

RIDASCREEN[®] Chlamydophila pneumoniae

Art. n°: K2811 (IgA)
K2821 (IgG)
K2831 (IgM)



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Alemania
Telf.: +49 61 51 81 02-0 / Fax: +49 61 51 81 02-20



1. Área de aplicación

Para el diagnóstico *in vitro*. Los test RIDASCREEN® Chlamydomphila pneumoniae son enzimoimmunoensayos (EIA) para la identificación de anticuerpos IgA, IgG o IgM contra Chlamydomphila (C.) pneumoniae en el suero humano. Los test deben realizarse cuando existan sospechas fundadas de una infección con C. pneumoniae o para esclarecer el estatus del sistema inmunológico.

2. Resumen y explicación del test

En el grupo de las clamidias hay tres agentes patógenos humanos: La Chlamydia trachomatis, la Chlamydomphila psittaci y la Chlamydomphila pneumoniae.

Hasta hace pocos años se tenía la opinión que la Chlamydia pneumoniae era una subespecie de la Chlamydia psittaci. En el año 1989 se estableció la existencia de esta tercera especie de clamidia. Recientes investigaciones han conducido al establecimiento del género específico Chlamydomphila. En dependencia de los factores específicos del hospedero la Chlamydomphila pneumoniae puede provocar enfermedades agudas de las vías respiratorias superiores, bronquios y pulmones. Los resultados de las investigaciones permiten suponer la participación de la Chlamydomphila pneumoniae en el asma, enfermedades pulmonares y otras afecciones crónicas. La Chlamydomphila psittaci es un agente patógeno ampliamente extendido en pájaros y mamíferos. En el hombre aparece con rareza y causa generalmente afecciones respiratorias. Para el diagnóstico de una infección con C. pneumoniae se debe dar preferencia a la detección de anticuerpos. Mediante el empleo de antígenos de especies específicas COMP (COMP = complejos de las proteínas de la membrana externa) se identifican anticuerpos altamente específicos contra Chlamydomphila pneumoniae.

3. Fundamento del test

Los antígenos COMP purificados se encuentran unidos a la microplaca de titulación. Los anticuerpos presentes en muestras de suero de los pacientes se enlazan a los antígenos y son detectados en un segundo paso mediante un anticuerpo antihumano marcado con una enzima (conjugado). La enzima convierte el sustrato incoloro (H_2O_2/TMB) en un producto final azul. La reacción enzimática se termina mediante la adición de ácido sulfúrico. Así ocurre también de forma simultánea un cambio de color del azul al amarillo. Acto seguido se realiza la determinación en un fotómetro a 450 nm (longitud de onda de referencia ≥ 620 nm).

4. Contenido del envase

Tabla 1: Contenido del envase (Los reactivos de un envase alcanzan para 96 determinaciones)

			K2811 IgA	K2821 IgG	K2831 IgM
Plate	96 determ.	Microplaca de titulación; 12 tiras de microtitulación (separables) en marco de soporte; recubiertas con antígeno COMP de <i>C. pneumoniae</i>	X	X	X
Diluent	30 ml	Buffer de muestras, listo para el uso; Buffer de fosfato teñido de azul; contiene estabilizadores de proteína y Proclin	X	X	X
Wash	50 ml	Buffer de lavado, (concentrado 20 veces); Buffer de fosfato, contiene Tween 20 y Proclin	X	X	X
Control IgA +	250 µl	Control positivo IgA, suero humano; contiene Proclin	X		
Control IgG +	250 µl	Control positivo IgG, suero humano; contiene Proclin		X	
Control IgM +	250 µl	Control positivo IgM, suero humano; contiene Proclin			X
Control IgA -	250 µl	Control negativo IgA, suero humano; contiene Proclin	X		
Control IgG -	250 µl	Control negativo IgG, suero humano; contiene Proclin		X	
Control IgM -	250 µl	Control negativo IgM, suero humano; contiene Proclin			X
Cut Off IgA	250 µl	Control cut-off IgA, suero humano; contiene Proclin	X		
Cut Off IgG	250 µl	Control cut-off IgG, suero humano; contiene Proclin		X	
Cut Off IgM	250 µl	Control cut-off IgM, suero humano; contiene Proclin			X
Conjugate IgA	15 ml	Conjugado antihumano IgA (cabra), listo para el uso; Conjugado con peroxidasa Anticuerpos en solución buffer teñida de rojo, contiene Proclin	X		
Conjugate IgG	15 ml	Conjugado antihumano IgG (cabra), listo para el uso; Conjugado con peroxidasa Anticuerpos en solución buffer teñida de rojo, contiene Proclin		X	
Conjugate IgM	15 ml	Conjugado antihumano IgM (cabra), listo para el uso; Conjugado con peroxidasa Anticuerpos en solución buffer teñida de rojo, contiene Proclin			X
Substrate	15 ml	Sustrato H ₂ O ₂ /Tetrametilbenzidina; listo para el uso	X	X	X
Stop	15 ml	Reactivo de parada 1 N de ácido sulfúrico, listo para el uso	X	X	X

5. Reactivos y su almacenamiento

Este Kit, almacenado a una temperatura entre 2 y 8 °C, puede ser utilizado hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. El buffer de lavado diluido se puede conservar 4 semanas si se mantiene a 2 – 8 °C, o cinco días a temperatura ambiente (20 – 25 °C). Después de la fecha de caducidad no se asume ninguna garantía de calidad.

La bolsa de aluminio donde viene la microplaca se debe abrir de manera que el cierre a presión no sea eliminado. Las tiras de microtitulación no usadas se deben guardar de inmediato en la bolsa de aluminio cerrada y a temperaturas entre 2 – 8 °C.

Después de abierta la bolsa las tiras de microtitulación son estables durante tres meses si se conservan correctamente.

Se debe evitar la contaminación de los reactivos al igual que la incidencia directa de luz sobre el sustrato incoloro.

6. Reactivos adicionales necesarios – accesorios requeridos

6.1. Reactivos

- Agua destilada o desionizada
- RF-Absorbens (véase punto 9.3.)

6.2. Accesorios

- Incubadora o cámara húmeda a 37 °C
- Tubos de muestra
- Agitador Vortex
- Micropipetas para volúmenes de 10 – 100 µl y 100 – 1000 µl
- Probeta (1000 ml)
- Cronómetro
- Instrumento de lavado para las microplacas de titulación o pipeta multicanal
- Fotómetro para microplacas de titulación (450 nm, filtro de referencia ≥ 620 nm)
- Papel de filtro (paños de laboratorio)
- Recipiente de desechos con una solución de hipoclorito al 0,5 %

7. Medidas de seguridad

Sólo para el diagnóstico *in vitro*.

Este test debe ser realizado solamente por personal calificado de laboratorio. Se deben observar las líneas directivas de trabajo para laboratorios médicos. Las instrucciones para el uso del test deben cumplirse estrictamente.

No se debe pipetear las muestras o reactivos con la boca, así como también evitar el contacto con piel lesionada o mucosas. Durante el trabajo con las muestras deben usarse guantes desechables y lavar las manos después del test. En los locales donde se trabaje con las muestras o reactivos de prueba no está permitido fumar, comer o beber.

Los sueros de control del kit (controles positivo, negativo y de cut-off) fueron verificados y no contienen anticuerpos HIV ni HCV así como tampoco HBSAg. No obstante Ud. debe considerarlos, al igual que las muestras de pacientes y otros materiales con los cuales entre en contacto, como potencialmente infecciosos y manejarlos en correspondencia con las regulaciones de seguridad nacionales.

El peróxido de hidrógeno (sustrato) puede conducir a efectos cáusticos sobre la piel. ¡Manejar con cuidado! Si se produce contacto con la piel debe enjuagarse con agua.

El reactivo de parada contiene una solución 1 N de ácido sulfúrico ¡Evitar el contacto con la piel o ropa! Si se produce contacto con la piel debe enjuagarse con agua.

Todos los materiales y reactivos que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas se requiere que sean tratados con agentes desinfectantes adecuados o se sometan a autoclave por lo menos una hora a 121 °C. ATENCIÓN: Para evitar la formación de gases venenosos deben neutralizarse los residuos líquidos que contengan reactivo de parada antes de echarlos a la solución de hipoclorito.

8. Recolección y conservación de las muestras

El test fue desarrollado para el examen de muestras de suero humano. Después de la extracción de sangre se debe separar el suero lo antes posible de los coágulos para evitar la hemólisis. Las muestras se deben guardar en frío o congeladas hasta que se realice el test. Evite por todos los medios congelar y descongelar el suero varias veces, así como su contaminación microbiana. El empleo de muestras inactivadas por el calor, lipémicas, hemolíticas, ictéricas o turbias puede conducir a resultados falsos.

Tabla 2: Conservación de las muestras

Suero sin diluir		Suero diluido
2 – 8 °C	-20 °C	2 – 8 °C
1 semana	> 1 semana	7 horas

9. Realización del test

9.1. Generalidades

Antes de su uso se deben llevar todos los reactivos y las tiras de microtitulación a la temperatura ambiente (20 – 25 °C). Las tiras de microtitulación no se deben sacar de la bolsa de aluminio hasta que no hayan alcanzado la temperatura del ambiente. Los reactivos se deben mezclar bien inmediatamente antes de su empleo. Después de su uso se debe conservar inmediatamente el kit de prueba a la misma temperatura de 2 – 8 °C.

Se debe extraer solamente tanta cantidad de reactivo como sea necesaria para la realización del test. Las cantidades sobrantes de reactivo no se deben retornar a los frascos, ya que esto puede provocar una contaminación.

Las tiras de microtitulación sólo pueden ser utilizadas una vez. Los reactivos y las tiras de microtitulación no se deben usar cuando el envase esté dañado o los recipientes hayan perdido su hermeticidad.

El buffer de lavado y el de las muestras, así como sustrato y el reactivo de parada no son específicos del test; y pueden ser por tanto empleados también en los demás tests RIDASCREEN® EIA para la identificación de anticuerpos contra clamidias.

9.2. Preparación del buffer de lavado

Se mezcla 1 parte del buffer de lavado concentrado **Wash** con 19 partes de agua destilada. Con este fin se transfieren 50 ml del concentrado a una probeta de 1000 ml y se completa con agua destilada a 1000 ml. Los cristales que pudieran encontrarse en el buffer concentrado se deben solubilizar primeramente con calor (baño María a 37 °C). El buffer de lavado diluido se puede conservar 4 semanas si se mantiene entre 2 – 8 °C.

9.3. Preparación de las muestras

Las muestras de suero que se analizarán, así como los controles, se diluyen 1:21 con el buffer de muestras **Diluent** al comienzo del test. La dilución se realiza directamente en la microplaca. El control cut-off se debe realizar en determinación duplicada. Se utilizan los controles correspondientes (IgA, IgG, IgM) a cada determinación.

A1	Control negativo
B1	Control cut-off
C1	Control cut-off
D1	Control positivo
E1, F1	Suero de pacientes 1, 2, etc.

Después de introducir una cantidad suficiente de cavidades para los controles y las muestras en el marco de soporte se pipetea, en el caso de la determinación de IgG, 100 µl del buffer de muestras a cada pocillo de la microplaca y a continuación se adicionan 5 µl de muestra o control. Para obtener una buena mezcla se agita la microplaca brevemente:

100 µl Diluent + 5 µl suero o control

Para las determinaciones de IgA e IgM se someten las muestras en la microplaca a la absorción de IgG (por ej. con RIDA[®] RF-Absorbens, prod. n° Z0202) y entonces se ajusta a la dilución necesaria en el test. Al utilizar el RIDA[®] RF-Absorbens se debe proceder de la siguiente manera:

- 1) Transferir 50 µl de RIDA[®] RF-Absorbens a las cavidades de las muestras
- 2) Adicionar 5 µl de suero y mezclar

- 3) Aplicar 5 µl de los controles en las cavidades correspondientes
- 4) Agregar 100 µl de Diluent a los controles
- 5) Añadir 50 µl de Diluent a las muestras y mezclar

¡Atención!

Los controles no deben ser absorbidos.

9.4. Primera incubación

La microplaca se incuba 45 minutos a 37 °C en una incubadora o cámara húmeda. Cuide que el fondo de las cavidades no tenga contacto con materiales de buena transferencia calorífica (metal o papel húmedo). Se debe cubrir la microplaca durante la incubación.

¡Atención!

La microplaca de titulación no debe colocarse en una cámara de incubación que esté fría y sea calentada posteriormente a 37 °C. La cámara debe estar adaptada previamente a 37 °C.

9.5. Lavar

Las cavidades se deben vaciar a un recipiente de desechos con hipoclorito para la desinfección. Posteriormente se sacude la placa sobre un papel absorbente para eliminar los restos de humedad. Seguidamente se lava 5 veces con 300 µl de buffer de lavado en cada caso. Después de cada enjuague se cuida de vaciar completamente la placa sacudiéndola sobre partes secas y no usadas del papel.

Cuando se usen lavadores automáticos se debe poner atención al ajuste correcto del instrumento al tipo de microplaca utilizado. Después del último lavado se debe sacudir la placa cuidadosamente sobre papel absorbente limpio o paños de laboratorio para eliminar la humedad residual.

9.6. Segunda incubación

Adición de 100 µl de conjugado **Conjugate IgA**, **Conjugate IgG** o **Conjugate IgM** en los pocillos correspondientes. A continuación se incuba la microplaca 30 minutos a 37 °C (véase el punto 9.4.).

9.7. Lavar

Lavar 5 veces según el punto 9.5.

9.8. Tercera incubación

Añadir 100 µl de sustrato **Substrate** a cada uno de los pocillos. A continuación se cubre la placa y se incuba durante 20 min a temperatura ambiente (20 – 25 °C). Después se adicionan 50 µl de reactivo de parada **Stop** a cada una de las cavidades para detener la reacción. Se mezcla cuidadosamente (con ligeros golpes en los bordes de la placa) y se mide la absorbancia a 450 nm en un fotómetro lector de placas (longitud de onda de referencia ≥ 620 nm). La compensación del valor cero se hace contra aire. La medición se debe efectuar en un período de una hora después de la adición del reactivo de parada.

Atención :

Si se utiliza una cámara húmeda se debe pasar un paño por el fondo exterior de la microplaca antes de realizar la medición con el fin de eliminar agua condensada.

10. Control de calidad – Indicios de reactivos vencidos

Como control de calidad se deben incluir en cada test controles positivo, negativo y cut-off. El control cut-off se realiza por duplicado y se calcula el valor promedio a partir de las dos mediciones individuales. El test ha transcurrido correctamente si los valores de absorbancia (D.O.) de los controles cumplen los siguientes criterios:

Tabla 3: Criterios para el Control de Calidad

	D.O.
Control negativo	< 0,55
Control positivo	> 0,9
Control cut-off (promedio)	< 0,7 x D.O. del control positivo > 1,5 x D.O. del control negativo

Una desviación de los valores requeridos, lo mismo que una turbidez o coloración azul del sustrato antes de ser transferidos a las cavidades, puede ser un indicio del vencimiento de los reactivos.

Si los valores predefinidos no se cumplen, se deben verificar los siguientes puntos antes de repetir el análisis:

- Durabilidad de los reactivos empleados
- Funcionamiento correcto de los instrumentos utilizados (por ej. la calibración)
- Ejecución correcta del test
- Control visual de los componentes del kit con respecto a contaminación o pérdida de hermeticidad; una solución de sustrato azulada no se debe volver a usar.

Si al repetir la determinación se obtienen nuevamente valores incorrectos Ud. debe dirigirse al distribuidor local de R-Biopharm.

11. Evaluación e interpretación

11.1. Cálculo del Índice de las Muestras

1. El valor promedio de la absorbancia del control cut-off se calcula.
2. Dividiendo el valor de la absorbancia de la muestra por el valor promedio calculado se obtiene el Índice de las Muestras.

por ej.: Control cut-off 1 D.O. = 0,821
 Control cut-off 2 D.O. = 0,865
 Promedio = 0,843
 Muestra D.O. = 1,508

$$\text{Índice de las Muestras} = \frac{1,508}{0,843} = 1,79$$

11.2. Resultado del test

Tabla 4: Evaluación del Índice de las Muestras

IgA, IgG, IgM	negativo	valores límite	positivo
Índice de las Muestras	< 0,9	0,9 - 1,1	> 1,1

12. Limitaciones del método

Los RIDASCREEN® Chlamydomphila pneumoniae EIA identifican anticuerpos IgA, IgG e IgM contra C. pneumoniae con alta especificidad. No es posible a partir de este test deducir una relación entre la magnitud de un valor de absorbancia obtenido y la manifestación o gravedad de síntomas clínicos. El test no es apropiado para localizar el lugar de la infección. Los resultados obtenidos siempre deben interpretarse de conjunto con el cuadro clínico y las demás conclusiones diagnósticas (por ej. aislamiento del patógeno).

Un resultado negativo no excluye una infección ya que la extracción de sangre pudiera efectuarse en un momento tan temprano que los anticuerpos aún no fueran detectables. Si existe la sospecha clínica de una infección se debe repetir el test después de dos a tres semanas con un nuevo suero.

En general siempre en los exámenes serológicos se deben analizar paralelamente dos sueros sucesivos de un paciente para perfeccionar los resultados diagnósticos. El curso que ha seguido el análisis es importante para la interpretación del resultado.

La diseminación de una infección con C. pneumoniae en una población es muy alto. Por esta razón es frecuente identificar los anticuerpos. Sin embargo en la mayoría de los casos se trata de cantidades de anticuerpos relativamente pequeñas que están provocadas por infecciones anteriores.

En las infecciones primarias de C. pneumoniae se identifican regularmente anticuerpos IgM. Altos contenidos de IgG se encuentran presentes tres a seis semanas después del comienzo de la enfermedad. En caso de una reinfección por regla no se identifican anticuerpos IgM, y por el contrario los contenidos de anticuerpos IgA e IgG aumentan muy rápido.

Los resultados positivos de IgG en recién nacidos se deben interpretar con cuidado ya que podrían ser causados por anticuerpos de la madre. La detección de anticuerpos IgM en niños menores de seis meses es mucho más útil.

Debido a altos contenidos de IgG se pueden provocar resultados negativos falsos en las determinaciones de IgA e IgM. Además pueden ocurrir resultados positivos falsos en las

determinaciones de IgM a causa de factores reumatoides. Esto se puede evitar mediante la absorción de suero antes de la realización del test (véase punto 9.3.).

Los anticuerpos IgA se han descrito como un buen indicio de una infección crónica con *C. pneumoniae*.

Las reacciones cruzadas con anticuerpos contra *Chlamydomphila psittaci* no se investigaron debido a la baja prevalencia de esta enfermedad y a la falta de muestras positivas con el presente test.

El test no se validó con respecto a su idoneidad para el control terapéutico.

Un resultado positivo no excluye la presencia de otros agentes infecciosos como causa de esta enfermedad.

13. Características de rendimiento

Tabla 4: Coeficiente de Variabilidad en % de la Varianza Inter-Ensayos (n=10)

<u>Varianza inter-ensayos</u>	<u>IgA</u>	<u>IgG</u>	<u>IgM</u>
Control positivo	3,76%	3,07%	3,97%
Control negativo	18,19%	12,49%	13,29%
Control cut-off	7,88%	5,18%	5,59%

Tabla 5: Coeficiente de Variabilidad en % de la Varianza Intra-Ensayos (n=10)

<u>Varianza intra-ensayos</u>	<u>IgA</u>	<u>IgG</u>	<u>IgM</u>
Control positivo	2,93%	2,43%	1,56%
Control negativo	16,21%	11,60%	10,35%
Control cut-off	6,13%	4,27%	4,16%

Tabla 6: Sensibilidad y especificidad en comparación con el test de microinmunofluorescencia (MIF)

	Cantidad de muestras	Sensibilidad	Especificidad
IgA	100	97%	94%
IgG	178	100%	83%
IgM	61	91%	98%

Adicionalmente se examinaron 22 muestras de pacientes con el test IgG, las cuales estaban infectadas con *Chlamydia trachomatis*, *Rickettsia conorii* u otros patógenos que provocan cuadros clínicos semejantes a la *C. pneumoniae* (HSV-2, *L. pneumophila*, *C. burnetii*, *M. pneumoniae*). Con el test de IgA se examinaron 18 de estas muestras y con el test IgM 12 muestras, así como dos sueros positivos de factores reumatoides. No se demostraron reacciones cruzadas ni influencia en los resultados del ELISA en los sueros analizados.

Bibliografía

1. Berdal BP, Fields P., Melbye H. *Chlamydia pneumoniae* respiratory tract infection: the interpretation of high titres in the complement fixation test, Scand J Infect Dis, 1991; 23:305-307.
2. Almirall J., I. Morato, F. Riera, A. Verdaguer, R. Priu, P. Coll, J. Vidal, L. Murgui, F. Valls, F. Catalan, and X. Balanzó. 1993. Incidence of community-acquired pneumonia and *Chlamydia pneumoniae* infection: a prospective multicentre study. Eur Respir J 6: 14-8.
3. Bas, S., P. Muzzin, B. Ninet, J. E Bornand, C. Scieux, and T L. Vischer. 2001. Chlamydial serology: comparative diagnostic value of immunoblotting, microimmunofluorescence test, and immunoassays using different recombinant proteins as antigens. J Clin Microbiol 39: 1368-77.
4. Black, C. M., J. E. Johnson, C. E. Farshy, T. M. Brown, and B. P. Berdal. 1991. Antigenic variation among strains of *Chlamydia pneumoniae*. J Clin Microbiol 29:1312-6.
5. Ekman, M. R., M. Leinonen, H. Syrjala, E. Linnanmaki, P. Kujala, and P. Saikku. 1993. Evaluation of serological methods in the diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* during an epidemic in Finland. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 12:756-60.
6. Everet, K. D., R. M. Busch, and A. A. Andersen. 1999. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. Int J Syst Bacteriol 49 Pt 2:415-40.
7. Freidank, H. M., H. Vogele, and K. Eckert. 1997. Evaluation of a new commercial microimmunofluorescence test for detection of antibodies to *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, and *Chlamydia psittaci*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 16:685-8.
8. Gutierrez, J., J. Mendoza, F. Fernandez, J. Linares-Palomino, M. J. Soto, and M. C. Maroto. 2002. ELISA test to detect *Chlamydia pneumoniae* IgG. J Basic Microbiol 42:13-8.
9. Heiskanen-Kosma, T., M. Korppi, C. Jokinen, S. Kurki, L. Hieskanen, H. Jovonen, S. Kallinen, M. Sten, A. Tarkiainen, P.R. Ronnberg, M. Kleemola, P. H. Makela, and M. Leinonen. 1998. Etiology of childhood pneumonia: serologic results of a prospective, population-based study. Pediatr Infect Dis J 17:986-91.
10. Jauhihainen, T., T. Tuomi, M. Leinonen, J. D. Kark, and P. Saikku. 1994. Interference of immunoglobulin G (IgG) antibodies in IgA antibody determinations of *Chlamydia pneumoniae* by microimmunofluorescence test. J Clin Microbiol 32:839-40.
11. Kauppinen, M. and P. Saikku. 1995. Pneumoniae due to *Chlamydia pneumoniae*: prevalence, clinical features, diagnosis, and treatment. Clin Infect Dis 21 Suppl 3:S244-52.

12. Kuo, C. C., L. A. Jackson, L. A. Campbell, and J. T. Grayston. 1995. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). Clin Microbiol Rev 8:451-61.
13. Ladany, S., C. M. Black, C. E. Farshy, J. M. Ossewaarde, and R. C. Barnes. 1989. Enzyme immunoassay to determine exposure to *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR). J Clin Microbiol 27:2778-83.
14. Numazaki, K., T. Ikebe, and S. Chiba. 1996. Detection of serum antibodies against *Chlamydia pneumoniae* by ELISA. FEMS Immunol Med Microbiol 14:179-83.
15. Steinhoff, D., H. Lode, G. Ruckdeschel, B. Heidrich, A. Rolfs, F. J. Fehrenbach, H. Mauch, G. Hoffken, and J. Wagner. 1996. *Chlamydia pneumoniae* as a cause of community-acquired pneumonia in hospitalized patients in Berlin. Clin Infect Dis 22:958-64.
16. Thom, D. H., J. T. Grayston, L. A. Campbell, C. C. Kuo, V. K. Diwan, and S. P. Wang. 1994. Respiratory infection with *Chlamydia pneumoniae* in middle-aged and older adult outpatients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 13:785-92.