

cHSP60-IgG-ELISA medac

Deutsch/English/Français



HERSTELLER/MANUFACTURER/FABRICANT

medac

Gesellschaft für klinische
Spezialpräparate mbH
Fehlandtstraße 3
D-20354 Hamburg

VERTRIEB/MARKETING/DISTRIBUTION

medac

Gesellschaft für klinische
Spezialpräparate mbH
Geschäftseinheit Diagnostika
Theaterstraße 6
D-22880 Wedel

Telefon/Phone: ++49/ 4103 / 8006 - 347

Fax: ++49/ 4103 / 8006 - 359

**BESTELLADRESSE/ORDERING ADDRESS/
ADRESSE DE COMMANDE**

Telefon/Phone: ++49/ 4103 / 8006 - 111

Fax: ++49/ 4103 / 8006 - 113

Deutsch: S. 1
English: p. 16
Français: p. 30

Literatur/References/Littérature: S./p. 44

cHSP60-IgG-ELISA medac

Rekombinanter Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von
IgG-Antikörpern gegen chlamydiales Heat Shock Protein 60

Katalog-Nr.: 435

ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK

EINFÜHRUNG

Heat Shock Proteine (HSP) sind hochkonservierte zelluläre Stressproteine; ihre Aminosäurezusammensetzung hat sich im Verlauf der Evolution nicht wesentlich geändert und sie werden sowohl bei Prokaryonten als auch bei Eukaryonten in ausgeprägter Homologie exprimiert. So finden sich zwischen Mensch und Maus HSP-Homologien von 99,9 %, zwischen Mensch und Bakterien von ca. 60 %, zwischen Mensch und Chlamydien von ca. 50 % und zwischen den Chlamydienspezies von > 95 %.

Die Heat Shock Protein-Superfamilie beinhaltet verschiedene Familien, die anhand ihres Molekulargewichts klassifiziert werden: HSP10, HSP25 (alpha B-Crystallin), HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, HSP110. Die Mitglieder der HSP-Familien lassen sich in zwei Hauptgruppen einteilen: konstitutive Heat Shock Proteine (HSC) und induzierbare Heat Shock Proteine (HSP).

Die HSCs werden unter physiologischen Bedingungen permanent produziert und sind die intrazellulären "Ordnungshüter" auf molekularer Ebene, die für einen geregelten Ablauf von Anabolismus und Katabolismus sorgen.

Die HSPs werden von der Zelle rasch und ausgeprägt als Antwort auf verschiedenste physikalische und chemische Stress-Stimuli synthetisiert (Stressproteine), um gesteigerte Zellschutzfunktionen wahrzunehmen.

Mikrobielle HSPs stellen dominante Antigene dar und sind beim Menschen extrem immunogen. Während einer Infektion wird die Synthese mikrobieller HSPs (mHSPs) stark gesteigert, um sich vor den immunologischen Abwehrmechanismen des Wirts zu schützen. Dabei dominiert die Expression des mHSP60. Die der Primärinfektion folgende Immunität ist normalerweise auf mikrobenspezifische Epitope des mHSP60-Moleküls beschränkt.

Das chlamydiale HSP60 (cHSP60) ist eines der am intensivsten untersuchten mHSPs. Asymptomatische, nicht erkannte oder unzureichend behandelte Chlamydien-Infektionen bzw. Reinfektionen können zur chronischen Persistenz der Erreger führen. In diesem Stadium wird cHSP60 kontinuierlich überexprimiert, d.h., das menschliche Immunsystem muss sich dauerhaft mit diesem Fremdprotein auseinandersetzen. Es werden zelluläre und humorale Immunantworten eingeleitet. Des Weiteren wird das humane HSP60 (hHSP60) überexprimiert, um die menschlichen Zellen vor den chlamydialen Angriffen zu schützen. Die gegen die konservierten Abschnitte des cHSP60 gerichteten Antikörper können mit den konservierten Regionen des hHSP60 kreuzreagieren, was letztendlich zu Autoimmunreaktionen führen kann.

Eine Immunität gegen die konservierten Epitope des cHSP60 und parallel eine Kreuzimmunität gegen hHSP60 mit daraus resultierender möglicher Autoimmunität ist ohne gezielten, standardisierten Nachweis nicht erkennbar.

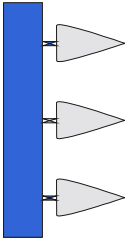
Viele Spätfolgen von Chlamydieninfektionen werden mit cHSP60-induzierten Autoimmunreaktionen in Verbindung gebracht; gestörter Schwangerschaftsverlauf, vorzeitige Wehentätigkeit, habituelle und Spontanaborte, ektope Schwangerschaft, Tubenfaktor-Infertilität (TFI) und erfolglose *In vitro*-Fertilisierung (IVF).

Andere Autoimmunerkrankungen, wie reaktive Arthritiden, bestimmte Asthmaformen, sowie Arteriosklerose und koronare Herzerkrankungen als mögliche Autoimmunerkrankungen, werden als Folge von Sensibilisierungsprozessen gegen HSP60 teilweise widersprüchlich diskutiert. Die unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich unter anderem darauf zurückführen, dass für die Untersuchungen verschiedenste, nicht standardisierte In-house Tests eingesetzt werden, die keine unmittelbaren Vergleiche zulassen. Ein standardisierter, reproduzierbarer, objektiver Test ist notwendig, um anhand vergleichbarer Ergebnisse eindeutige Schlussfolgerungen für die einzelnen Krankheitsbilder ziehen zu können.

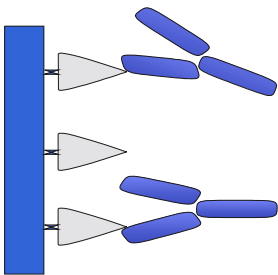
Der cHSP60-IgG-ELISA medac verwendet rekombinantes Heat Shock Protein 60 aus *Chlamydia trachomatis* als Antigen. Er ist zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen HSP60 aus *Chlamydia trachomatis* geeignet. Trotz der hohen Homologie zwischen den Chlamydienspezies von >95 % auf Proteinebene scheint er überwiegend Antikörper zu erfassen, die gegen HSP60 von *Chlamydia trachomatis* gerichtet sind.

Der cHSP60-IgG-ELISA medac sollte zur Diagnostik des Tubenstatus im Vorfeld der *In vitro*-Fertilisierung eingesetzt werden. In Kombination mit der *Chlamydia trachomatis*-spezifischen MOMP-Serologie von medac stellt er einen zusätzlichen Marker zur Erkennung von *Chlamydia trachomatis*-induzierten Tubenschädigungen dar.

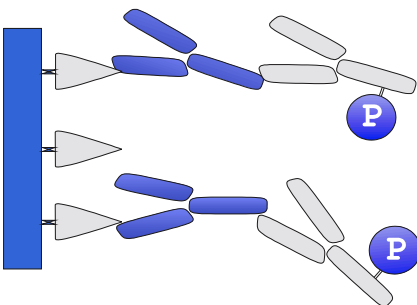
TESTPRINZIP



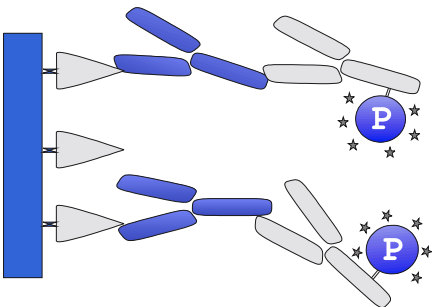
Mit rekombinantem Heat Shock Protein 60 (HSP60) aus *Chlamydia trachomatis* beschichtete Mikrotiterplatte.



Die gegen cHSP60 gerichteten Antikörper aus dem Patientenserum werden an das Antigen gebunden.



Das Peroxidase-gekoppelte Anti-Human-IgG bindet an die IgG-Antikörper (P = Peroxidase).



Inkubation mit TMB-Substrat (*). Stoppen der Reaktion mit Schwefelsäure. Die Auswertung erfolgt photometrisch.

Testvorteile

- ☞ Rekombinantes cHSP60 als Antigen.
- ☞ Die brechbaren Mikrotiterstreifen gewährleisten eine optimale Testauslastung.
- ☞ Automatisierbar auf offenen ELISA-Gerätesystemen.

PACKUNGSIHALT

KAT.-NR.: 435

1.

MTP

Mikrotiterplatte: 12 Teststreifen à 8 Vertiefungen (mit Halterahmen und Trockenmittelpappe im Aluminiumbeutel vakuumverschweißt), brechbar, Rundboden, beschichtet mit rekombinantem Heat Shock Protein 60 aus *Chlamydia trachomatis* und FKS, gebrauchsfertig.
2.

CONTROL	-
----------------	----------

Negative Kontrolle: 1 Fläschchen à 1,5 ml, humanes Serum, gebrauchsfertig, blau gefärbt, enthält NBCS, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
3.

CONTROL	+
----------------	----------

Positive Kontrolle: 1 Fläschchen à 1,5 ml, humanes Serum, gebrauchsfertig, blau gefärbt, enthält BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
4.

WB

Waschpuffer: 1 Flasche à 100 ml, PBS/Tween (10x), pH 7,2 - 7,4, enthält ProClin™ 300.
5.

BAC-DIL

Probenverdünnungspuffer: 1 Flasche à 110 ml, PBS/Tween/NBCS, pH 7,0 - 7,2, gebrauchsfertig, blau gefärbt, enthält ProClin™ 300.
6.

CON

Konjugat: 3 Fläschchen à 4,5 ml, Ziege-Anti-Human-IgG-Antikörper, HRP-konjugiert, gebrauchsfertig, grün gefärbt, enthält BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
7.

TMB

TMB-Substrat: 1 Fläschchen à 10 ml, gebrauchsfertig.
8.

STOP

Stopplösung: 2 Fläschchen à 11 ml, 0,5 M Schwefelsäure (H₂SO₄), gebrauchsfertig.

1. LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Material/Reagenz	Zustand	Lagerung	Haltbarkeit
Testkit	ungeöffnet	2 - 8 °C	bis Verfalldatum
Mikrotiterplatte	geöffnet	2 - 8 °C im Beutel mit Trockenmittelpappe	12 Wochen
Kontrollen	geöffnet	2 - 8 °C	12 Wochen
Waschpuffer	verdünnt	2 - 8 °C	12 Wochen
Probenverdünnungspuffer	geöffnet	2 - 8 °C	12 Wochen
Konjugat	geöffnet	2 - 8 °C	12 Wochen
TMB-Substrat	geöffnet	2 - 8 °C	12 Wochen
Stopplösung	geöffnet	2 - 8 °C	bis Verfalldatum

Die Reagenzien sind nach Ablauf des angegebenen Verfalldatums nicht mehr zu verwenden.

2. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

- 2.1. Aqua ad iniectabilia (H₂O bidest.). Die Verwendung von entionisiertem Wasser kann zu Störungen im Testsystem führen.
- 2.2. Mikroliterpipetten für entsprechende Volumina.
- 2.3. Saubere Glas- oder Kunststoffgefäße zum Verdünnen von Waschpuffer und Proben.
- 2.4. Geeignete Vorrichtung zum Waschen der Mikrotiterplatte (z.B. Multistepper oder ELISA-Waschgerät).
- 2.5. Inkubator für 37 °C.
- 2.6. Mikrotiterplatten-Photometer mit Filtern für 450 nm und 620 - 650 nm.

3. ANSETZEN DER REAGENZIEN

Alle Kitkomponenten müssen vor Testansatz auf Raumtemperatur gebracht werden.

Ermitteln Sie die Anzahl der benötigten Mikrotitervertiefungen.

3.1. Mikrotiterplatte

Der Aluminiumbeutel muß nach jeder Entnahme von Mikrotitervertiefungen zusammen mit der Trockenmittelpappe wieder fest verschlossen werden. Lagerung und Haltbarkeit der nicht verwendeten Mikrotitervertiefungen siehe Punkt 1.

3.2. Waschpuffer

1 Teil Waschpuffer (10x) wird mit 9 Teilen Aqua ad iniectabilia angesetzt (z.B. 50 ml Waschpuffer (10x) mit 450 ml Aqua ad iniectabilia). Für acht Vertiefungen werden 10 ml Waschpuffer benötigt.

Evtl. im Waschpuffer (10x) vorhandene Kristalle sind vor dem Ansetzen durch Erwärmen (max. 37 °C) und/oder Rühren bei RT in Lösung zu bringen.

Die testspezifischen Reagenzien (Mikrotiterplatte, Kontrollen, Konjugat) sind nicht mit denen anderer Chargen zu mischen.

Im Gegensatz dazu sind Probenverdünnungspuffer, Waschpuffer, TMB-Substrat und Stopplösung für alle Chlamydia- und Mycoplasma-ELISA medac grundsätzlich austauschbar.

Reagenzien anderer Hersteller sind generell nicht einzusetzen.

Nur bei exakter Einhaltung der Arbeitsvorschrift werden valide und reproduzierbare Ergebnisse erhalten.

4. UNTERSUCHUNGSMATERIAL

4.1. Der Test ist geeignet zur Untersuchung von Serum.

4.2. Eine Vorbehandlung der Seren, wie z. B. Inaktivierung, ist nicht erforderlich, sie sollten jedoch nicht mikrobiell kontaminiert und frei von Humanerythrocyten sein.

4.3. Die Seren werden 1:50 mit Probenverdünnungspuffer verdünnt.

5.A. ARBEITSVORSCHRIFT

5.1. Die Verpackung der Mikrotiterplatte am ZIP-Verschluß öffnen und die erforderliche Anzahl Mikrotitervertiefungen entnehmen (s.3.1.).

Die Mikrotitervertiefungen sind gebrauchsfertig und müssen nicht vorgewaschen werden.

5.2. Für die Ermittlung des Leerwertes in die Vertiefung A1 50 µl Probenverdünnungspuffer pipettieren (s. 6.A.). Anschließend in Doppelbestimmung jeweils 50 µl negative Kontrolle, dann in Einfachbestimmung die positive Kontrolle (50 µl), sowie fortlaufend auch in Einfachbestimmung die verdünnten Patientenproben (50 µl) pipettieren.

Ggf. kann die Platte bis zur weiteren Bearbeitung in einer feuchten Kammer für maximal 30 min bei RT gelagert werden.

- 5.3. Die Mikrotitervertiefungen 60 min (± 5 min) bei 37 °C (± 1 °C) inkubieren (feuchte Kammer oder mit Folie abgeklebt).
- 5.4. Nach Inkubation die Mikrotitervertiefungen dreimal mit jeweils 200 μ l Waschpuffer waschen. Darauf achten, daß alle Vertiefungen beim Waschen gefüllt werden. Nach Beendigung des Waschvorganges Mikrotitervertiefungen auf Filterpapier ausklopfen.

Nicht austrocknen lassen! Umgehend weiterverwenden!

- 5.5. Konjugat (grün gefärbt) in alle Vertiefungen pipettieren.

Beim manuellen Abarbeiten des Tests werden 50 μ l Konjugat pro Vertiefung pipettiert.

Bitte beachten:

Beim Arbeiten mit automatisierten Gerätesystemen ist auf Grund der höheren Verdunstung in den Inkubationskammern die Zugabe von 60 μ l Konjugat pro Vertiefung zu programmieren.

Die grundsätzliche Eignung des Testes für die automatisierte Abarbeitung konnte im Rahmen der Validierung gezeigt werden. Dennoch empfehlen wir, die Kompatibilität mit dem zum Einsatz kommenden Gerätesystem zu verifizieren.

- 5.6. Erneut 60 min (± 5 min) bei 37 °C (± 1 °C) inkubieren (feuchte Kammer oder mit Folie abgeklebt).
- 5.7. Nach Inkubation die Mikrotitervertiefungen erneut waschen (s. 5.4.).
- 5.8. 50 μ l TMB-Substrat in jede Vertiefung pipettieren und 30 min (± 2 min) bei 37 °C (± 1 °C) im Dunkeln inkubieren (feuchte Kammer oder mit Folie abgeklebt). Positive Proben erscheinen blau gefärbt.
- 5.9. Durch Zugabe von 100 μ l Stopplösung in jede Vertiefung wird die Reaktion gestoppt. Es erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb.

Mikrotitervertiefungen vor photometrischer Messung von unten abwischen und darauf achten, daß keine Luftblasen in den Vertiefungen vorhanden sind!

Die Messung ist innerhalb von 15 min nach dem Stoppen durchzuführen!

5.B. TABELLE ZUR ARBEITSVORSCHRIFT

	Leerwert (A1)	Negative Kontrolle	Positive Kontrolle	Probe
Probenverdünnungspuffer	50 µl	-	-	-
Negative Kontrolle	-	50 µl	-	-
Positive Kontrolle	-	-	50 µl	-
Probe	-	-	-	50 µl
60 min bei 37 °C inkubieren, 3 x mit 200 µl Waschpuffer waschen				
Konjugat	50/60 µl *)	50/60 µl *)	50/60 µl *)	50/60 µl *)
60 min bei 37 °C inkubieren, 3 x mit 200 µl Waschpuffer waschen				
TMB-Substrat	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubieren				
Stopplösung	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Photometrische Auswertung bei 450 nm (Ref. 620 - 650 nm)				

*) manuelle/automatisierte Abarbeitung (s. 5.5.)

6.A. TESTBEURTEILUNG (VALIDITÄT)

- * Die photometrische Auswertung erfolgt bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 620-650 nm).
- * Die OD des Leerwertes (Vertiefung A1) wird von allen OD-Werten subtrahiert.
- * Der OD-Wert des Leerwertes muß < **0,100** betragen.
- * Der OD-Mittelwert der **negativen Kontrolle** muß < **0,100** betragen.
- * Der OD-Wert der **positiven Kontrolle** muß > **0,800** betragen.
- * **Cut-off = OD-Mittelwert der negativen Kontrolle + 0,350**
- * **Grenzbereich = Cut-off ± 10 %**

Sind die genannten Validitätskriterien nicht erfüllt, muß der Test wiederholt werden!

6.B. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

6.B.1. QUALITATIV

Ergebnis	Bewertung
OD < Grenzbereich	negativ
OD des Cut-off +/- 10 %	grenzwertig
OD > Grenzbereich	positiv

6.B.2. SEMI-QUANTITATIV

Cut-off-Index: $\frac{\text{OD der Probe}}{\text{OD des Cut-off}}$	Bewertung
< 0,9	negativ
0,9 - 1,1	grenzwertig
> 1,1	positiv

6.B.3. QUANTITATIV

Der **Endtiter** (= letzte positive oder grenzwertige Verdünnung) jeder Probe kann ermittelt werden.

In jedem Fall wird zuerst der Cut-off-Index berechnet.

$$\text{Cut-off-Index} = \frac{\text{OD der Probe}}{\text{Cut-off}}$$

Anschliessend ist die Bestimmung des Endtiters auf zwei Wegen möglich:

1. $1 : \text{Endtiter} = 55,5 \times (\text{OD}/\text{Cut-off})$

Das Ergebnis ist auf die nächste ganze Titerstufe abzurunden, d.h., auf 1:50, 1:100, 1:200, etc.

Diese Berechnung gilt für OD-Werte $\leq 2,0$. Proben mit OD-Werten $> 2,0$ sollten erneut in einer höheren Ausgangsverdünnung (z.B. 1:400) gemessen werden.

Ist eine höhere Ausgangsverdünnung als 1:50 eingesetzt worden, muss die obige Berechnungsformel mit dem entsprechend grösseren Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

Beispiel: Eingesetzte Serumverdünnung 1:400, d.h. 8-fach höhere Ausgangsverdünnung.

OD = 1,78

Cut-off = 0,42

1 : Endtiter = $55,5 \times (1,78/0,42) \times 8 = 1882 \Rightarrow$ **1:1600**

2. Der zum Cut-off-Index korrespondierende Titer kann auch der folgenden Tabelle entnommen werden.

Cut-off-Index	IgG	
	Ergebnis	Titer
<0,90	Negativ	<1:50
0,90 - 1,10	Graubereich	
1,11 - 1,80	Positiv	1:50
1,81 - 3,60	Positiv	1:100
3,61 - 7,20	Positiv	1:200

Diese Berechnung gilt nur für OD-Werte $\leq 2,0$; ansonsten siehe oben genanntes Beispiel.

- * Werte im Grenzbereich sollten kontrolliert werden, indem nach 14 Tagen eine zusätzliche Patientenprobe entnommen wird, die zusammen mit der ersten Probe auf eine Titerbewegung untersucht wird.
- * Die Testergebnisse sollten stets in Verbindung mit anti-**C. trachomatis**-IgG- und -IgA-Antikörpern (pELISA medac) und im Zusammenhang mit dem klinischen Bild der Patienten und weiteren diagnostischen Parametern interpretiert werden.
- * Hohe Hämoglobin-, Bilirubin- und Lipidkonzentrationen im Serum beeinflussen die Testergebnisse nicht.
- * Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen andere mikrobielle HSP60 sind nicht auszuschließen.

6.C. SPEZIFISCHE INTERPRETATION

Mögliche Ergebnisse			Interpretation
pELISA		cHSP60	
IgG	IgA	IgG	
+	+	+	Hohe Wahrscheinlichkeit einer <i>C. trachomatis</i> -induzierten TFI.
+	-	+	
+	+	-	Hinweis auf eine <i>C. trachomatis</i> -Infektion.
+	-	-	Hinweis auf eine zurückliegende <i>C. trachomatis</i> -Infektion.
-	-	+	Kein serologischer Hinweis auf eine <i>C. trachomatis</i> -Infektion; Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen HSP60 anderer Bakterien möglich.
-	-	-	Kein serologischer Hinweis auf eine <i>C. trachomatis</i> -Infektion.

7. LEISTUNGSMERKMALE

Die nachfolgenden Leistungsmerkmale wurden von uns im Rahmen der Validierung ermittelt.

7.A. PRÄVALENZEN

In verschiedenen Probandengruppen (Gesunde und Patientenkollektive) wurden folgende cHSP60-IgG-Antikörperprävalenzen ermittelt:

Probandengruppe	cHSP60-IgG-Prävalenz
Blutspender	14 % (n=100)
Patientinnen mit Fertilitätsproblemen	59 % (n=73)
Patienten mit rheumatischen Erkrankungen	64 % (n=44)
Patienten mit koronaren Herz-erkrankungen	18 % (n=44)

7.B. KLINISCH-DIAGNOSTISCHE WERTIGKEIT

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die cHSP60-Serologie in Kombination mit der *C. trachomatis*-spezifischen MOMP-Serologie (pELISA medac) einen zusätzlichen Marker zur Erkennung von *Chlamydia trachomatis*-induzierten Tubenschädigungen darstellt.

7.B.1. SENSITIVITÄTEN UND POSITIVE PRÄDIKTIVE WERTE (PPV) BEZOGEN AUF TUBENVERSCHLUSS

Autoren: Den Hartog J et. al. (2003) Kollektive: IVF-Patientinnen mit (n=59) und ohne (n=254) distale Tubenpathologie (DTP)	Positive Antikörper-Nachweise	DTP-vorhanden (n=59))	Sens. (%)	PPV (%)
	<i>C. trachomatis</i> -IgG	32/59 (54 %)	54 %	61 %
	cHSP60-IgG	30/59 (51 %)	51 %	44 %
	<i>C. trach.</i> - und cHSP60-IgG	28/59 (47 %)	47 %	68 %
Autoren: Clad et al. (2004) Kollektive: IVF-Patientinnen mit offenen (n=102) und verschlossenen Tuben (n=24)	Positive Antikörper-Nachweise	TFI-positiv (n=24)	Sens. (%)	PPV (%)
	<i>C. trachomatis</i> -IgG	21/24 (87,5 %)	87,5 %	54 %
	cHSP60-IgG	19/24 (79 %)	79 %	39 %
	<i>C. trach.</i> - und cHSP60-IgG	19/24 (79 %)	79 %	63 %
Autoren: Surcel et al. (2004) Kollektive: IVF-Patientinnen mit verschlossenen Tuben n=88) und Blutspender (n=163)	Positive Antikörper-Nachweise	TFI-positiv (n=88)	Sens. (%)	PPV (%)
	<i>C. trachomatis</i> -IgG	38/88 (43 %)	43 %	63 %
	cHSP60-IgG	52/88 (59 %)	59 %	59 %
	<i>C. trach.</i> - und cHSP60-IgG	30/88 (34 %)	34 %	70 %

7.B.2. SPEZIFITÄTEN UND NEGATIVE PRÄDIKTIVE WERTE (NPV) BEZUGEN AUF OFFENE TUBEN

Autoren: Den Hartog J et. al. (2003) Kollektive: IVF-Patientinnen mit (n=59) und ohne (n=254) distale Tubenpathologie (DTP)	Negative Antikörper- Nachweise	DTP- fehlend (n=254)	Spez. (%)	NPV (%)
	C. trachomatis- IgG	234/254 (92 %)	92 %	90 %
	cHSP60-IgG	216/254 (85 %)	85 %	88 %
	C. trach. - und cHSP60-IgG	241/254 (95 %)	95 %	89 %
Autoren: Clad et al. (2004) Kollektive: IVF-Patientinnen mit offe- nen (n=102) und verschlos- senen Tuben (n=24)	Negative Antikörper- Nachweise	TFI fehlend (n=102)	Spez. (%)	NPV (%)
	C. trachomatis- IgG	84/102 (82 %)	82 %	97 %
	cHSP60-IgG	72/102 (71 %)	71 %	94 %
	C. trach. - und cHSP60-IgG	91/102 (89 %)	89 %	95 %
Autoren: Surcel et al. (2004) Kollektive: IVF-Patientinnen mit ver- schlossenen Tuben n=88)und Blutspender (n=163)	Negative Antikörper- Nachweise	TFI- fehlend (n=163)	Spez. (%)	NPV (%)
	C. trachomatis- IgG	141/163 (87 %)	87 %	74 %
	cHSP60-IgG	127/163 (78 %)	78 %	78 %
	C. trach. - und cHSP60-IgG	150/163 (92 %)	92 %	72 %

7.C. PRÄZISION

Probe	Intraassay-Varianz (n=22)			Probe	Interassay-Varianz (n=11)		
	Ø OD	S	VK (%)		Ø OD	S	VK (%)
NK	0,053	0,006	11,0	NK	0,045	0,009	19,1
GW	0,683	0,023	3,3	GW	0,649	0,033	5,0
PK	1,324	0,057	4,3	PK	1,293	0,083	6,4
Nr. 1	0,067	0,003	4,4	Nr. 4	0,090	0,021	22,8
Nr. 2	0,653	0,013	1,9	Nr. 5	1,047	0,087	8,3
Nr. 3	1,305	0,047	3,6	Nr. 6	1,310	0,113	8,7
				Nr. 7	1,657	0,087	5,2

NK = negative Kontrolle; GW = schwach positive Kontrolle (im Kit nicht enthalten);
PK = positive Kontrolle

ALLGEMEINE HANDHABUNGSHINWEISE

- * Reagenzienflaschen und deren Verschlüsse nicht vertauschen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.
- * Sofort nach Gebrauch die Reagenzflaschen wieder fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- * Nach Gebrauch sind die Reagenzien sofort wieder, entsprechend den vorgeschriebenen Lagerungsbedingungen, zu lagern, um die angegebene Haltbarkeit zu gewährleisten.
- * Um Verwechslungen mit Reagenzien anderer Testsysteme oder Chargen zu vermeiden, sollten alle Kitkomponenten einer Testpackung nach dem Gebrauch zusammen in der Originalpackung gelagert werden (siehe auch 3.).

SICHERHEITSHINWEISE

- * Die national verbindlichen Arbeitsschutzvorschriften sind zu beachten.
- * Die Reagenzien humanen Ursprungs wurden auf HBsAg, Anti-HIV 1/2 und Anti-HCV untersucht und für nicht reaktiv befunden. Dennoch sollten diese Reagenzien, wie auch jene, die Bestandteile tierischer Herkunft enthalten (siehe Packungsinhalt), als potentiell infektiös behandelt werden, um das Risiko einer Ansteckung zu vermeiden.

ENTSORGUNGSHINWEISE

Die in diesem Produkt enthaltenen Chemikalien und Zubereitungen sowie die bei der Anwendung dieses Produktes anfallenden Reste sind in der Regel Abfälle, die einer ordnungsgemäßen Entsorgung zugeführt werden müssen.

Die Entsorgung solcher Abfälle unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde oder Abfallbeseitigungsunternehmen informieren über die Entsorgung von Sonderabfällen.

Ausgabedatum: 06.03.2008

cHSP60-IgG-ELISA medac

Recombinant enzyme immunoassay for the quantitative detection of
IgG antibodies to chlamydial heat shock protein 60

Cat. no.: 435

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY

INTRODUCTION

Heat shock proteins (HSPs) are highly conserved cellular stress proteins; their amino acid composition has not changed very much during evolution and they are expressed in both procaryotes and eucaryotes with pronounced homology. Thus, between men and mice HSP homologies of 99.9 % were found, between men and bacteria of about 60 %, between men and chlamydiae of about 50 %, and between the chlamydia species of > 95 %.

The heat shock protein superfamily includes various families which are classified according to their molecular weight: HSP10, HSP25 (alpha B-crystallin), HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, HSP110. The members of the HSP families are divided into two main groups: the constitutive heat shock proteins (HSC) and the inducible heat shock proteins (HSP).

Under physiological conditions the HSCs are permanently produced; they are the intracellular chaperones on molecular level which are responsible for well-regulated courses of anabolism and catabolism.

The HSPs (stress proteins) are rapidly and distinctly synthesized by the cell in response to various physical and chemical stress stimuli in order to take on increased functions with regard to cell protection.

Microbial HSPs (mHSPs) are dominant antigens and in humans extremely immunogenic. During an infection the microbes strongly increase their mHSP synthesis in order to protect themselves from the host's immunological defense mechanisms. In this connection mHSP60 becomes one of the most predominant bacterial proteins. The immunity which follows such primary infections is normally restricted to microbe-specific epitopes of the mHSP60 molecule.

The chlamydial heat shock protein 60 (cHSP60) is one of the most intensively investigated mHSPs. Asymptomatic, not recognized or insufficiently treated chlamydial infections may lead to chronic persistence

of the pathogens. At this stage cHSP60 is continuously overexpressed, i.e., the human immune system permanently has to deal with this foreign protein. Cellular and humoral immune responses are induced. Furthermore, the human HSP60 (hHSP60) is also overexpressed in order to protect the human cells from the chlamydial attacks. The antibodies that are directed towards the conserved epitopes of the cHSP60 may cross-react with the conserved regions of the hHSP60 which finally may lead to autoimmune responses.

An immunity to the conserved epitopes of cHSP60 and, in parallel, a cross-immunity to hHSP60 with resulting possible autoimmunity cannot be recognized without a specific, standardized detection system.

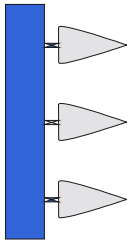
A variety of sequelae resulting from chlamydia infections have been linked with cHSP60-induced autoimmune responses: adverse outcome of pregnancy, preterm labour, habitual and spontaneous abortions, ectopic pregnancy, tubal factor infertility (TFI), and *in vitro* fertilization (IVF) failure.

Other autoimmune diseases, such as reactive arthritis, distinct forms of asthma, as well as arteriosclerosis and coronary heart diseases as possible autoimmune diseases due to sensitization to HSP60, to date, partly have been discussed controversially. The different results, among others, may be put down to the use of not standardized in-house tests, which do not allow direct comparison. A standardized, reproducible, objective test system is mandatory in order to draw clear conclusions from comparable test results in connection with the various clinical pictures.

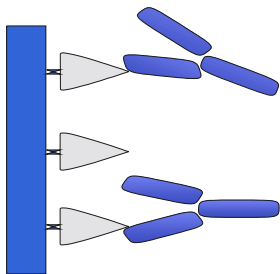
The cHSP60-IgG-ELISA medac uses recombinant heat shock protein 60 from ***Chlamydia trachomatis*** as antigen. It is suitable for the detection of IgG antibodies to HSP60 from ***Chlamydia trachomatis***. In spite of the high homology between the chlamydia species of > 95 % on protein level this assay seems to detect predominantly antibodies which are directed towards HSP60 from ***Chlamydia trachomatis***.

The cHSP60-IgG-ELISA medac should be used for the diagnosis of the tubal status in the forefront of the *in vitro* fertilization. In combination with the ***Chlamydia trachomatis***-specific MOMP serology from medac it represents an additional marker for the detection of ***Chlamydia trachomatis***-induced tubal damages.

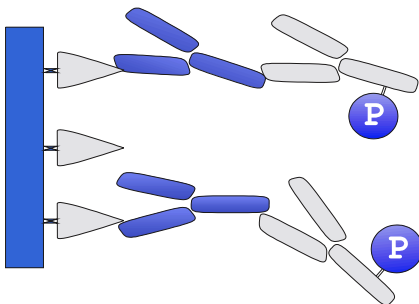
TEST PRINCIPLE



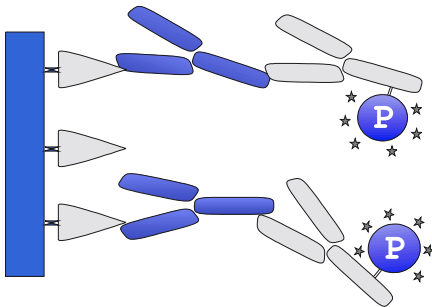
The plate is coated with recombinant heat shock protein 60 from *Chlamydia trachomatis* (cHSP60).



The antibodies from the specimen that are directed towards cHSP60 are bound to the antigen.



Peroxidase-conjugated anti-human IgG antibodies bind to the IgG antibodies (P = peroxidase).



Incubation with TMB-substrate (*). The reaction is stopped by the addition of sulfuric acid. The absorption is read photometrically.

Advantages of the test

- ☞ Recombinant cHSP60 as antigen.
- ☞ The breakable microwell strips permit efficient use of the test.
- ☞ Suitable for automation on open ELISA devices.

KIT CONTENTS

Cat.-no.: 435

1.

MTP

Microplate: 12 x 8 wells (with frame and desiccant vacuum sealed in aluminium bag), breakable, U-form, coated with recombinant heat shock protein 60 from *Chlamydia trachomatis* and FCS, ready to use.
2.

CONTROL	-
----------------	----------

Negative control: 1 vial with 1.5 ml, human serum, ready to use, stained blue, contains NBCS, phenol, ProClin™ 300 and gentamycine sulfate.
3.

CONTROL	+
----------------	----------

Positive control: 1 vial with 1.5 ml, human serum, ready to use, stained blue, contains BSA, phenol, ProClin™ 300 and gentamycine sulfate.
4.

WB

Wash buffer: 1 bottle with 100 ml, PBS/Tween (10x), pH 7.2 - 7.4, contains ProClin™ 300.
5.

BAC-DIL

Sample diluent: 1 bottle with 110 ml, PBS/Tween/NBCS, pH 7.0 - 7.2, ready to use, stained blue, contains ProClin™ 300.
6.

CON

Conjugate: 3 vials with 4.5 ml each, goat anti-human IgG, HRP-conjugated, ready to use, stained green, contains BSA, phenol, ProClin™ 300 and gentamycine sulfate.
7.

TMB

TMB-substrate: 1 vial with 10 ml, ready to use.
8.

STOP

Stop solution: 2 vials with 11 ml each, 0.5 M sulfuric acid (H₂SO₄), ready to use.

1. STORAGE AND STABILITY

MATERIAL/REAGENT	STATE	STORAGE	STABILITY
Test kit	unopened	2 - 8 °C	until expiry date
Microplate	opened	2 - 8 °C in bag with desiccant	12 weeks
Controls	opened	2 - 8 °C	12 weeks
Wash buffer	diluted	2 - 8 °C	12 weeks
Sample diluent	opened	2 - 8 °C	12 weeks
Conjugate	opened	2 - 8 °C	12 weeks
TMB-substrate	opened	2 - 8 °C	12 weeks
Stop solution	opened	2 - 8 °C	until expiry date

Do not use the reagents after the expiry date.

2. REAGENTS AND MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- 2.1. Water for injection (H₂O redist.). Use of deionised water can disturb the test procedure.
- 2.2. Adjustable micropipettes.
- 2.3. Clean glass or plastic containers for dilution of wash buffer and specimen.
- 2.4. Suitable device for microplate washing (e.g. multistepper or ELISA washer).
- 2.5. Incubator for 37 °C.
- 2.6. Microplate reader with filters for 450 nm and 620 - 650 nm.

3. PREPARATION OF THE REAGENTS

Before starting the test procedure all kit components must be equilibrated to room temperature.

Calculate the number of wells required.

3.1. Microplate

The aluminium bag has to be tightly resealed together with the desiccant after each removal of wells. Storage and stability of the wells are indicated under point 1.

3.2. Wash buffer

Mix one volume of wash buffer (10x) with nine volumes of water for injection (e.g., 50 ml wash buffer (10x) with 450 ml water). 10 ml of diluted wash buffer are needed for eight wells.

Crystals in the wash buffer (10x) have to be dissolved by warming (max. 37 °C) and/or stirring at RT.

Do not mix test specific reagents (microplate, controls, conjugate) from different kit lots. In contrast to that, sample diluent, wash buffer, TMB-substrate and stop solution are generally exchangeable in all Chlamydia-and Mycoplasma-ELISA medac.

Reagents from other manufacturers must not be used in general.

Valid and reproducible results are only obtained if the test procedure is precisely followed.

4. SPECIMEN

4.1. The test is suitable for serum samples.

4.2. Pretreatment of sera, e.g. inactivation, is not necessary. However, they should neither be contaminated with microorganisms nor contain any red blood cells.

4.3. Sera have to be diluted 1:50 with sample diluent.

5.A. TEST PROCEDURE

5.1. Cut the aluminium bag above the zip fastener and take out the required number of microplate wells (see 3.1.).

Microplate wells are ready to use and do not have to be prewashed.

5.2. Pipette 50 µl of the sample diluent into the well A1 as blank (see 6.A.), and 50 µl of the negative control (in duplicate), positive control, and the diluted patient samples.

If necessary, the microplate wells can be kept in a humid chamber up to 30 min at RT before proceeding.

5.3. Incubate the microplate wells for 60 min (± 5 min) at 37 °C (± 1 °C) in a humid chamber or sealed with incubation cover foil.

5.4. After incubation wash the microplate wells three times with 200 µl wash buffer per well. Pay attention that all wells are filled. After washing tap microplate wells on filter paper.

Do not allow the wells to dry out! Proceed immediately!

5.5. Add conjugate (coloured green) to each well.

50 µl of conjugate have to be pipetted into the wells if the test is done manually.

Please note:

When working with automated devices, 60 µl of conjugate have to be pipetted into each well due to a higher evaporation in the incubation chambers of the devices.

The suitability of the test for automated devices was confirmed during the evaluation of the test. Nevertheless we recommend to verify the compatibility of the test with the devices used in the lab.

5.6. Incubate again for 60 min (\pm 5 min) at 37 °C (\pm 1 °C) in a humid chamber or sealed with incubation cover foil.

5.7. After incubation wash microplate wells again (see 5.4.).

5.8. Add 50 µl of TMB-substrate to each well and incubate for 30 min (\pm 2 min) at 37 °C (\pm 1 °C) in a humid chamber or sealed with incubation cover foil in the dark. Positive samples turn blue.

5.9. Stop the reaction by adding 100 µl of stop solution to each well. Positive samples turn yellow.

Clean microplate wells from underneath before the photometric reading and take care that there are no air bubbles in the wells.

The reading should be done within 15 min after adding the stop solution!

5.B. TABLE FOR THE TEST PROCEDURE

	Blank (A1)	Negative control	Positive control	Sample
Sample diluent	50 µl	-	-	-
Negative control	-	50 µl	-	-
Positive control	-	-	50 µl	-
Sample	-	-	-	50 µl
Incubate for 60 min at 37 °C, wash 3 x with 200 µl wash buffer.				
Conjugate	50/60 µl *)	50/60 µl *)	50/60 µl *)	50/60 µl *)
Incubate for 60 min at 37 °C, wash 3 x with 200 µl wash buffer.				
TMB-substrate	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Incubate for 30 min at 37 °C in the dark.				
Stop solution	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Photometric reading at 450 nm (ref. 620 - 650 nm)				

*) manual/automatic procedure (see 5.5.)

6.A. CALCULATION OF RESULTS (VALIDITY)

- * Read OD values at 450 nm (reference wavelength 620 - 650 nm).
- * Subtract the OD value of the blank (well A1) from all other OD values.
- * The OD value of the blank has to be **< 0.100**.
- * The mean OD value of the **negative control** has to be **< 0.100**.
- * The OD value of the **positive control** has to be **> 0.800**.
- * **Cut off = mean OD value of the negative control + 0.350**
- * **Grey zone = Cut off ± 10 %**

Repeat the run if the results do not meet the specification!

6.B. INTERPRETATION OF THE RESULTS:

6.B.1. QUALITATIVE

Result	Valuation
OD < Grey zone	negative
OD Cut-off +/- 10 %	equivocal
OD > Grey zone	positive

6.B.2. SEMI-QUANTITATIVE

Cut-off Index: $\frac{\text{OD Sample}}{\text{OD Cut-off}}$	Valuation
< 0.9	negative
0.9 - 1.1	equivocal
> 1.1	positive

6.B.3. QUANTITATIVE

The **endtiter** (= last positive or borderline dilution) can be calculated.

First of all the cut-off index has to be calculated.

$$\text{Cut-off index} = \frac{\text{OD sample}}{\text{cut off}}$$

Then the calculation of the endtiter is possible in two ways.

1. $1 : \text{endtiter} = 55.5 \times (\text{OD/cut off})$

The result has to be rounded down to the next lower whole titer step, i.e., to 1:50, 1:100, 1:200, etc.

This calculation is valid for OD values ≤ 2.0 . Samples with OD values > 2.0 should be retested employing a higher starting dilution (e.g., 1:400).

If a higher starting dilution than 1:50 had been used, the above mentioned formula has to be multiplied with the corresponding dilution factor.

Example: Employed sample dilution 1:400, that means an eightfold higher starting dilution.

OD = 1.78
 Cut off = 0.42
1 : endtiter = $55.5 \times (1.78/0.42) \times 8 = 1882 \Rightarrow$ **1:1600**

2. The titer which corresponds to the cut off index can also be determined from the table below.

Cut-off Index	IgG	
	Result	Titer
<0.90	Negative	<1: 50
0.90 - 1.10	Equivocal	
1.11 - 1.80	Positive	1: 50
1.81 - 3.60	Positive	1:100
3.61 - 7.20	Positive	1:200

This calculation is only valid for OD values ≤ 2.0 ; otherwise see above mentioned example.

- * Samples with OD values within the grey zone should be retested together with a fresh specimen taken 14 days later in order to determine a titer change.
- * The results should always be interpreted in connection with anti-**C. trachomatis** IgG and IgA antibodies and with the clinical data of the patients as well as with additional diagnostic parameters.
- * High concentrations of hemoglobin, bilirubin, and of lipids in serum do not have an influence on the results.
- * Cross-reactions with antibodies to other microbial HSP60 cannot be excluded.

6.C. SPECIFIC INTERPRETATION

Possible Results			Interpretation
pELISA		cHSP60	
IgG	IgA	IgG	
+	+	+	High probability of a <i>C. trachomatis</i> -induced TFI
+	-	+	
+	+	-	Indication of a <i>C. trachomatis</i> infection.
+	-	-	Indication of a past <i>C. trachomatis</i> infection.
-	-	+	No serological indication of a <i>C trachomatis</i> infection; cross-reactions with antibodies to HSP60 of other bacteria possible.
-	-	-	No serological indication of a <i>C. trachomatis</i> -infection.

7. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

We have determined the following performance characteristics during the validation.

7.A. PREVALENCE

In various cohorts the following cHSP60 IgG antibody prevalence was determined:

Cohort	cHSP60 IgG prevalence
Blood donors	14 % (n=100)
Patients with fertility problems	59 % (n=73)
Patients with rheumatic diseases	64 % (n=44)
Patients with coronary heart diseases	18 % (n=44)

7.B. CLINICAL-DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE

Various studies had demonstrated that the cHSP60 serology in combination with the *C. trachomatis*-spezific MOMP serology (pELISA medac) constitutes an additional marker for the detection of *Chlamydia trachomatis*-induced tubal damages.

7.B.1. SENSITIVITIES AND POSITIVE PREDICTIVE VALUES (PPV) WITH REFERENCE TO OCCLUDED TUBES

Authors: Den Hartog J et. al. (2003) Cohorts: IVF patients with (n=59) and without (n=254) distal tubal pathologie (DTP)	Positive antibody results	DTP- present (n=59)	Sens. (%)	PPV (%)
	<i>C. trachomatis</i> - IgG	32/59 (54 %)	54 %	61 %
	cHSP60-IgG	30/59 (51 %)	51 %	44 %
	<i>C. trach.</i> - and cHSP60-IgG	28/59 (47 %)	47 %	68 %
Authors: Clad et al. (2004) Cohorts: IVF patients with patent (n=102) and occluded tubes (n=24)	Positive antibody results	TFI- present (n=24)	Sens. (%)	PPV (%)
	<i>C. trachomatis</i> - IgG	21/24 (87.5 %)	87,5 %	54 %
	cHSP60-IgG	19/24 (79 %)	79 %	39 %
	<i>C. trach.</i> - and cHSP60-IgG	19/24 (79 %)	79 %	63 %
Authors: Surcel et al. (2004) Cohorts: IVF patients with occluded tubes (n=88) and blood donors (n=163)	Positive antibody results	TFI- present (n=88)	Sens. (%)	PPV (%)
	<i>C. trachomatis</i> - IgG	38/88 (43 %)	43 %	63 %
	cHSP60-IgG	52/88 (59 %)	59 %	59 %
	<i>C. trach.</i> - and cHSP60-IgG	30/88 (34 %)	34 %	70 %

7.B.2. SPECIFICITIES AND NEGATIVE PREDICTIVE VALUES (NPV) WITH REFERENCE TO PATENT TUBES

Authors: Den Hartog J et. al. (2003) Cohorts: IVF patients with (n=59) and without (n=254) distal tubal pathologie (DTP)	Negative antibody results	DTP absent (n=254)	Spec. (%)	NPV (%)
	C. trachomatis- IgG	234/254 (92 %)	92 %	90 %
	cHSP60-IgG	216/254 (85 %)	85 %	88 %
	C. trach.- and cHSP60-IgG	241/254 (95 %)	95 %	89 %
Authors: Clad et al. (2004) Cohorts: IVF patients with patent (n=102) and occluded tubes (n=24)	Negative antibody results	TFI- absent (n=102)	Spez. (%)	NPV (%)
	C. trachomatis- IgG	84/102 (82 %)	82 %	97 %
	cHSP60-IgG	72/102 (71 %)	71 %	94 %
	C. trach.- and cHSP60-IgG	91/102 (89 %)	89 %	95 %
Authors: Surcel et al. (2004) Cohorts: IVF patients with occluded tubes (n=88) and blood donors (n=163)	Negative antibody results	TFI- absent (n=163)	Spez. (%)	NPV (%)
	C. trachomatis- IgG	141/163 (87 %)	87 %	74 %
	cHSP60-IgG	127/163 (78 %)	78 %	78 %
	C. trach.- and cHSP60-IgG	150/163 (92 %)	92 %	72 %

7.B. PRECISION

Sample	Intra-assay variation (n=22)			Sample	Interassay variation (n=11)		
	mean OD	SD	CV (%)		mean OD	SD	CV (%)
NC	0.053	0.006	11.0	NC	0.045	0.009	19.1
BC	0.683	0.023	3.3	BC	0.649	0.033	5.0
PC	1.324	0.057	4.3	PC	1.293	0.083	6.4
N° 1	0.067	0.003	4.4	N° 4	0.090	0.021	22.8
N° 2	0.653	0.013	1.9	N° 5	1.047	0.087	8.3
N° 3	1.305	0.047	3.6	N° 6	1.310	0.113	8.7
				N° 7	1.657	0.087	5.2

NC = negative control; BC = weak positive control (not included in the kit);
PC = positive control

GENERAL HANDLING ADVICES

- * To avoid cross contamination do not exchange the vials and their screw caps.
- * The reagents have to be sealed immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- * After use, the reagents have to be stored as indicated to guarantee the shelf life.
- * After use, all components of the testkit should be stored in the original package, in order to avoid mixing up the reagents of other test systems or lots (see also 3.).

HEALTH AND SAFETY INFORMATION

- * The local occupational safety and health regulations have to be regarded.
- * Reagents of human origin have been tested and found to be negative for HBsAg, for antibodies to HIV-1/2 and to HCV. Nevertheless, it is strongly recommended that these materials as well as those of animal origin (see kit contents), should be handled as potentially infectious and used with all necessary precautions.

DISPOSAL CONSIDERATIONS

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

Date of issue: 06.03.2008

CHSP60-IgG-ELISA medac

Immunoessai enzymatique recombinant pour la détection quantitative des anticorps IgG anti heat shock protein 60 d'origine chlamydiale

Réf.: 435

DESTINEE UNIQUEMENT AU DIAGNOSTIC IN VITRO

INTRODUCTION

Les heat shock proteins (HSP) sont des protéines de stress cellulaire hautement préservées; leur composition en acides aminés n'a pas changé beaucoup pendant l'évolution et elles sont exprimées chez les procaryotes et les eucaryotes avec une forte homologie. Donc, entre l'homme et la souris des homologies de 99,9 % ont été trouvées, entre l'homme et les bactéries à peu près 60 %, entre l'homme et les chlamydiae à peu près 50 % et entre les espèces de chlamydiae > 95 %.

La superfamille des heat shock proteins inclut différentes familles qui sont classées en fonction de leur poids moléculaire: HSP10, HSP25 (alpha B-crystallin), HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, HSP110. Les membres des familles HSP sont divisées entre deux groupes principaux: les heat shock proteins constitutives (HSC) et les heat shock proteins induites (HSP).

Dans les conditions physiologiques, les HSC sont produites en permanence; elles sont les «gardiennes de l'ordre» intracellulaire au niveau moléculaire, responsables pour un bon déroulement de l'anabolisme et du catabolisme.

Les HSPs (protéines de stress) sont rapidement et distinctement synthétisées par les cellules en réponse à divers stimuli de stress physiques et chimiques, afin d'augmenter les fonctions de protection cellulaire.

Les HSPs (mHSPs) microbiennes sont des antigènes dominants et très immunogènes pour l'homme. Pendant une infection, les microbes augmentent fortement leur synthèse de mHSP, afin de se protéger des mécanismes de défense immunologiques de l'hôte. Suite à cela, la mHSP60 devient une des protéines bactériennes prédominantes. L'immunité, qui succède à une semblable infection primaire, est normalement réduite à des épitopes spécifiques des molécules de mHSP60.

La heat shock protein 60 chlamydiale (cHSP60) est une des mHSPs les plus intensivement étudiées. Des infections à *Chlamydia* asymptomatiques, non identifiées ou insuffisamment traitées peuvent conduire à une persistance des pathogènes. A ce stade, les cHSP60 sont continuellement surexprimées, phénomène par lequel le système immunitaire humain est de manière permanente en contact avec cette protéine étrangère. Des réponses humorales et cellulaires sont induites. De plus, la HSP60 humaine (hHSP60) est aussi surexprimée de manière à protéger les cellules humaines des attaques chlamydiales. Les anticorps qui sont dirigés contre les épitopes de cHSP60 peuvent avoir des réactions croisées avec ceux communs de la hHSP60, ce qui peut finalement mener à des réactions autoimmunes.

Une immunité contre les épitopes de cHSP60 et, en parallèle, une immunité croisée contre hHSP60 avec une autoimmunité résultante possible ne peut être reconnue sans un système de détection spécifique et standardisé.

Une variété de séquelles résultantes des infections à chlamydia ont été liées à une réponse autoimmune induite par cHSP60: issue défavorable de la grossesse, le travail avant terme, les avortements habituels et spontanés, les grossesses ectopiques, l'infertilité tubaire (TFI) et l'échec des fertilisations in vitro (IVF).

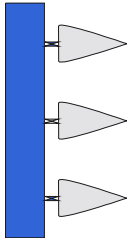
Des maladies autoimmunes, comme l'arthrite réactive, certaines formes d'asthme, de même que l'artériosclérose, des maladies cardiovasculaires et de possibles maladies autoimmunes dues à la sensibilisation à HSP60, ont été, à ce jour discutées de manière controversée. Les résultats différents, parmi d'autres, peuvent être dûs à des tests "in house" non standardisés, qui ne permettent pas une comparaison directe. Un système de test objectif, standardisé et reproductible est obligatoire, de manière à tirer des conclusions claires de résultats de tests comparables en fonction des diverses images cliniques.

Le cHSP60-IgG-ELISA medac utilise comme antigène une heat shock protein 60 recombinant (cHSP60) provenant du ***Chlamydia trachomatis***. Il convient pour la détection des anticorps IgG anti HSP60 de ***Chlamydia trachomatis***.

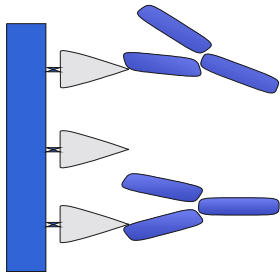
Malgré la grande homologie de > 95 % entre les espèces de chlamydia, cet essai semble détecter de manière prédominante des anticorps qui sont dirigés contre HSP60 de ***Chlamydia trachomatis***.

Le cHSP60-IgG-ELISA medac devrait être utilisé pour le diagnostic de l'état tubaire en première ligne de la fertilisation in vitro. En combinaison avec le ***Chlamydia trachomatis***-MOMP sérologique de medac, il représente un marqueur supplémentaire pour la détection des dommages tubaires induits par ***Chlamydia trachomatis***.

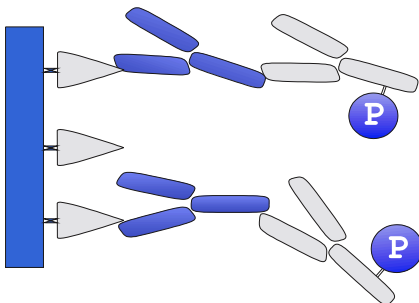
PRINCIPE DU DOSAGE



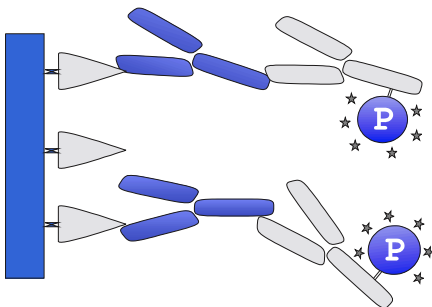
La plaque est recouverte de heat shock protein 60 recombinante de *Chlamydia trachomatis* (cHSP60).



Les anticorps de l'échantillon qui sont dirigés contre cHSP60 se lient à l'antigène.



Des anticorps anti-IgG humaines conjugués à la peroxydase se fixent aux anticorps IgG (P = peroxydase).



Incubation avec le substrat-TMB (*). La réaction est arrêtée par l'ajout d'acide sulfurique. L'absorption est lue sur un spectrophotomètre.

Avantages du dosage

- ☞ Antigène cHSP60 recombinant.
- ☞ Micropuits sécables permettant l'utilisation optimale du test.
- ☞ Convient pour l'automatisation sur des appareils ELISA ouverts.

CONTENU DE LA TROUSSE

Réf.: 435

1.

MTP

Microplaque: 12 x 8 puits (avec support et déshydratant, dans un sachet d'aluminium scellé sous vide), sécables, en forme de U, revêtus de heat shock protein 60 recombinante de *Chlamydia trachomatis* et de sérum foetal de veau, prêts à l'emploi.
2.

CONTROL	-
----------------	----------

Contrôle négatif: 1 flacon de 1,5 ml, contenant du sérum humain, prêt à l'emploi, de couleur bleue, contient du sérum de veau nouveau-né, du phénol, du ProClin™ 300 et du sulfate de gentamycine.
3.

CONTROL	+
----------------	----------

Contrôle positif: 1 flacon de 1,5 ml, contenant du sérum humain, prêt à l'emploi, de couleur bleue, contient de la BSA, du phénol, du ProClin™ 300 et du sulfate de gentamycine.
4.

WB

Tampon de lavage: 1 flacon de 100 ml, PBS/Tween (10 x), pH 7,2 - 7,4, contient du ProClin™ 300.
5.

BAC-DIL

Diluant pour échantillons: 1 flacon de 110 ml PBS/Tween/sérum de veau nouveau-né, pH 7,0 - 7,2, prête à l'emploi, de couleur bleue, contient du ProClin™ 300.
6.

CON

Conjugué: 3 flacons de 4,5 ml chacun, immunoglobulines de chèvre anti-IgG humaines, conjuguées à de la peroxydase de raifort (HRP), prête à l'emploi, de couleur verte, contient de la BSA, du phénol, du ProClin™ 300 et du sulfate de gentamycine.
7.

TMB

TMB-substrat: 1 flacon de 10 ml, prêt à l'emploi.
8.

STOP

Solution d'arrêt: 2 flacons de 11 ml chacun, acide sulfurique (H₂SO₄) 0,5 M, prête à l'emploi.

1. CONSERVATION ET STABILITE

MATERIEL/REACTIFS	ETAT	CONSERVATION	STABILITE
Trousse	non ouvert	2 - 8 °C	jusqu'à la date de péremption
Microplaque	ouvert	2 - 8 °C dans le sachet avec déshydratant	12 semaines
Contrôles	ouvert	2 - 8 °C	12 semaines
Tampon de lavage	dilué	2 - 8 °C	12 semaines
Diluant pour échantillons	ouvert	2 - 8 °C	12 semaines
Conjugué	ouvert	2 - 8 °C	12 semaines
Substrat-TMB	ouvert	2 - 8 °C	12 semaines
Solution d'arrêt	ouvert	2 - 8 °C	jusqu'à la date de péremption

Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.

2. REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS

- 2.1. Eau pour injection (H₂O bidistillée). L'utilisation d'eau désionisée peut perturber la procédure du test.
- 2.2. Micropipettes réglables.
- 2.3. Récipients propres en plastique ou en verre pour la dilution du tampon de lavage et des échantillons.
- 2.4. Dispositif de lavage des microplaques (par exemple multistepper ou ELISA washer).
- 2.5. Incubateur à 37 °C.
- 2.6. Lecteur de plaque avec filtres à 450 nm et 620 - 650 nm.

3. PREPARATION DES REACTIFS

Avant de démarrer la procédure de dosage, tous les composants de la trousse doivent être amenés à température ambiante (TA).

Calculer le nombre de puits nécessaire.

3.1. Microplaque

Le sachet d'aluminium doit être soigneusement rescellé avec le déshydratant après chaque retrait de puits. La conservation et la durée de vie des puits sont indiqués au point 1.

3.2. Tampon de lavage

Mélanger un volume de tampon de lavage (10 x) avec neuf volumes d'eau pour injection [ex. 50 ml de tampon de lavage (10 x) avec 450 ml d'eau]. 10 ml de tampon dilué sont nécessaires pour 8 puits.

Les cristaux dans le tampon de lavage (10 x) doivent être dissous par chauffage (max. 37 °C) et/ou agitation à température ambiante.

Ne pas mélanger les réactifs spécifiques du test (microplaque, contrôle, conjugué) de différents lots. Par contre, le diluant pour échantillons, le tampon de lavage, le substrat-TMB et la solution d'arrêt sont interchangeables dans tous les Chlamydia- et Mycoplasma-ELISA medac.

Des réactifs d'autres fabricants ne peuvent pas être utilisés.

Des résultats valides et reproductibles sont obtenus uniquement en suivant strictement la notice d'emploi.

4. ECHANTILLONS

4.1. Le test convient pour des échantillons sériques.

4.2. Le pré-traitement du sérum, par ex. inactivation, n'est pas nécessaire. Toutefois, il ne doit être contaminé par des micro-organismes ni contenir des érythrocytes.

4.3. Les échantillons sériques doivent être dilués au 1/50 avec le diluant pour échantillons.

5.A. PROCEDURE DE DOSAGE

5.1. Couper le sachet d'aluminium au-dessus de la fermeture à glissière et extraire le nombre de puits nécessaire (voir 3.1.).

Les puits sont prêts à l'emploi et ne doivent pas être prélevés.

5.2. Distribuer 50 µl de diluant pour échantillons dans le puits blanc A1 (voir 6.A.) et 50 µl de contrôle négatif (en double), de contrôle positif et d'échantillons dilués de patients dans les puits respectifs.

Si nécessaire, les puits peuvent être gardés dans une chambre humide jusqu'à 30 minutes à température ambiante avant la suite de la procédure.

- 5.3. Incuber la microplaque pendant 60 min (\pm 5 min) à 37 °C (\pm 1 °C) en chambre humide ou recouverte d'un film pour incubation.
- 5.4. Après incubation, laver les puits trois fois avec 200 μ l de tampon de lavage par puits. Vérifier que tous les puits soient remplis. Après lavage, tapoter les puits sur du papier absorbant.

Ne pas laisser sécher les puits! Poursuivre immédiatement la procédure!

- 5.5. Ajouter le conjugué (de couleur verte) dans chaque puits.

Distribuer 50 μ l de conjugué dans les puits si la procédure est réalisée manuellement.

Attention :

Si la procédure est réalisée sur automate, il faut distribuer 60 μ l de conjugué dans chaque puits, en raison de l'évaporation élevée des chambres d'incubation des appareils.

L'utilisation du test sur les appareils automatiques a été validée pendant l'évaluation du test. Néanmoins nous recommandons de vérifier la compatibilité du test avec les appareils utilisés dans le laboratoire.

- 5.6. Incuber à nouveau la microplaque pendant 60 min (\pm 5 min) à 37 °C (\pm 1 °C) en chambre humide ou recouverte d'un film pour incubation.
- 5.7. Après incubation, laver les puits à nouveau (voir 5.4).
- 5.8. Ajouter 50 μ l de TMB-substrat dans chaque puits et incuber pendant 30 min (\pm 2 min) à 37 °C (\pm 1 °C) en chambre humide ou recouverte d'un film pour incubation dans l'obscurité. Les échantillons positifs deviennent bleus.
- 5.9. Arrêter la réaction en ajoutant 100 μ l de solution d'arrêt dans chaque puits. Les échantillons positifs deviennent jaunes.

Bien nettoyer le dessous des puits avant la lecture photométrique et vérifier l'absence de bulles d'air dans les puits.

La lecture doit être effectuée dans les 15 min après l'ajout de la solution d'arrêt!

5.B. TABLEAU DE DISTRIBUTION DES REACTIFS

	Blanc (A1)	Contrôle négatif	Contrôle positif	Echantillon
Diluant pour échantillons	50 µl	-	-	-
Contrôle négatif	-	50 µl	-	-
Contrôle positif	-	-	50 µl	-
Echantillon	-	-	-	50 µl
Incuber pendant 60 min à 37 °C, laver 3 fois avec 200 µl de tampon de lavage				
Conjugué	50/60 µl *)	50/60 µl *)	50/60 µl *)	50/60 µl *)
Incuber pendant 60 min à 37 °C, laver 3 fois avec 200 µl de tampon de lavage				
Substrat-TMB	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Incuber pendant 30 min à 37 °C dans l'obscurité				
Solution d'arrêt	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Lecture photométrique à 450 nm (réf. 620 - 650 nm)				

*) procédure manuelle/automatique (voir 5.5.)

6.A. CALCUL DES RESULTATS (VALIDITE)

- * Lire les valeurs d'absorbance (D.O.) à 450 nm (longueur d'onde de référence 620 - 650 nm).
- * Soustraire la valeur D.O. du puits blanc (puits A1) de toutes les autres valeurs de D.O.
- * La valeur D.O. du puits blanc doit être **< 0,100**.
- * La valeur moyenne D.O. du **contrôle négatif** doit être **< 0,100**.
- * La valeur D.O. du **contrôle positif** doit être **> 0,800**.
- * **Valeur seuil (cut-off) = valeur moyenne D.O. du contrôle négatif + 0,350**
- * **Zone grise = valeur seuil ± 10 %**

Refaire la série si les résultats ne rencontrent pas les spécifications!

6.B. INTERPRETATION DES RESULTATS

6.B.1. QUALITATIVE

Résultat	Evaluation
D.O. < zone grise	Négatif
D.O. cut-off +/- 10 %	Douteux
D.O. > zone grise	Positif

6.B.2. SEMI-QUANTITATIVE

Index cut-off : $\frac{\text{D.O. échantillon}}{\text{D.O. cut-off}}$	Evaluation
< 0,9	Négatif
0,9 - 1,1	Douteux
> 1,1	Positif

6.B.3. QUANTITATIVE

Le **titre final** (= dernière dilution positive ou limite) peut être calculé .

Tout d'abord l'index cut-off doit être calculé.

$$\text{Cut-off} = \frac{\text{D.O. échantillon}}{\text{Cut-off}}$$

Le calcul du titre final est dès lors possible de 2 manières.

1. 1:titre final = 55,5 x (D.O./cut off)

Le résultat doit être arrondi vers le titre entier inférieur, a savoir 1:50, 1:100, 1:200, etc.

Ce calcul est valable pour des valeurs de D.O. $\leq 2,0$. Les échantillons ayant des valeurs de D.O. $> 2,0$ doivent être retestés avec une dilution de départ supérieure (par ex. 1:400) .

Si une dilution de départ supérieure à 1:50 doit être utilisée, la formule mentionnée ci-dessus doit être multipliée par le facteur de dilution correspondant.

Exemple: La dilution d'échantillon utilisée est 1:400, cela signifie une dilution de départ huit fois plus élevée.

D.O. = 1,78

Cut off = 0,42

1:titre final = $55,5 \times (1,78/0,42) \times 8 = 1882 \Rightarrow$ **1:1600**

2. Le titre qui correspond à l'index cut-off peut aussi être déterminé à partir du tableau suivant.

Indes cut-off	IgG	
	Résultat	Titre
<0,90	Negatif	<1: 50
0,90 - 1,10	Douteux	
1,11 - 1,80	Positif	1: 50
1,81 - 3,60	Positif	1:100
3,61 - 7,20	Positif	1:200

Ce calcul est seulement valable pour des valeurs de D.O. $\leq 2,0$; autrement voir l'exemple mentionné ci-dessus.

- * Les échantillons ayant une D.O. dans la zone grise doivent être retestés avec un nouveau specimen pris 14 jours plus tard de manière à déterminer un changement de titre.
- * Les résultats doivent toujours être interprétés en relation avec les anticorps IgG et IgA anti- **C.trachomatis** et avec les données cliniques des patients de même que des paramètres additionnels de diagnostic.
- * De hautes concentrations d'hémoglobine, de bilirubine et de lipides dans le sérum n'ont pas d'influence sur les résultats.
- * Des réactions croisées avec des anticorps dirigés contre d'autres HSP60 microbiennes ne peuvent être exclues.

6.C. INTERPRETATION SPECIFIQUE

Résultats possibles			Interprétation
pELISA		cHSP60	
IgG	IgA	IgG	
+	+	+	Haute probabilité d'une infertilité tubaire induite par <i>C. trachomatis</i> .
+	-	+	
+	+	-	Indication d'une infection à <i>C. trachomatis</i> .
+	-	-	Indication d'une infection ancienne <i>C. trachomatis</i> .
-	-	+	Pas d'indication sérologique d'une infection à <i>C. trachomatis</i> ; des réactions croisées avec des anticorps anti-HSP60 d'autres bactéries sont possibles.
-	-	-	Pas d'indication sérologique d'une infection à <i>C. trachomatis</i> .

7. CARACTERISTIQUES DES PERFORMANCES

Nous avons déterminé les caractéristiques des performances suivantes pendant la validation.

7. A. PREVALENCE

Dans différentes cohortes les prévalences suivantes d'anticorps cHSP60 IgG ont été déterminées:

Cohorte	Prévalence cHSP60 IgG
Donneurs de sang	14 % (n=100)
Patients avec problèmes de fertilité	59 % (n=73)
Patients avec maladies rhumatismales	64 % (n=44)
Patients avec maladies cardiovasculaires	18 % (n=44)

7.B. SIGNIFICATION CLINIQUE ET DIAGNOSTIQUE

Différentes études ont démontré que la sérologie cHSP60 en combinaison avec la sérologie spécifique MOMP *C.trachomatis* (pELISA medac) constituent un marqueur supplémentaire pour la détection des dommages tubaires induits par *Chlamydia trachomatis*.

7.B.1. SENSIBILITES ET VALEURS PREDICTIVES POSITIVES (PPV) EN REFERENCE AUX OCCLUSIONS TUBAIRES

Auteurs: Den Hartog J et. al. (2003) Cohortes: patients FIV avec (n=59) et sans (n=254) pathologie tubaire (DTP)	Résultats anticorps positifs	DTP- présent (n=59)	Sens. (%)	PPV (%)
	C. trachomatis- IgG	32/59 (54 %)	54 %	61 %
	cHSP60-IgG	30/59 (51 %)	51 %	44 %
	C. trach.- et cHSP60-IgG	28/59 (47 %)	47 %	68 %
Auteurs: Clad et al. (2004) Cohortes: patients FIV avec tubes ouverts (n=102) et occlusions tubaires (n=24)	Résultats anticorps positifs	TFI- présent (n=24)	Sens. (%)	PPV (%)
	C. trachomatis- IgG	21/24 (87.5 %)	87,5 %	54 %
	cHSP60-IgG	19/24 (79 %)	79 %	39 %
	C. trach.- et cHSP60-IgG	19/24 (79 %)	79 %	63 %
Auteurs: Surcel et al. (2004) Cohortes: patients FIV avec occlusions tubaires (n=88) et donneurs de sang (n=163)	Résultats anticorps positifs	TFI- présent (n=88)	Sens. (%)	PPV (%)
	C. trachomatis- IgG	38/88 (43 %)	43 %	63 %
	cHSP60-IgG	52/88 (59 %)	59 %	59 %
	C. trach.- et cHSP60-IgG	30/88 (34 %)	34 %	70 %

**7.B.2. SPECIFICITE ET VALEURS PREDICTIVES NEGATIVES (NPV) EN
REFERENCE AUX TUBES...OUVERTS**

Auteurs: Den Hartog J et. al. (2003) Cohortes: Patients FIV avec (n=59) sans(n=254) pathologie tubaire (DTP)	Résultats anticorps négatifs	DTP absent (n=254)	Spéc. (%)	NPV (%)
	C. trachomatis- IgG	234/254 (92 %)	92 %	90 %
	cHSP60-IgG	216/254 (85 %)	85 %	88 %
	C. trach. - et cHSP60-IgG	241/254 (95 %)	95 %	89 %
<hr/>				
Auteurs: Clad et al. (2004) Cohortes: patients FIV avec tubes ouverts (n=102) et occlusions tubaires (n=24)	Résultats anticorps négatifs	TFI- absent (n=102)	Spéc. (%)	NPV (%)
	C. trachomatis- IgG	84/102 (82 %)	82 %	97 %
	cHSP60-IgG	72/102 (71 %)	71 %	94 %
	C. trach. - et cHSP60-IgG	91/102 (89 %)	89 %	95 %
<hr/>				
Auteurs: Surcel et al. (2004) Cohortes: patients FIV avec occlusions tubaires (n=88) et donneurs de sang (n=163)	Résultats anticorps négatifs	TFI- absent (n=163)	Spéc. (%)	NPV (%)
	C. trachomatis- IgG	141/163 (87 %)	87 %	74 %
	cHSP60-IgG	127/163 (78 %)	78 %	78 %
	C. trach. - and cHSP60-IgG	150/163 (92 %)	92 %	72 %

7.C. PRECISION

Echan- tillon	Variation intra-essai (n=22)			Echan- tillon	Variation inter-essai (n=11)		
	D.O. moyenne	DS	CV (%)		D.O. moyenne	DS	CV (%)
NC	0,053	0,006	11,0	NC	0,045	0,009	19,1
BC	0,683	0,023	3,3	BC	0,649	0,033	5,0
PC	1,324	0,057	4,3	PC	1,293	0,083	6,4
N° 1	0,067	0,003	4,4	N° 4	0,090	0,021	22,8
N° 2	0,653	0,013	1,9	N° 5	1,047	0,087	8,3
N° 3	1,305	0,047	3,6	N° 6	1,310	0,113	8,7
				N° 7	1,657	0,087	5,2

NC = contrôle négatif; BC = contrôle positif bas (non inclus dans la trousse);
PC = contrôle positif

INDICATIONS GENERALES

- * Ne pas échanger les flacons et leurs bouchons pour éviter les contaminations croisées.
- * Les flacons des réactifs doivent être refermés immédiatement après leur utilisation pour éviter l'évaporation et une contamination microbienne.
- * Après emploi, les réactifs doivent être conservés comme indiqué pour garantir leur durée de vie.
- * Après leur utilisation, conserver tous les composants de la trousse dans leur emballage d'origine, afin d'éviter le mélange des réactifs concernant d'autres techniques de dosage ou d'autres lots (voir aussi 3.).

PRECAUTIONS D'EMPLOI

- * Il faut appliquer la réglementation en vigueur en matière de sécurité et de santé.
- * Les réactifs d'origine humaine ont été dosés et trouvés négatifs en AgHBs, en anticorps anti-HIV-1/2 et anti-VHC. Néanmoins, il est fortement conseillé de manipuler ces produits, ainsi que ceux d'origine animale (voir contenu de la trousse), comme étant potentiellement infectieux et de les utiliser avec les précautions nécessaires.

CONSEIL D'ELIMINATION

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchets doit se faire selon la réglementation en vigueur. Il faut consulter les organismes agréés pour connaître le moyen de se débarrasser des déchets.

Date de mise à jour: 06.03.2008.

LITERATUR/REFERENCES/LITTERATURE

Burian K, Kis Z, Virok D, Endresz V, Prohaszka Z, Duba J, Berencsi K, Boda K, Horvath L, Romics L, Fust G, Gonczol E: Independent and joint effects of antibodies to human heat-shock protein 60 and ***Chlamydia pneumoniae*** infection in the development of coronary atherosclerosis. *Circulation* (2001) 103:1503-1508

Clad A, Petersen EE, Böttcher M: Expanded ***Chlamydia trachomatis*** serology: cHSP60 IgG and its association with tubal occlusion. In: Deák J (ed.) *Proceedings of the European Society for Chlamydia Research*. Pauker Nyomdaipari Kft., Budapest, Hungary (2004) p 86

Den Hartog J, Land J, Stassen F, Slobbe M, Kessels A, Bruggemann C: Predictive value of cHSP60 antibodies in screening for tubal subfertility. 19th Annual Meeting of the European Society for Human Reproduction and Embryo Transfer (EHSRE) June 29-July 2, 2003, Madrid, Spain, xviii183, P-549

Fajac I, Roisman GL, Lacronique J, Polla BS, Dusser DJ: Bronchial gamma delta T-lymphocytes and expression of heat shock proteins in mild asthma. *Eur Respir J* (1997) 10:633-638

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

Hoppichler F, Koch T, Dzien A, Gschwandtner G, Lechleitner M: Prognostic value of antibody titre to heat-shock protein 65 on cardiovascular events. *Cardiology* (2000) 94:220-223

Jantos CA, Krombach C, Wuppermann FN, Gardemann A, Bepler S, Asslan H, Hegemann JH, Haberbosch W: Antibody response to the 60-kDa heat-shock protein of ***Chlamydia pneumoniae*** in patients with coronary artery disease. *J Infect Dis* (2000) 181:1700-1705

Kalayoglu MV, Indrawati, Morrison RP, Morrison SG, Yuan Y, Byrne GI: Chlamydial virulence determinants in atherogenesis: the role of chlamydial lipopolysaccharide and heat shock protein 60 in macrophage-lipoprotein interactions. *J Infect Dis* (2000) 181 Suppl 3:S483-489

Kikuta LC, Puolakkainen M, Kuo CC, Campbell LA: Isolation and sequence analysis of the ***Chlamydia pneumoniae*** GroE operon. *Infect Immun* (1991) 59:4665-4669

Larsen B, Birkelund S, Mordhorst CH, Ejstrup L, Andersen LS, Christensen G: The humoral immune response to ***Chlamydia trachomatis*** in patients with acute reactive arthritis. *Br J Rheumatol* (1994) 33:534-540

Lindquist SC, Craig EA: The heat shock proteins. *Annu Rev Genet* (1988) 22:631-636

Mayr C, Richter K, Lilie H, Buchner J: Cpr6 and Cpr7, two closely related HSP90-associated immunophilins from *Saccharomyces cerevisiae*, differ in their functional properties. *J Biol Chem* (2000) 275:34140-34146

Morrison RP, Belland RJ, Lyng K, Caldwell HD: Chlamydial disease pathogenesis. The 57-kD chlamydial hypersensitivity antigen is a stress response protein. *J Exp Med* (1989) 170:1271-1283

Neuer A, Spandorfer SC, Giraldo P, Dieterle S, Rosenwaks Z, Witkin SS: The role of heat shock proteins in reproduction. *Hum Reprod Update* (2000) 6:149-159

Neuer A, Gao Y, Sziller I, Dieterle S: Strategies for extended *Chlamydia trachomatis* serology in infertile patients: A clinical evaluation of *Chlamydia trachomatis* MOMP-, chlamydial 60KD heat shock protein and human HSP60 β serology. In: Deák J (ed.) *Proceedings of the European Society for Chlamydia Research*. Pauker Nyomdaipari Kft., Budapest, Hungary (2004) p. 242

Shinnik TM: Heat shock proteins as antigens of bacterial and parasitic pathogens. *Current Topics Microbiol Immunol* (1991) 167:145-160

Surcel HM, Bloigu A, Öhman H, Halttunen M, Birkelund S, Tiitinen A, Christiansen G, Koskela P, Morrison R, Paavonen J: *C. trachomatis* specific immune responses and infertility. In: Deák J (ed.) *Proceedings of the European Society for Chlamydia Research*. Pauker Nyomdaipari Kft., Budapest, Hungary (2004) p 162

Tishler M, Shoenfeld Y: Anti-heat-shock protein antibodies in rheumatic and autoimmune diseases. *Semin Arthritis Rheum* (1996) 26:558-563

Wang JD, Michelitsch MD, Weissmann JS: GroEL-GroES-mediated protein folding requires an intact central cavity. *Proc Natl Acad Sci USA* (1998) 95:12163-12168

Wick G, Xu Q: Atherosclerosis - an autoimmune disease. *Exp Gerontol* (1999) 34:559-566

Zügel U, Kaufmann SHE: Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* (1999) 12:19-39