

## REVIEW

## Serological diagnosis of *Chlamydia* infections: proposal of a cost-effective approach

**Gino Ciarrocchi**

SOD Laboratorio Analisi, SOS Sierologia - Policlinico Ospedali Riuniti - Ancona

### Serological diagnosis of *Chlamydia* infections: a proposal of a cost-effective approach

**Key-words:** Serodiagnosis, Antigens, ELISA, Sequelae

#### SUMMARY

Infections caused by genus *Chlamydia* are challenging for physicians, as a result of a complicated pathogenesis and a variable clinical picture. Furthermore, potential sequelae following *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci* infections are of clinical relevant interest.

Serodiagnosis is a clue tool when the direct antigen research or the bacteria fragments detection is impaired. Some serological tests such as the ELISA or the indirect micro-immunofluorescence methods are routinely performed. To improve the diagnostic efficiency of these tests, a selective coating of specie-specific reactive antigens on microwells or on microscopic slides is proposed. A highly selective coating is essential to generate a specific immune response for each *Chlamydia* species and high levels of distinct IgA, IgG, IgM antibody classes. The goal of serology is the diagnostic value of results, therefore the correct choice of the best screening and confirmation test is of extreme relevance due to the clinical impact of results for the therapeutical approach and management of acute and chronic infections.

In conclusion, a quantitative specific anti-*Chlamydia* IgG and IgA antibody detection is a useful method to improve the follow up of complicated chronic clinical sequelae.

Received March 12, 2007

Accepted May 31, 2007

#### INTRODUZIONE

Le infezioni umane causate dal genere *Chlamydia* costituiscono un insieme eterogeneo di affezioni di differente rilevanza ed espressività clinica. Tra le specie a cui viene a tutt'oggi assegnato un potenziale ruolo eziologico, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci* sono considerate con particolare interesse clinico. La diagnosi di laboratorio si basa su un insieme di ricerche multiparametriche mirate alla rilevazione del germe o sue parti costitutive e di anticorpi specifici. Proprio in riferimento alla complessità del quadro immunopatogenetico generato dall'infezione ed alla peculiarità biologica e immunologica di *Chlamydia*, occorre delineare un percorso diagnostico razionale, sollecitato dalla evidenza clinica. Le metodologie d'indagine messe in campo, le differenti preparazioni antigeniche, le classi anticorpali ricercate in prima diagnosi e la loro variazione quantitativa nel tempo, saranno quindi la risultante articolata di tali premesse.

Il diffuso e malcelato, quanto superficiale, scetticismo che aleggia intorno alla sierodiagnosi chla-

mydale è frutto di un retaggio di fraintendimenti tra quesiti clinici, talora incongrui, da una parte, e la scarsa accuratezza della performance di laboratorio, dall'altra. In tale contesto, "interpretare" un risultato può condurre ad esiti fuorvianti. Lo scopo dovrà essere invece la produzione di un report sierologico inequivocabile, che riveli l'effettivo stato dell'infezione. Tale evidenza può essere raggiunta solamente con l'impiego di test basati su antigeni selettivi e dominanti di ogni specie di *Chlamydia*, in grado di elicitare una risposta immune significante.

#### Immunopatogenesi e risposta immune

Gli elementi che entrano in gioco nella immunologia di *Chlamydia* sono legati al suo parassitismo intracellulare obbligato, alle componenti strutturali cellulari (fattori di virulenza), ma anche ai fattori cellulari dell'ospite, attivati per contrastare l'infezione (tabella 1).

In prevalenza, le infezioni acute meno severe si risolvono senza sequele; in altri casi l'infezione tende a progredire verso un processo infiammatorio cronico. Ben dimostrate sono le infiammazio-

**Corresponding author: Gino Ciarrocchi**

SOD laboratorio analisi, SOS Sierologia - Policlinico Ospedali Riuniti di Ancona - Via Conca, 71 - 60020 Torrette di Ancona  
Tel.: 071-5964251 - Fax: 071 5964638 - E-mail: [ciarrokki@libero.it](mailto:ciarrokki@libero.it)

ni persistenti da *Chlamydia psittaci* in uccelli e mammiferi; il linfogranuloma venereo ed il tracoma causati da sierotipi di *Chlamydia trachomatis*, responsabile anche di infertilità ed artriti reattive (12, 25); le infiammazioni croniche del polmone (BCPO, asma) ed il coinvolgimento nei processi aterosici di *Chlamydia pneumoniae* (8, 13).

Le differenti specie di *Chlamydia* hanno un accentuato tropismo per diversi tipi cellulari, *C. trachomatis* invade l'epitelio mucoso e i fagociti mononucleati; *C. pneumoniae* è capace di moltiplicarsi in monociti, macrofagi, cellule dell'endotelio vascolare, cellule muscolari lisce (8, 13). È stato dimostrato che essa induce la trasformazione dei macrofagi in cellule vischiose, prodromo dell'ateroma (8, 9). Da ciò deriva un facile accesso alla circolazione sistemica, con diffusione dei componenti cellulari batterici in siti corporei distanti. La presenza in circolo di anticorpi faciliterà altresì la formazione di immunocomplessi, capaci di mantenere persistenti le reazioni infiammatorie (13).

#### La risposta umorale

La risposta anticorpale più precoce avviene verso la tipica componente lipopolisaccaridica (LPS) della parete cellulare chlamydiale. Le proteine della membrana esterna (OMP) rivestono un ruolo immunogeno, in particolare il gruppo proteico MOMP (major outer membrane protein), quantitativamente il più rilevante, è altamente immunogeno nelle infezioni da *C. trachomatis*, ma molto meno nelle infezioni da *C. pneumoniae*. La proteina MOMP contiene epitopi specie-specifici, oltre a "domains" cross-reattivi, condivisi dalle altre specie chlamydiali.

#### La risposta cellulo-mediata

L'importanza della risposta immune cellulo-mediata è da porre in relazione al parassitismo intracellulare di *Chlamydia*, evidenziandosi sia negli aspetti di protezione biologica dell'ospite che in quelli distruttivi del germe. Essa viene coinvolta nelle infezioni insieme alla risposta umorale, ma il suo ruolo è predominante (11, 13, 22). Le cellule CD4+ sono attivate nell'infezione primaria producendo citochine attivanti altri linfociti; le CD8+ distruggono le cellule-target infette (13, 21).

Il meccanismo infiammatorio protratto conduce verso uno stato di ipersensibilità ritardata, responsabile delle successive sequele. Un ruolo importante è rivestito in tale contesto dalla cosiddetta heat shock protein (hsp60) chlamydiale attraverso un mimetismo antigenico con la hsp60 umana, verso la quale si attiva una reazione autoimmune (13).

Pari rilevanza è assunta dalle citochine: IFN- $\gamma$  delle cellule infettate è attivato per contrastare la replicazione di *Chlamydia*. In vitro è stato rison-

**Tabella 1.** Immunopatogenesi e risposta immune nell'infezione da *Chlamydia*

<b>Risposta umorale:</b> Anticorpi anti: LPS, MOMP, OMP	<b>Risposta cellulare:</b> induzione di IFN- $\gamma$ , IL-10, attivazione CD4, CD8 lisi cellule-target infette
<i>guarigione</i>	
<b>Infezione <i>Chlamydia</i></b>	
<i>infezione persistente-sequela</i> persistenza di <i>Chlamydia</i> in cellule-target; mimetismo antigenico di hsp60; forme aberranti danno tissutale	

trato che la persistenza dell'attivazione di IFN- $\gamma$  comporta induzione di indolamina-2-3-diossigenasi, la quale provoca degradazione del triptofano, essenziale per la crescita della cellula batterica (13, 22). Conseguenza di ciò sarà la generazione di forme replicative aberranti ed una infezione cronica persistente.

#### Caratteri degli antigeni di *Chlamydia* e sierodiagnosi

Il principale antigene immunodominante condiviso dal genere *Chlamydia* è il lipopolisaccaride (LPS) della parete cellulare; esso ha ridotta tossicità, diversamente dal LPS dei batteri Gram negativi. La risposta anticorpale a LPS è rapida e rilevante nelle infezioni acute da *C. pneumoniae* e *C. psittaci*; meno intensa quella generata da *C. trachomatis*, in assenza di coinvolgimento sistemico (11, 25). LPS chlamydiale è rilevabile anche nelle infezioni croniche da *C. pneumoniae*, per rilascio da macrofagi e cellule endoteliali (13). In pazienti con infarto miocardico è stata dimostrata una risposta anti-LPS chlamydiale; seguendo tale evidenza, una complessa relazione tra infezione da *C. pneumoniae* e patologie cardiovascolari è stata affermata in numerosi studi, con risultati peraltro non sempre conclusivi (13, 20).

Un altro gruppo di antigeni immunodominanti è costituito dalle proteine della membrana esterna (OMP), di cui la MOMP (major outer membrane protein) ricopre in quantità oltre la metà.

Il quadro degli antigeni proteici è molto complesso e studi dettagliati hanno rivelato risposte anticorpali difformi in relazione ai gruppi di popolazione studiati, alla diffusione epidemiologica dei ceppi batterici, nonché alla variabilità antigenica in differenti sierotipi (13).

Tra gli antigeni proteici immunodominanti di *C. trachomatis* citiamo anzitutto la MOMP, la quale contiene quattro gruppi principali di epitopi VD1, VD2, VD3, VD4 (variable domains) specie-specifici diversamente immunoreattivi (24); il

gruppo OMP2, costituito da due proteine difficilmente separabili, si è rivelato utile in sequele infiammatorie (3, 4, 12). Un altro gruppo di proteine denominato CRP (Cystein Rich Protein), appare diversamente reattivo impiegando la tecnica Immunoblotting (10). Sulla proteina hsp60 si continua molto a discutere, con particolare interesse circa il suo ruolo nel processo di cronicizzazione e nelle sequele post-infettive (3, 13).

Nelle infezioni da *C. pneumoniae* la proteina MOMP appare nel complesso meno reattiva che in *C. trachomatis* (12, 18) e c'è incertezza sui componenti cellulari che conferiscono la specie-specificità; alcuni studi suggeriscono un ruolo per la proteina 65 kDa; altre ricerche illustrano una forte risposta alla proteina 98 kDa; altri ancora hanno messo in evidenza una risposta immune rivolta alla proteina 54 kDa (13).

Mediante la tecnica di Immunoblotting si è scoperto che anticorpi di soggetti infetti sono variamente diretti contro molte strutture antigeniche, in maggioranza specie-specifiche. Infine, anche la struttura conformazionale degli epitopi e le differenze quantitative in isolati di *C. pneumoniae* contribuiscono alla complessità del pattern antigenico e di conseguenza alla qualità della risposta anticorpale.

**Aspettative dell'indagine sierologica**

Si è poco sopra accennato che alla base delle ricerche di laboratorio resta il quesito diagnostico posto dal clinico. Tale relazione clinica-laboratorio appare fondamentale in ordine all'efficacia del processo diagnostico. Dell'ampio arsenale metodologico disponibile si sceglieranno le indagini più appropriate in relazione alla specie chlamydiale coinvolta, siano esse dirette a dimostrare la presenza del germe (o sue componenti), ovvero ad evidenziare la comparsa di anticorpi specifici. In alcuni momenti del ciclo biologico-infettivo,

tuttavia, gli indicatori immunologici sono assenti o difficilmente dimostrabili (primo contatto con il germe, assente o debole risposta umorale sistemica). In tali casi il contributo diagnostico può provenire solo dalla ricerca diretta di chlamydia dai distretti corporei coinvolti, purché accessibili ad un affidabile campionamento.

Viceversa, in altri momenti dell'infezione l'agente eziologico sarà difficilmente rivelabile (ascensione di *C. trachomatis* all'epididimo nel maschio, alle salpingi nella femmina; scarsa carica batterica nelle mucose d'accesso e diffusione sistemica di *C. pneumoniae*). In tali contesti, solamente una forte risposta anticorpale potrà contribuire alla definizione di un pattern immunodiagnostico.

**La scelta dei test: indicazioni per un percorso razionale**

La sierodiagnosi nelle infezioni da *Chlamydia* si avvale oggi di un arsenale metodologico ampio, in grado di fornire report dirimenti nel significato immunologico e diagnostico. Tuttavia, da tali potenzialità è doveroso scegliere un iter analitico economicamente sostenibile, ma di elevata efficacia diagnostica. Avvalendoci di tali criteri, proviamo a delineare un percorso diagnostico distinto per singola specie chlamydiale, mettendone in evidenza qualità e limiti alla luce dei concetti sopra illustrati (tabella 2).

Le infezioni primarie da *Chlamydia* sono caratterizzate dalla reazione del sistema immunitario con comparsa di anticorpi specifici IgM (2-4 settimane), seguiti da IgG e IgA (4-6 settimane). Nelle reinfezioni non si riscontrano più anticorpi IgM (2, 6, 13, 14), mentre la produzione di IgG e IgA è rapida e intensa (16, 21, 22).

*Chlamydia trachomatis*

La tecnica di Fissazione del Complemento (RFC) fornì agli inizi degli studi su *Chlamydia* importan-

ti risultati, dovuti alla elevata sensibilità nelle infezioni primarie, in casi di linfogranuloma venereo (LGV) e di psittacosi (19, 15). Allo stato attuale delle conoscenze l'impiego di RFC dovrebbe essere limitato ad un primo approccio in infezioni acute non ben definite poiché gli anticorpi fissanti il complemento non sono più rilevabili nelle reinfezioni o nelle infezioni croniche; inoltre la RFC non permette la definizione delle classi anticorpali IgG, IgA, IgM. Quindi la ricerca di IgG, ma ancor più di IgA specifiche, seri-

**Tabella 2.** Antigeni e metodi impiegati nella ricerca quali/quantitativa di anticorpi anti-*C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*

	<i>C. trachomatis</i>	<i>C. pneumoniae</i>	<i>C. psittaci</i>
Infezione acuta I <sup>1</sup>	<b>EIA:</b> peptide sintetico specie-specifico da VD di MOMP. IgG e IgA in adulti.	<b>EIA:</b> quantitativo con EB purificati. IgA, IgG, IgM (diagnosi e follow-up) IgA secretorie locali (escreato)	<b>RFC:</b> Ig totali
Infezione corrente	<b>MIF:</b> test conferma IgM (neonato da madre infetta)	<b>MIF:</b> test conferma IgM	<b>MIF:</b> test conferma IgG e IgM
Infezione cronica	<b>EIA:</b> peptide sintetico specie-specifico da VD di MOMP. IgG e IgA in adulti.	<b>EIA:</b> quantitativo con EB purificati. IgA, IgG siero; IgA secretorie locali (escreato, secrezione bronchiale; I.pleurico)	<b>MIF:</b> titolo anticorpale IgG e IgA
Reinfezione	IgA secretorie locali (I.seminale; fluido cervicale)		

che o locali (secretorie), considerate marker di cronicizzazione o riacutizzazione, deve essere effettuata con diverse tecniche di laboratorio, basate su antigeni specifici come ad esempio nella tecnica ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

I primi test basati sul principio ELISA impiegavano estratti batterici ricchi in LPS, con ciò conducendo a risultati deludenti, a causa di cross-reazioni interspecifiche, ma una successiva generazione di test ha ridotto o eliminato tale inconveniente, permettendo di ottenere risultati ragguardevoli nella rivelazione di anticorpi verso le differenti specie chlamydiali (7).

Considerata l'elevata prevalenza nella popolazione adulta di anticorpi anti-*C. pneumoniae*, i test dovrebbero basarsi sull'impiego di antigeni ben caratterizzanti la specie *C. trachomatis*: un preparato antigenico riproducibile gli epitopi VD di MOMP specie-specifici sarebbe pressoché privo di interferenze e costituirebbe un punto fermo dirimente nella sierodiagnostica chlamydiale (2, 7, 19).

Le positività riscontrate mediante tali test ELISA ricevono la conferma dal test di microimmunofluorescenza (MIF), il quale impiega corpi elementari (EB) separati di ogni singola specie di *Chlamydia*, purificati su gradiente in soluzione di sacco vitellino e formalina e fissati su vetrino da microscopio. La tecnica MIF è a tutt'oggi considerata il "gold standard" sierologico (5). Occorre tuttavia osservare che i test MIF forniscono risultati semiquantitativi soggettivi, poiché legati alla esperienza dell'operatore, e variabili in relazione alla differente origine e preparazione degli spot antigenici fissati sul vetrino (5, 7, 17).

#### *Chlamydia psittaci*

Le infezioni da *C. psittaci* sono state studiate sierologicamente, prima del riconoscimento della nuova specie *C. pneumoniae*, con la tecnica RFC.

Con tale metodo, basato sull'uso di un ceppo LGV di *C. trachomatis* ricco in LPS, si ottenevano buoni risultati nelle infezioni acute, in cui l'evidenza clinico-anamnestica bene si associava al dato di laboratorio; per contro, retrospettivamente, si dimostrò che molte affezioni respiratorie attribuite a *C. psittaci* erano in realtà causate da *C. pneumoniae* (2, 13, 19). Inoltre, come sopra osservato, buona parte di cronicizzazioni rimanevano ignorate. Un corretto approccio può avvenire articolando l'impiego di RFC (anticorpi totali) e MIF per la ricerca di IgG, IgA, IgM anti-*C. psittaci* e *C. pneumoniae*, contestualmente, su campioni di siero in fase acuta e convalescente. Nella pratica clinica, si tende spesso a valutare il singolo dosaggio come definitivo, con la conseguenza di non poter apprezzare le potenzialità diagnostiche dei test.

#### *Chlamydia pneumoniae*

Dal momento dell'avvenuto riconoscimento di *C. pneumoniae*, nuovi test sierologici sono stati introdotti nella diagnostica clinica, ma con essi sono emerse anche nuove problematiche, riguardanti l'aspetto interpretativo dei risultati, il ruolo eziologico del germe e le sequele associate all'infezione. In popolazioni a bassa prevalenza di anticorpi anti-*C. trachomatis*, un test ELISA basato su un coating di EB interi e purificati di *C. pneumoniae* si è dimostrato molto utile ai fini diagnostici in infezioni acute primarie, in cui avviene una rapida comparsa di IgM e IgA specifiche, seguite dall'aumento di IgG nel siero (1, 2, 7, 14, 19). Con tale metodo sono stati ottenuti eccellenti risultati anche nelle reinfezioni, in cui IgM sono di raro riscontro, mentre intensa appare la produzione di IgG e, soprattutto di IgA, associate alle riaccensioni di malattia ed ai processi di cronicizzazione dell'infezione.

Un ancor più elevato livello di efficienza diagnostica si ottiene con l'impiego di test ELISA quan-

**Tabella 3.** Correlazione tra un metodo elisa quantitativo e un metodo MIF nella ricerca di IgG e IgA anti-*C. pneumoniae*

		N° campioni	MIF titolo (end point)	Correlazione (%)
*MIF: metodo di riferimento Antigene: EB purificati	Elisa quant IgG (n=620)	186	<1:64	97.3
		103	1:64	84.6
		134	1:128	73.1
		110	1:256	89.0
		87	>1:512	89.6
*Elisa Quant: metodo elisa quantitativo	Elisa quant IgA (n=598)	172	<1:32	92.4
		215	1:32	90.2
		98	1:64	85.7
		61	1:128	93.4
		52	>1:256	88.5

\*National Chlamydia Reference Center. Rabin medical center, Israel (2003)

titativi per la ricerca di IgG e IgA anti-*C. pneumoniae*, in ordine al monitoraggio dell'infezione nel tempo. Studi recenti hanno dimostrato grande concordanza dei risultati di tali test con i dati semiquantitativi ottenuti mediante la tecnica di riferimento MIF (7, 16), con ciò superando gli inconvenienti di manipolazione e soggettività legati alla metodologia con lettura microscopica (tabella 3).

Infine, la tecnica di Immunoblotting impiegata nella diagnostica chlamydiale può fornire preziose informazioni inerenti la variabilità immunologica individuale e quella epidemiologica dei ceppi batterici; essa non fornisce risultati quantitativi e non si adatta allo studio di serie numerose di campioni come richiede la pratica quotidiana, quindi deve essere inserita nel percorso diagnostico con lo scopo di dirimere casi clinici non ben definiti.

### Il futuro della sierologia

L'affinamento delle conoscenze dei processi immunopatogenetici che sottendono l'infezione chlamydiale ha reso disponibili nuove preparazioni antigeniche a scopo diagnostico, connotate da elevati livelli di specie-specificità. L'attuale arsenale diagnostico, dopo la scoperta di *C. pneumoniae*, ha rivoluzionato l'approccio di laboratorio e reso giustizia di antiche ed errate attribuzioni eziologiche. Ciò deve far riflettere criticamente i laboratori (e clinici) sulle scelte metodologiche da adottare nella sierodiagnosi clinica:

- i) impiegare antigeni selettivi per ogni specie di *Chlamydia*;
- ii) utilizzo di test immunometrici quantitativi, standardizzati ed eseguiti in completa automazione, per il monitoraggio di IgG e IgA nelle infezioni croniche "on going", unitamente alla ricerca di IgA specifiche in fluidi raccolti da siti corporei significativi;
- iii) auspicabile superamento del test di riferimento MIF, i cui risultati sono inficiati dalla componente soggettiva, con test in grado di rivelare marcatori inconfutabili dello stato infettivo, dalla univoca interpretazione.

In conclusione, la sierodiagnosi chlamydiale costituisce un prezioso strumento diagnostico, se razionalmente attivato; viceversa, esso può rivelarsi un'inutile e costosa perdita di risorse, qualora i postulati clinici e immunologici sopra delineati vengano semplicemente ignorati.

### BIBLIOGRAFIA

1. Blasi F, Tarsia P, Aliberti S, Cosentini R, Allegra L. *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae*. *Semin Respir Crit Care Med* 2005; 26 (6): 617-24.
2. Ciarrocchi G, De Benedetto F, Fogliani V, Magliano E, Del Prete R, Miragliotta G. Serological study on *Chlamydia pneumoniae* in patients with community-acquired pneumonia. *New Microbiol* 2004; 27 (4): 335-43.
3. Ciervo A, Visca P, Petrucca A, Biasucci LM, Maseri A, Cassone A. Antibodies to 60-kDa heat shock protein and outer membrane protein 2 of *Chlamydia pneumoniae* in patients with coronary heart disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9 (1): 66-74.
4. Cunningham AF, Ward ME. Characterization of human humoral responses to the major outer membrane protein (MOMP) and OMP2 of *Chlamydia pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* 2003; 227 (1): 73-9.
5. Dowell SF, Peeling W, Boman J, et al. Standardizing *Chlamydia pneumoniae* assays: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada). *Clin Infect Dis* 2001; 33: 492-503.
6. De Barbeyrac B, Obeniche F, Ratsima E, et al. Serological diagnosis of Chlamydiae and *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Ann Biol Clin (Paris)* 2006; 64 (5): 409-19.
7. Herman C, Gueinzus K, Oehme A, Aulock von S, Straube E, Hartung T. Comparison of quantitative and semiquantitative enzyme-linked immunosorbent assays for immunoglobulin G against *Chlamydia pneumoniae* to microimmunofluorescence test for use with patients with respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* 2004; 42 (6): 2476-9.
8. Kalayoglu MV, Byrne GI. Induction of macrophage foam cell formation by *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis* 1998; 177: 725-9.
9. Kaukoranta-Tolvanen SS, Laitinen K, Saikku P, Leinonen M. *Chlamydia pneumoniae* multiplies in human endothelial cells *in vitro*. *Microb Pathog* 1994; 16: 313-9.
10. Kawa DE, Schachter J, Stephens RS. Immune response to the *Chlamydia trachomatis* outer membrane protein PorB. *Vaccine* 2004; 22 (31-32): 4282-6.
11. Kelly KA. Cellular immunity and Chlamydia genital infection: induction, recruitment, and effector mechanisms. *Int Rev Immunol* 2003; 22 (1): 3-41.
12. Klein M, Kötz A, Bernardo K, Krönke M. Detection of *Chlamydia pneumoniae*-specific antibodies binding to the VD2 and VD3 regions of the major outer membrane protein. *J Clin Microbiol* 2003; 41 (5): 1957-62.
13. Leinonen M. Immunologia della *Chlamydia pneumoniae*. Mattiolo Ed - Fidenza 1999.
14. Miyashita N. *Chlamydia pneumoniae* infections. *Kekkaku* 2006; 81 (9): 581-8.
15. Mpiga P, Ravaoarino M. *Chlamydia trachomatis* persistence. An update. *Microbiol Res* 2006; 161 (1): 9-19.
16. Paldanius M, Bloigu A, Leinonen M, Saikku P. Measurement of *Chlamydia pneumoniae*-specific immunoglobulin A (IgA) antibodies by the microimmunofluorescence (MIF) method: comparison of seven fluorescein-labeled anti-human IgA conjugates in an in-house MIF test using one commercial MIF and one enzyme immunoassay kit. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10 (1): 8-12.
17. Peeling R, Wang SP, Grayston JT, et al. *Chlamydia pneumoniae* serology: interlaboratory variation in microimmunofluorescence assay results. *J Infect Dis* 2000; 181: S426-S9.
18. Penttilä T, Wahlstrom E, Vuola JM, Sarvas M,

- Puolakkainen M. Systemic and mucosal antibody response in experimental *Chlamydia pneumoniae* infection of mice. *Comp Med* 2006; 56 (4): 272-8.
19. Raymond J. *Chlamydiae* infections: diagnostic procedures. *Arch Pediatr* 2005; 12 Suppl 1: 42-4.
  20. Saikku P, Leinonen M, Tenkanen L, et al. Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *Ann Int Med* 1992; 116: 273-8.
  21. Stagg AJ, Elsley WA, Pickett MA, Ward ME, Knight SC. Primary human T-cell responses to the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Immunology*. 1993; 79: 1-9.
  22. Stephens RS. The cellular paradigm of chlamydial pathogenesis. *Trends Microbiol* 2003; 11 (1): 44-51.
  23. Sueur JM, Beaumont K, Cabioch T, Orfila J, Betsou F. Diagnostic value of an ELISA using a recombinant 54-kDa specie-specific protein from *Chlamydia pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12 (5): 470-7.
  24. Wang Y, Bereg EA, Feng X, et al. Identification of surface-exposed components of MOMP of *Chlamydia trachomatis* serovar F. *Protein Sci* 2006; 15 (1): 122-34.
  25. Witkin SS. Immunological aspects of genital *Chlamydia* infections. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2002; 16 (6): 865-74.

#### RINGRAZIAMENTI

*Un sentito ringraziamento è rivolto al Prof. Enrico Magliano per i suggerimenti e lo stimolo a proporre l'argomento.*