.4%)	0
200 - 300	7 (22%)	9 (28.1%)	0
100 - 200	19 (59.4%)	10 (31.2%)	0
<100	5 (15.6%)	3 (9.3%)	32 (100%)

Index Values r.=21	IgG r.=21	IgA r.=21	IgMn r.=21
<100	1 (4.8%)	0	21 (100%)
100 - 200	11 (52.3%)	10 (47.6%)	0
200 - 300	8 (38%)	5 (23.8%)	0
300 - 400	1 (4.8%)	1 (4.8%)	0
400 - 500	0	5 (23.8%)	0
>500	0	0	0

ti, per IgA in 23/24 (95.8%) dei pazienti e per IgG in 14/24 (58.3%) dei pazienti. A T-30 IV è risultato positivo rispettivamente per IgM in 21/23 (91.4%) dei pazienti, per IgA in 20/23 dei pazienti (di 87%) e per IgG in 18/23 (78.3%) dei pazienti (tabella 2). La tabella 3 indica che nella infezione secondaria IV per IgM era < 100 (TV=100) in tutti i pazienti studiati sia a T-0 che a T-30. Riguardo alle IgA, 29/32 (90.7%) dei pazienti hanno esibito IV positivo a T-0 e 21/21 (di 100%) pazienti a T-30. L'IV positivo di per IgG è stato trovato in 27/32 (84.4%) dei pazienti a T-0 ed in 20/21 (95.2%) dei pazienti a T-30.

## DISCUSSIONE

In questo studio abbiamo valutato la prevalenza di anticorpi specifici IgM, IgG e IgA anti-*C. pneumoniae* nei pazienti con CAP. Marker sierologici positivi dell'infezione primaria di *C. pneumoniae* sono stati riscontrati in 24/115 (20.8%) dei pazienti a T-0. Questi risultati sono stati confermati a T-30. Anticorpi specifici IgM sono stati gli indicatori sierologici più precoci insieme con la presenza di livelli elevati di anticorpi specifici IgA. In realtà, gli anticorpi IgA sembrerebbero avere un significato importante nel pattern sierologico delle infezioni secondarie mentre gli anticorpi IgM non sembrerebbero più avere un ruolo diagnostico in questa fase dell'infezione. La spiegazione del precoce innalzamento di IgM ed IgA in questo gruppo dei pazienti si basa sul fatto che il primo test è stato eseguito al tempo T-0 che corrisponde alla prima osservazione clinica ma non necessariamente all'inizio dell'infezione. Un'altra considerazione possibile è che nel periodo di tempo necessario per la diagnosi dell'infezione da *C. pneumoniae*, il paziente potrebbe essere stato sottoposto a trattamento terapeutico basato sui risultati clinici. D'altra parte il test potrebbe rilevare precocemente gli anticorpi IgM-anti lipopolisaccaride (LPS) di *C. pneumoniae*, contribuendo a ridurre il tempo necessario per la diagnosi (7). Un aspetto ulteriore da considerare riguarda l'infezione secondaria da *C. pneumoniae* che è risultata prevalente nell'età adulta, e caratterizzata dall'assenza di IgM e dalla presenza di IgG e di IgA anche se a livello differente. Questo quadro è stato riscontrato effettivamente in 32/115 (27.8%) pazienti studiati. Tuttavia questa definizione non può caratterizzare completamente l'infezione secondaria poiché anticorpi specifici IgA e IgG sono stati trovati anche in adulti senza segni clinici della malattia respiratoria [28]. Dai nostri risultati si evince ancora che, in un dato gruppo di pazienti, IV per IgG ed IgA è stato 3-4 volte superiore al valore di soglia. Questi risultati suggeriscono anche l'associazione fra i

dati sierologici e la riattivazione di un'infezione cronica latente. Di conseguenza potremmo speculare che la produzione di livelli elevati di IgA in assenza di IgM rappresenta un'immagine importante dell'infezione secondaria di *C. pneumoniae*. Il motivo della rilevazione nell'infezione secondaria di alti picchi anticorpali (per esempio IgA) può essere spiegata da una infezione "de-railed" che si realizza in modo particolare nel tempo e che riflette una interazione complessa fra il microrganismo ed il sistema immune dell'ospite (18,28). D'altra parte, Verkooyen ed altri (29) hanno dimostrato che la riattivazione clinica in pazienti con malattie respiratorie (per esempio broncopatie croniche ostruttive, BCPO), è associata ad aumentati livelli sierici di anticorpi IgA e IgG.

I metodi sierologici rappresentano un mezzo diagnostico importante per confermare l'infezione da *C. pneumoniae* ma i risultati ottenuti dovrebbero essere valutati con attenzione. A tale riguardo, nel nostro caso, il test di micro-immunofluorescenza (MIF) è ancora considerato il metodo di riferimento o "gold standard" (8,13,25,27). Tuttavia, MIF presenta alcuni inconvenienti quali la difficoltà nella preparazione, nell'allestimento e nella lettura dei vetrini così come variabile risulta la qualità della preparazione dell'antigene. Recentemente è stato messo in discussione il valore diagnostico della MIF poiché sono state rilevate reazioni crociate inter-*Chlamydia* (26). In effetti il test mette in evidenza anticorpi non soltanto anti-*C. pneumoniae* ma anche anti-*C. psittaci* o anti-*C. trachomatis* poiché LPS è genere-specifico (19).

Il test eseguito in questo lavoro, utilizzando, come antigene adeso, i corpi elementari purificati di *C. pneumoniae* TW-183 ha mostrato una buona affidabilità. Uno strumento diagnostico supplementare è stata la rilevazione di anticorpi IgA anti-*C. pneumoniae* nell'espettorato raccolto dai pazienti a T-0. I risultati ottenuti confermano, almeno in parte, quelli ottenuti da Von Hertzen *et al* in pazienti che erano affetti da BCPO o da riattivazione dell'infezione da *C. pneumoniae* (31). Inoltre, la nostra ricerca evidenzia una relazione suggestiva fra i campioni dell'espettorato IgA-positivi ed il pattern sierologico dell'infezione primaria e, meno spesso, dell'infezione secondaria. Tuttavia, la tecnica usata è afflitta da inconvenienti quali il trattamento del campione o la ricerca di una diluzione sufficiente del campione trattato da testare. La tecnica migliorata rappresenterà quindi un efficace mezzo diagnostico utile anche nel caso di altri liquidi biologici oltre al siero.

Non considerando i limiti che derivano sia da una

definizione di "gold standard" sia da problemi che coinvolgono l'interpretazione, la ricerca sierologica effettuata svolge un ruolo significativo nella definizione eziologica della diagnosi dell'infezione da *C. pneumoniae*. Questo microrganismo è sembrato essere effettivamente un agente eziologicamente rilevante nelle CAP ed in altre patologie respiratorie in quasi tutti i centri italiani di partecipazione.

### Centri partecipanti

- Unità Operativa Medicina I, INRCA-Ancona: Donato Lo Nardo.
- Unità Operativa Medicina, Ospedale Civitanovamarche: Riccardo Centurioni.
- Unità Operativa Pneumologia: Roberto Negrin; Unità Operativa Lab. Analisi. Ospedale "S. Bortolo" Vicenza: Patrizia Reatto.
- Unità Operativa Pneumologia, Ospedale Regionale Bolzano: Alberto Triani; Servizio Multizonale Microbiologia Bolzano: Francesco Rizza.
- Unità Operativa Pneumologia,: Giovanni Talmassons; Unità Operativa Laboratorio Analisi: Paolo Lanzafame. Ospedale "S. Maria Misericordia" Udine.
- Unità Operativa Pneumologia: Giorgio Bernabò di Negro; Unità Operativa Laboratorio Analisi: Evelina Senno. Azienda Ospedaliera "San Martino" Genova.
- Unità Operativa Medicina I: Andrea Vizzaccaro, Ignazio Cirillo. Ospedale Principale Marina Militare – La Spezia.
- Unità Operativa Pneumologia: Giorgio De Bernardi; Unità Operativa Laboratorio Analisi: Rosa Micelli, Luciano Marchetti. Azienda Ospedaliera "G. Salvini" Garbagnate Milanese.
- Ospedale "R. Binaghi" Cagliari: Silvana Orro, Marcello Ledda, Elisabetta Ramo.
- Unità Operativa Pneumologia II: Anna Maria Moretti; Unità Operativa Laboratorio Analisi: Antonio De Santis. Ospedale "San Paolo" Bari.
- Cattedra di Pneumologia: Enzo Gramiccioni; Maria Pia Foschino Barbaro; Cattedra di Microbiologia: Giuseppe Miragliotta, Raffaele Del Prete, Università degli Studi di Bari.
- Unità Operativa Pneumologia: Francesco Tirone. Ospedale Civile di Lungo (CS); Servizio Microbiologia: Wilma Venditti. Ospedale "Ferrari" Castrovillari (CS).
- Unità Operativa Pneumologia: Giuseppe Lauriello; Unità Operativa Laboratorio Analisi: Fiammetta Diamare. Ospedale "Giovanni da Procida" Salerno.
- U.O. Pneumologia I: Giuseppe Iraci. Osp. "Cervello" Palermo; Dip. Medicina Clinica: Serafino Mansueto. Università degli Studi di

Palermo.

- Unità Operativa Pneumologia: Vito Gioia. Ospedale "G.F. Ingrassia" Palermo; Laboratorio Diagnostica Patologie Emergenti: Giustina Vitale. Università degli Studi di Palermo.
- Unità Operativa Laboratorio Analisi Centrale: Donatella Tagliatalata. Ospedale "Cardarelli" Napoli.

### BIBLIOGRAFIA

1. Allegra L, Blasi F, Centanni S, et al. Acute exacerbations of asthma in adults: role of *Chlamydia pneumoniae* infection. *Eur Respir J* 1994; 7: 2165-68.
2. Balin BJ, Gerard HC, Arking EJ, et al. Identification and localization of *Chlamydia pneumoniae* in the Alzheimer's brain. *Med Microbiol Immunol* 1998; 187: 23-42.
3. Bartlett JG, Breiman RF, Mandell LA, File TM jr. Community-acquired pneumonia in adults: guidelines for management. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 811-38.
4. Beaty CD, Grayston JT, Wang S-P, Kuo CC, Reto CS, Martin TR, *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR, infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 1408-10.
5. Ben Yaakov M, Lazarovich Z, Beer S, Levin A, Shoham I, Boldur I. Prevalence of *Chlamydia pneumoniae* antibodies in patients with acute respiratory infections in Israel. *J Clin Pathol* 1994; 47: 232-5.
6. Bochud PY, Moser F, Erad P, et al. Community-acquired pneumonia. A prospective outpatient study. *Medicine* 2001; 80: 75-87.
7. Brade L, Brunneman H, Ernst M, Fu Y, Holst O, Kosma P, Naher H, Persson K, Brade H. Occurrence of antibodies against chlamydial lipopolysaccharide in human sera as measured by ELISA using an artificial glycoconjugate antigen. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1994; 8: 27-41.
8. Campbell LA, Kuo CC, Wang SP, Grayston JT. Serological response to *Chlamydia pneumoniae* infection. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1261-4.
9. Campbell LA, Peres Melgosa MP, Hamilton DJ, Kuo C-C, Grayston JT. Detection of *Chlamydia pneumoniae* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 434-9.
10. Cosentini R, Blasi F, Raccanelli R, et al. Severe community-acquired pneumonia: a possible role for *Chlamydia pneumoniae*. *Respiration* 1996; 63: 61-5.
11. Cunningham AF, Johnston SL, Julious SA, Lampe FC, Ward ME. Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection and asthma exacerbations in children. *Eur Respir J* 1998; 11: 345-9.
12. Foschino Barbaro MP, Resta O, Aliani M et al. Seroprevalence of chronic *Chlamydia pneumoniae* infection in patients affected by chronic stable asthma. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 358-62.
13. Gnärpe J, Nääs J, Lundbäck A. Comparison of a new commercial EIA kit and the microimmunofluorescence technique for determination of IgG and IgA antibodies to *Chlamydia pneumoniae*. *APMIS* 2000; 108: 819-24.
14. Grayston JT. Infections caused by *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 757-63.
15. Grayston JT, Kuo CC, Campbell LA, Wang S-P. *Chlamydia pneumoniae* sp. nov. for *Chlamydia* sp. strain TWAR. *Int J Syst Bacteriol* 1989; 39: 88-90.

16. Grayston JT, Kuo CC, Wang S-P, Altam J. A new *Chlamydia psittaci* strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infections. *N Engl J Med* 1986; 315: 161-8.
17. Gurfinkel E. Link between intracellular pathogens and cardiovascular diseases. *Clin Microbiol Infect* 1998; 4: S33-6.
18. Hammerschlag MR, Chirgwin K, Roblin PM, et al. Persistent infection with *Chlamydia pneumoniae* following acute respiratory illness. *Clin Infect Dis* 1992; 14: 178-82.
19. Holst O, Brade L, Kosma P, H Brade. Structure, serological specificity and synthesis of artificial glycoconjugates representing the genus-specific lipopolysaccharide epitope of *Chlamydia spp.* *J Bacteriol* 1991; 173: 1862-6.
20. Jantos CA, Roggendorf R, Wuppermann FN, Hegemann JH. Rapid detection of *Chlamydia pneumoniae* by PCR-Enzyme Immunoassay. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1890-4.
21. Kanamoto Y, Ouchi K, Mizui M, Ushio M, Usui T. Prevalence of antibody to *Chlamydia pneumoniae* TWAR in Japan. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 816-8.
22. Koskiniemi M, Genkay M, Salonen O, et al. *Chlamydia pneumoniae* associated with the central nervous system infections. *Eur Neurol* 1996; 36: 160-3.
23. Miyashita N, Niki Y, Matsushima T, Okimoto N. Community-acquired *Chlamydia pneumoniae* pneumonia. *Chest* 2000; 117: 615-6.
24. Naidu BR, Ngeow Y, Pang T. MOMP-based PCR reveals presence of *Chlamydia pneumoniae* DNA in respiratory and serum samples of patients with acute *C. pneumoniae*-associated infections. *J Microbiol Methods* 1998; 36: 1890-4.
25. Ossewaarde JM, Tuuminen T, Boersma WG, Sandström M, Palomaki P, Boman J. A preliminary evaluation of a new enzyme immunoassay to detect *Chlamydia pneumoniae*-specific antibodies. *J Microbiol Methods* 2000; 43: 117-25.
26. Peeling RW, Wang S-P, Grayston JT, et al. *Chlamydia* serology: interlaboratory variation in microimmunofluorescence assay results. *J Infect Dis* 2000; 181: S426-9.
27. Persson K, Boman J. Comparison of five serologic tests for diagnosis of acute infections of *Chlamydia pneumoniae*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7: 739-44.
28. Saikku P. Diagnosis of *Chlamydia pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* 1998; 4: (4S)7-13.
29. Verkooyen RP, Willemse D, Hiep-van Casteren SC, et al. Evaluation of PCR, culture, and serology for diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* respiratory infections. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2301-7.
30. Von Hertzen L, Alakarppa H, Koskinen R, Liippo K, Surcel HM, Leinonen M. *Chlamydia pneumoniae* infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Epidemiol Infect* 1997; 118: 155-64.
31. Von Hertzen L, Leinonen M, Surcel HM, Karjalainen J, Saikku P. Measurement of sputum antibodies in the diagnosis of acute and chronic respiratory infections associated with *Chlamydia pneumoniae*. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; 2: 454-7.
32. Wang JH, Liu YC, Cheng DL, Yeng MY, Chen YS, Chen BC. Seroprevalence of *Chlamydia pneumoniae* in Taiwan. *Scand J Infect Dis* 1993; 25: 565-8.

### Giuseppe Miragliotta

Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Clinica Medica, Immunologia e Malattie Infettive, Università degli Studi di Bari, Piazza G. Cesare, 4 - 70124 BARI - Italy  
 Tel. +39 - 080.5478504  
 Fax +39 - 080.5478537  
 E-mail: [miragliotta@midim.uniba.it](mailto:miragliotta@midim.uniba.it)