

# RIDASCREEN<sup>®</sup> Legionella

Réf. : C8001



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17 64297 Darmstadt, Allemagne,  
Téléphone : +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax : +49 (0) 61 51 81 02-20



## 1. Application

Pour usage diagnostique *in vitro*. RIDASCREEN® Legionella est un test immunoenzymatique pour la détection qualitative des antigènes de *Legionella pneumophila* dans des échantillons d'urine.

## 2. Résumé et explication du test

La souche de *Legionella*, qui appartient à la famille des *Legionellaceae*, se divise en 40 espèces et plus de 70 sérogroupes. Les légionelles sont des bactéries intracellulaires à Gram négatif facultatives, dont le pic d'infection est atteint en été et au début de l'automne. Dans le cas de la maladie du légionnaire, on distingue les infections acquises en extérieur, dues à un déplacement, et les infections nosocomiales. Aux États-Unis, le taux de mortalité dû aux infections nosocomiales atteint 15 à 20 %.<sup>1,2</sup> En Europe, 12 % des cas de maladie du légionnaire sont fatals. Parmi le grand nombre d'espèces de *Legionella*, deux représentent d'importants pathogènes humains. L'infection par *L. pneumophila* provoque principalement la maladie du légionnaire (également appelée légionellose) et *L. longbeachae* provoque une fièvre de Pontiac. La fièvre de Pontiac est une maladie aiguë spontanément résolutive, qui ressemble à la grippe, mais sans pneumonie. Environ 7 % des patients souffrant de la maladie du légionnaire développent une fièvre de Pontiac.<sup>3</sup>

*L. pneumophila* se décompose en 16 sérogroupes ; en Europe, plus de 70 % des infections à *Legionella* sont dues au séro groupe 1 de *L. pneumophila*. Les autres souches pouvant provoquer une infection par *Legionella* incluent *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii* et *L. longbeachae*.<sup>4</sup>

La maladie du légionnaire est une infection respiratoire aiguë principalement due à *L. pneumophila*. Elle a été décrite pour la première fois en 1976, lors d'un congrès à Philadelphie, aux États-Unis, où elle a reçu le nom de maladie du légionnaire. Deux autres épidémies de la maladie du légionnaire ont fait 6 morts en 2013 à Brisbane en Australie et à Reynoldsburg dans l'Ohio aux États-Unis. Fièvre, toux (sèche ou avec production de crachat) et frissons en sont les symptômes. La diarrhée, les vomissements, la bradycardie et l'hyponatrémie sont d'autres symptômes, moins fréquents.<sup>3</sup> Des individus de tous âges peuvent être infectés par la maladie du légionnaire, mais les personnes âgées, ainsi que les fumeurs et les patients souffrant de troubles pulmonaires chroniques sont plus sensibles à ce type d'infections. Même dans les pays dotés d'un système de soins de santé efficace, jusqu'à 90 % des cas de maladie du légionnaire ne sont pas diagnostiqués car les symptômes cliniques sont très diffus et la maladie ne se déclare qu'assez rarement. En outre, il est difficile de distinguer la maladie du légionnaire d'autres formes de pneumonie sur la seule base des symptômes ou d'examens radiologiques.

Les antigènes solubles spécifiques à *Legionella* étant détectables très tôt dans l'urine des patients souffrant de la maladie du légionnaire, l'urine est une matrice d'examen idéale pour les stades précoces et tardifs de la légionellose<sup>5,6</sup>. Le test RIDASCREEN® Legionella ELISA est spécialement conçu à la détection de l'antigène soluble de *Legionella* dans l'urine des patients infectés par *Legionella pneumophila* du séro groupe 1.

### 3. Principe du test

Le test RIDASCREEN® Legionella utilise des anticorps spécifiques en appliquant une méthode de type sandwich. La surface de la plaque de microtitrage est revêtue d'anticorps polyclonaux dirigés contre les antigènes de Legionella LPS. Les échantillons d'urine à analyser et les contrôles, sont pipetés ensemble avec des anticorps polyclonaux anti-légionelle biotinylés (conjugué 1) dans le puits de la plaque de microtitrage, puis sont mis à incuber à température ambiante (20 à -25 °C). Après une étape de lavage, le conjugué polyperoxydase-streptavidine (conjugué 2) est ajouté et de nouveau mis à incuber à température ambiante (20 à -25 °C). En présence d'antigènes de légionelle dans l'échantillon d'urine, un complexe en sandwich se forme à partir des anticorps immobilisés, des antigènes de légionelle et des anticorps conjugués avec le complexe biotine-streptavidine-peroxydase. Une autre étape de lavage élimine le conjugué polyperoxydase streptavidine non lié. Dans les échantillons positifs, l'ajout d'un substrat modifie l'enzyme liée dans la solution incolore qui vire au bleu dans les puits de la plaque de microtitrage. L'ajout d'un réactif d'arrêt fait virer la couleur du bleu au jaune. L'extinction est proportionnelle à la concentration d'antigènes de légionelle présents dans l'échantillon.

### 4. Contenu du paquet

Les réactifs fournis dans la trousse permettent de faire 96 tests.

Plate	96	Plaque de microtitrage, 12 barrettes à micropuits (sécables) sur le support ; revêtue d'anticorps polyclonaux dirigés contre <i>L.pneumophila</i>
Wash	100 ml	Tampon de lavage, solution de NaCl tamponnée au phosphate (concentrée 10 fois), contient 0,1 % de thimérosal
Control   +	2 ml	Contrôle positif ; antigène de légionelle inactivé ; prêt à l'emploi
Control   -	2 ml	Contrôle négatif ; prêt à l'emploi
Conjugate   1	13 ml	Anticorps polyclonaux anti- <i>L.pneumophila</i> conjugués à la biotine dans une solution protéique stabilisée, prêts à l'emploi, de couleur jaune
Conjugate   2	13 ml	Conjugué polyperoxydase-streptavidine dans une solution protéique stabilisée prêt à l'emploi, de couleur orange
Substrate	13 ml	Peroxyde d'hydrogène/TMB, prêt à l'emploi
Stop	12 ml	Réactif d'arrêt, acide sulfurique 1 N, prêt à l'emploi

### 5. Instructions de conservation des réactifs

Tous les réactifs doivent être entreposés entre 2 et 8 °C et peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette. Si le tampon de lavage dilué est conservé entre 2-8 °C,

il peut être utilisé pendant 4 semaines maximum. La contamination microbienne doit être évitée. Aucune garantie de qualité ne peut être émise après la date de péremption des réactifs.

Le sachet en aluminium doit être ouvert à l'aide de ciseaux sans déchirer le joint d'étanchéité. Les barrettes de microtitrage qui ne sont pas nécessaires doivent être remises immédiatement dans le sachet en aluminium et conservées entre 2 et 8 °C.

Le substrat incolore doit également être protégé de la lumière directe pour éviter qu'il ne se décompose ou ne bleuisse sous l'effet d'une auto-oxydation. Lorsque le substrat est bleu, il ne doit pas être utilisé.

## **6. Réactifs requis, mais non fournis**

### 6,1. Réactifs

- Eau distillée ou désionisée

### 6,2. Accessoires

- Flacons d'échantillons
- Agitateur-mélangeur vortex (facultatif, voir rubrique 9.3.)
- Micropipette pour 50 - 100 µl
- Éprouvette graduée (1 000 ml)
- Chronomètre
- Appareil de lavage pour plaques de microtitrage ou pipettes multicanaux (300 µl)
- Photomètre pour plaques de microtitrage (450 nm et filtre de référence à 620-650 nm)
- Papier filtre (serviettes de laboratoire)
- Conteneur de déchets avec 0,5 % de solution d'hypochlorite

## **7. Mesures de précaution**

Uniquement pour le diagnostic *in vitro*.

Ce test ne doit être réalisé que par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux. Les instructions d'exécution du test doivent être respectées à la lettre.

Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche et éviter tout contact avec une peau ou des membranes muqueuses lésées. Lors de la manipulation des échantillons, porter un équipement de protection individuelle (gants adaptés, blouse, lunettes de protection) et se laver les mains à l'issue du test. Ne pas fumer, manger, ni boire dans les zones où des échantillons sont manipulés.

Pour en savoir plus, consulter la Fiche de données de sécurité (FDS) à l'adresse [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

Le contrôle positif de cette trousse contient un antigène de légionelle inactivé qui, tout comme les échantillons de patients, doit être traité comme potentiellement infectieux, conformément aux règlements nationaux en matière de sécurité.

Après utilisation, veiller à mettre au rebut tous les réactifs et matériels d'une manière adéquate et responsable. Veuillez vous conformer aux règlements nationaux applicables concernant la mise au rebut.

## 8. Prélèvement et conservation des échantillons

Les échantillons d'urine doivent être prélevés dans des récipients standards propres ; ils peuvent être conservés jusqu'à 24 heures à température ou entre 2 et 8 °C avant utilisation. Ils peuvent également être conservés pendant 3 jours supplémentaires entre 2 et 8 °C. Si une conservation plus longue est nécessaire avant utilisation, les échantillons d'urine doivent être conservés à -20 °C.

Éviter de congeler et décongeler les échantillons plusieurs fois. Les échantillons d'urine ne doivent pas être recueillis dans des conteneurs de transport renfermant un milieu de transport et des conservateurs, du sérum animal, des ions métal, des agents oxydants ou des détergents car ces substances peuvent interférer avec le test RIDASCREEN® Legionella Test ELISA.

## 9. Réalisation du test

### 9.1. Informations générales

Tous les réactifs et la plaque de microtitrage **Plate** doivent être ramenés à température ambiante (20 à 25 °C) avant utilisation. Les barrettes de microtitrage ne doivent pas être retirées du sachet en aluminium avant d'avoir atteint la température ambiante. Les réactifs doivent être bien mélangés immédiatement avant leur utilisation. Après utilisation, les barrettes de microtitrage (placées dans des sachets fermés hermétiquement) et les réactifs doivent être conservés entre 2 et 8 °C. Une fois utilisées, les barrettes de microtitrage ne doivent pas être réutilisées. Les réactifs et les barrettes de microtitrage ne doivent pas être utilisés si l'emballage est endommagé ou si les flacons fuient.

Pour éviter toute contamination croisée, les échantillons ne doivent pas entrer en contact direct avec les composants de la trousse.

Le test ne doit pas être réalisé à la lumière directe du soleil. Nous recommandons de couvrir la plaque de microtitrage ou de placer un film plastique dessus pour éviter toute perte par évaporation.

### 9.2. Préparation des échantillons

Bien mélanger toute l'urine avant de l'utiliser dans le cadre du test sans dilution.

Les éventuels cristaux de sel se formant pendant la conservation des échantillons d'urine doivent être entièrement dissous en chauffant à 37 °C avant de pouvoir utiliser l'urine dans le test. Si l'urine contient des particules pour une raison quelconque, elle doit être filtrée avant utilisation.

### 9.3. Première incubation

Après avoir rempli une quantité suffisante de puits dans le support, ajouter 100 µl du contrôle

positif **Control | +**, du contrôle négatif **Control | -** ou de l'échantillon d'urine. Ajouter ensuite 100 µl de l'anticorps conjugué à la biotine **Conjugate | 1** et mélanger (en tapotant légèrement le bord de la plaque), puis incuber pendant 60 minutes à température ambiante (20 à 25 °C).

#### 9.4. Lavage

Il est important de réaliser le lavage soigneusement pour obtenir des résultats corrects et donc, de respecter les instructions à la lettre. La substance incubée dans les puits doit être déversée dans un conteneur de déchets et mise au rebut conformément aux réglementations officielles. Tapoter ensuite la plaque sur du papier absorbant pour éliminer l'humidité résiduelle. Laver ensuite la plaque cinq fois systématiquement avec 300 µl de tampon de lavage. S'assurer que les puits sont complètement vidés en les tapotant sur un morceau de papier absorbant encore sec et inutilisé après chaque lavage.

En cas d'utilisation d'un laveur de microplaques ou d'un système ELISA entièrement automatisé, veiller à ce que l'appareil soit correctement réglé ou demander, au besoin, au fabricant de vous en fournir les réglages. Les appareils fournis par R-Biopharm sont déjà programmés avec des réglages et des protocoles de travail validés. Seuls les échantillons d'urine sans particules doivent être utilisés, conformément aux instructions de préparation des échantillons (voir la rubrique 9.2.) pour éviter d'obstruer les aiguilles de lavage. S'assurer également que tout le liquide est aspiré à chaque étape de lavage.

#### 9.5. Seconde incubation

À l'aide d'une pipette, ajouter 100 µl de conjugué polyperoxydase-streptavidine **Conjugate | 2** dans les puits, puis incuber pendant 30 minutes à température ambiante (20 à 25 °C).

#### 9.6. Lavage

Laver en suivant les instructions de la rubrique 9.4.

#### 9.7. Troisième incubation

Ajouter 100 µl de substrat **Substrate** dans tous les puits. Ensuite, incuber la plaque à température ambiante (20 à 25 °C), dans le noir, pendant 15 minutes. Remplir ensuite tous les puits avec 50 µl de réactif d'arrêt **Stop** afin d'arrêter la réaction. Après un mélange soigneux en tapotant légèrement le côté de la plaque, mesurer l'extinction à 450 nm (en variante : à 450/620 nm). Le réglage de la valeur nulle doit s'effectuer dans l'air, et donc sans la plaque de microtitrage.

### 10. Contrôle qualité – signes de réactif périmé

À des fins de contrôle qualité, chaque fois qu'un test est effectué, il est nécessaire d'utiliser des contrôles positif et négatif, pour vérifier la stabilité des réactifs et la réalisation correcte du test. Le test s'est déroulé correctement lorsque la valeur d'extinction (DO) du contrôle négatif à 450 nm est inférieure à 0,2 (inférieure à 0,160 à 450/620 nm) et lorsque la valeur mesurée du

contrôle positif est supérieure à 0,8 à 450 nm ou à 450/620 nm. Une valeur supérieure à 0,2 (0,160) pour le contrôle négatif pourrait indiquer que le lavage n'a pas été suffisant. Tout écart par rapport aux valeurs requises, par exemple la présence de turbidité ou d'une coloration bleue du substrat incolore avant le remplissage des puits, pourrait indiquer une dénaturation des réactifs.

En cas d'écart par rapport aux valeurs indiquées, les points suivants doivent être contrôlés avant de recommencer le test :

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Capacité de fonctionnement de l'équipement utilisé (par ex. étalonnage)
- Procédure de test correcte
- Inspection visuelle des composants de la trousse à la recherche d'une contamination ou de fuites ; une solution de substrat devenue bleue ne doit pas être utilisée.

Si les conditions ne sont toujours pas satisfaites après avoir recommencé le test, consulter le fabricant ou un distributeur R-Biopharm local.

## 11. Évaluation et interprétation

### 11.1. Calcul de la valeur seuil

Pour déterminer la valeur seuil, on ajoute 0,15 unité d'extinction à l'extinction mesurée du contrôle négatif.

$$\text{Valeur seuil} = \text{valeur d'extinction du contrôle négatif} + 0,15$$

### 11.2. Résultat du test

Un échantillon est considéré comme positif si sa valeur d'extinction est supérieure de plus de 10 % à la valeur seuil calculée.

Un échantillon est considéré comme limite si sa valeur d'extinction se situe dans une plage de -10 % à 10 % de la valeur seuil. Si un nouvel examen utilisant un nouvel échantillon d'urine obtient une valeur comprise dans cette même plage d'ombre, l'échantillon doit être considéré comme étant négatif.

Des échantillons ayant des valeurs inférieures à -10 % de la valeur seuil calculée doivent être considérés comme étant négatifs.

## 12. Limites de la méthode

Le test RIDASCREEN® Legionella détecte l'antigène soluble de la bactérie légionelle dans les échantillons d'urine. Il n'est pas possible d'en déduire un rapport entre le niveau d'une valeur d'extinction déterminée et l'apparition ou la gravité des symptômes cliniques. Les résultats obtenus doivent toujours être interprétés conjointement aux signes et symptômes cliniques.

Un résultat positif n'exclut pas la présence d'autres agents pathogènes infectieux.

Un résultat négatif n'exclut pas une éventuelle infection due à la légionelle. Un tel résultat peut être causé par l'élimination temporaire de l'agent pathogène dans l'urine ou par une quantité trop faible d'antigène dans l'échantillon. Si l'anamnèse est en faveur d'une suspicion d'une infection par *Legionella pneumophila*, un autre prélèvement d'urine doit être analysé.

Un résultat limite peut être causé par une répartition non homogène des antigènes dans l'échantillon d'urine. Le cas échéant, recommencer l'examen avec un second échantillon ou demander au patient un autre échantillon d'urine à examiner.

### 13. Performances

#### 13.1. Sensibilité analytique

Une étude de validation rétrospective menée avec le test RIDASCREEN® Legionella ELISA a analysé 100 échantillons d'urine. Ces échantillons ont été prélevés pour un examen diagnostique de routine au laboratoire de référence concernant les légionelles de Dresde en Allemagne, où ils ont ensuite été conservés à -20 °C. Après décongélation, les échantillons ont subi un examen comparatif avec le test RIDASCREEN® Legionella ELISA et un autre test ELISA disponible dans le commerce. Les résultats de l'étude sont indiqués dans le tableau 1.

Tableau 1: Corrélation entre le test RIDASCREEN® Legionella ELISA et un autre test ELISA disponible dans le commerce

		ELISA	
		Positif	Négatif
RIDASCREEN® Legionella	Positif	59	2
	Négatif	4	30

Correspondance positive : 95,2 %

Correspondance négative : 90,9 %

#### 13.2. Réactivité croisée

Divers organismes pathogènes ont été analysés avec RIDASCREEN® Legionella ELISA et n'ont affiché aucune réactivité croisée, sauf pour *S. aureus*. Ces études ont été réalisées avec des suspensions de bactéries dont les concentrations étaient de 10<sup>6</sup> à 10<sup>9</sup> organismes par ml. Les surnageants et antigènes de la culture de virus sont également indiqués. Les résultats de cette étude sont indiqués dans le tableau 2.

Tableau 2 : Réactivité croisée avec des micro-organismes pathogènes

Organisme	Origine	Valeur moyenne [DO 450/620]
Adénovirus	Surnageant de culture cellulaire	0.005
<i>Bacillus cereus</i>	Culture	0.118
<i>Campylobacter coli</i>	Culture	0.131

<i>Campylobacter jejuni</i>	Culture	0.068
<i>Candida albicans</i>	Culture	0.043
<i>Candida glabrata</i>	Culture	0.023
<i>Citrobacter freundii</i>	Culture	0.047
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	Culture	0.003
<i>Enterobacter cloacae</i>	Culture	0.046
<i>Enterococcus faecalis</i>	Culture	0.097
<i>Escherichia coli</i>	Culture	0.057
<i>Haemophilus influenzae</i>	Culture	0.019
Influenza A/Beijing	Antigène pour ELISA	0.011
Influenza A/Sydney	Antigène pour ELISA	0.010
Influenza B/Harbin	Antigène pour ELISA	0.020
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Culture	0.035
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Antigène pour ELISA	0.022
Virus parainfluenza	Antigène pour ELISA	0.093
<i>Proteus mirabilis</i>	Culture	0.020
<i>Proteus vulgaris</i>	Culture	0.038
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Culture	0.023
Virus respiratoire syncytial	Antigène pour ELISA	0.050
<i>Serratia liquefaciens</i>	Culture	0.066
<i>Serratia marcescens</i>	Culture	0.007
<i>Staphylococcus aureus</i>	Culture	3.579
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Culture	0.041
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Culture	0.020
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Culture	0.049
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Culture	0.045

### 13.3. Précision

La reproductibilité du test RIDASCREEN® Legionella ELISA a été étudiée avec six références qui couvrent l'ensemble de la plage de mesure des valeurs faiblement à fortement positives. 40 répétitions de ces références ont été analysées pour déterminer la reproductibilité intra-test. Les valeurs moyennes et les coefficients de variation (CV) ont été déterminés pour trois lots. Pour ce qui est de la reproductibilité intra-test, les références de 10 jours de travail différents ont été mesurées en double, avec 2 passages par jour. Les mesures ont été effectuées en 3 lots par 6 techniciens. La reproductibilité inter-lots a été déterminée pour les 3 lots. Les résultats sont indiqués dans le tableau 3.

Tableau 3 : Résultats relatifs à la reproductibilité/précision du test RIDASCREEN® Legionella ELISA

Référence Valeur moyenne/CV		Intra-test			Inter-tests			Inter-lots
		Lot de la trousse 1	Lot de la trousse 2	Lot de la trousse 3	Lot de la trousse 1	Lot de la trousse 2	Lot de la trousse 3	Lots des trousses 1 à 3
1	VM	3.015	3.248	2.900	2.780	2.499	2.573	2.617
	CV (%)	2,94 %	4,71 %	3,88 %	11,54 %	12,15 %	7,19 %	11,73 %
2	VM	2.702	2.868	2.674	2.515	2.180	2.305	2.333
	CV (%)	4,78 %	8,70 %	4,55 %	12,63 %	15,27 %	8,54 %	14,12 %
3	VM	1.559	1.460	1.412	1.354	1.094	1.210	1.219
	CV (%)	5,99 %	9,65 %	5,42 %	17,73 %	15,94 %	10,38 %	18,34 %
4	VM	0.838	0.701	0.725	0.672	0.513	0.587	0.591
	CV (%)	4,75 %	9,72 %	6,08 %	19,99 %	17,46 %	11,67 %	21,51 %
5	VM	0.759	0.618	0.726	0.593	0.449	0.504	0.515
	CV (%)	11,11 %	9,09 %	7,41 %	22,56 %	21,44 %	13,76 %	24,10 %
6	VM	0.003	0.000	0.007	0.008	0.001	0.008	0.006
	CV (%)	s/o						

#### 13.4. Sensibilité analytique

Afin de déterminer la sensibilité analytique du test RIDASCREEN® Legionella ELISA, la limite du blanc (LB) a été déterminée avec 270 tests d'échantillons d'urine négatifs et la limite de détection (LD) a été analysée dans 90 tests. Les résultats de ces mesures sont indiqués dans le tableau 4.

Tableau 4 : Résultats relatifs à la sensibilité analytique du test RIDASCREEN® Legionella ELISA

	VM [DO 450/620]	ng/mL
LB	0.041	–
LD	0.060	1.5

### 13.5. Substances interférentes

Les substances mentionnées ci-dessous n'ont pas présenté d'effet sur les résultats du test lorsqu'elles ont été mélangées dans les échantillons d'urine positifs et négatifs pour le la légionelle dans les concentrations indiquées:

Sang humain (10 % v/v), amoxicilline (antibiotique ; 0,72 % m/v), paracétamol (analgésique; 1,08 % m/v), sirop contre la toux contenant de la codéine (0,25 % v/v), albumine (0,5 % m/v), glucose (2 % m/v), acide ascorbique (vitamine C ; 0,1 % m/v), bilirubine (0,02 % m/v), acide borique (0,26 % m/v), érythromycine (antibiotique ; 0,06 % v/v). La lévofloxacine a présenté une réduction dépendante de la dose des valeurs de DO en cas de mélange avec de l'urine à une concentration correspondant à 2 ou 3 fois la dose quotidienne.

## Annexe

Symboles spécifiques au test :

Plate	Microplaque
Wash	Tampon de lavage
Control   +	Contrôle positif
Control   -	Contrôle négatif
Conjugate   1	Conjugué 1
Conjugate   2	Conjugué 2
Substrate	Substrat
Stop	Réactif d'arrêt

## Bibliographie

1. Howden BP et al. Treatment and outcome of 104 hospitalized patients with Legionnaires' disease. *Internal Medicine Journal*. 2003, 33(11):484–488.
2. Benin AL et al. An outbreak of travel-associated Legionnaires' disease and Pontiac fever: the need for enhanced surveillance of travel-associated legionellosis in the United States. *Journal of Infectious Diseases*. 2002, 185(2):237–243.
3. Bartram et al. Legionella and the prevention of Legionellosis. 2012, World Health Organisation (WHO).
4. Joseph C et al. Surveillance of Legionnaires disease in Europe. *Legionella*, Washington DC, ASM Press. 2002, 311–320.
5. Berdal BP et al. Detection of Legionella pneumophila antigen in urine by enzyme-linked immunospecific assay. *J.Clin.Microbiol.* 1979 (9): 575-578
6. Kohler RB et al. onset and duration of urinary antigen excretion in Legionnaires' disease. *J.Clin.Microbiol.* 1984 (20) 605-607