

# RIDASCREEN<sup>®</sup> Legionella

Art. N.: C8001



R-Biopharm AG An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Germania

Telefono: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



## 1. Campo di applicazione

Per uso diagnostico *in vitro*. RIDASCREEN® Legionella è un dosaggio immunoenzimatico per la rilevazione qualitativa degli antigeni di *Legionella pneumophila* nei campioni di urina.

## 2. Sintesi e spiegazione del test

Il ceppo della *Legionella* appartiene alla famiglia delle *Legionellaceae* ed è suddiviso in 40 specie con oltre 70 sierogruppi. I batteri Legionella sono batteri facoltativi, intracellulari gram-negativi il cui tasso d'infezione raggiunge il picco d'estate e all'inizio dell'autunno. Con la malattia del legionario si distingue tra infezioni acquisite esternamente a causa di viaggi e infezioni nosocomiali. Negli Stati Uniti, il tasso di mortalità delle infezioni nosocomiali è del 15 - 20%.<sup>1,2</sup> In Europa, il 12% di tutti i casi della malattia del legionario è fatale. Il gran numero di specie di *Legionella* ne include due che sono importanti patogeni umani. L'infezione da *L. pneumophila* dà origine principalmente alla malattia del legionario (nota anche come legionellosi) e quella da *L. longbeachae* provoca la febbre di Pontiac. La febbre di Pontiac è una malattia acuta autolimitante simile all'influenza, ma senza l'insorgenza di polmonite. Circa il 7% dei pazienti che soffrono della malattia del legionario sviluppa la febbre di Pontiac.<sup>3</sup>

La *L. pneumophila* ha 16 sierogruppi; più del 70% delle infezioni da *Legionella* in Europa è provocato dal sierogruppo 1 della *L. pneumophila*. Altri ceppi che possono provocare l'infezione da *Legionella* comprendono la *L. micdadei*, la *L. bozemanii*, la *L. dumoffii* e la *L. longbeachae*.<sup>4</sup>

La malattia del legionario è un'infezione respiratoria acuta causata principalmente dalla *L. pneumophila*. Fu descritta per la prima volta nel 1976 durante un congresso a Philadelphia, negli USA, dove la malattia del legionario ricevette il suo nome. Altre due epidemie della malattia del legionario, con un totale di 6 decessi, si verificarono nel 2013 a Brisbane, in Australia, e a Reynoldsburg, in Ohio. I sintomi sono febbre, tosse (secca o produttiva di espettorato) e brividi. Altri sintomi meno frequenti sono diarrea, vomito, bradicardia e iponatremia.<sup>3</sup> Possono essere infettati dalla *malattia del legionario* soggetti di ogni età, ma gli anziani, i fumatori e i pazienti affetti da disturbi polmonari cronici sono più esposti a tale infezione. Perfino in paesi dotati di un sistema sanitario efficiente, fino al 90% dei casi di malattia del legionario non viene diagnosticato poiché i sintomi clinici sono molto vaghi e la patologia si presenta piuttosto raramente. Inoltre, è difficile distinguere la malattia del legionario da altre forme di polmonite unicamente sulla base di sintomi o di esami radiologici.

La rilevabilità molto precoce di antigeni solubili che sono specifici della *Legionella* nell'urina di pazienti affetti dalla malattia del legionario rende l'urina una matrice ideale dell'esame per stadi di legionellosi precoci nonché più avanzati<sup>5,6</sup>. Il test RIDASCREEN® Legionella ELISA è particolarmente adatto alla rilevazione dell'antigene solubile della *Legionella* nell'urina di pazienti che si sono infettati con *Legionella pneumophila* del sierogruppo 1.

## 3. Principio del test

Il test RIDASCREEN® Legionella utilizza anticorpi specifici in un metodo a sandwich. La superficie della piastra da microtitolazione viene rivestita con anticorpi policlonali contro gli antigeni

della Legionella LPS. I campioni di urina e i controlli vengono introdotti mediante pipetta nel pozzetto della piastra da microtitolazione insieme ad anticorpi anti-legionella policlonali biotinilati (Coniugato 1) per l'incubazione a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Dopo il lavaggio aggiungere il poli-coniugato streptavidina-perossidasi (Coniugato 2) e incubare nuovamente a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Se sono presenti antigeni della Legionella, nel campione di urina si forma un complesso a sandwich composto dagli anticorpi immobilizzati, gli antigeni della Legionella e gli anticorpi coniugati con il complesso biotina-streptavidina-perossidasi. Un ulteriore lavaggio rimuove il poli-coniugato streptavidina-perossidasi non legato. Nei campioni positivi, l'aggiunta di un substrato trasforma l'enzima legato da soluzione incolore nei pozzetti della piastra da microtitolazione in una soluzione blu. L'aggiunta di un reagente bloccante causa una variazione cromatica da blu a giallo. L'estinzione è proporzionale alla concentrazione di antigeni di Legionella presenti nel campione.

#### 4. Contenuto della confezione

I reagenti nel kit sono sufficienti per 96 test.

Plate	96	Piastra da microtitolazione, 12 strisce da microtitolazione (separabili) in telaio di fissaggio; rivestimento con anticorpi policlonali contro <i>L.pneumophila</i>
Wash	100 mL	Tampone di lavaggio, soluzione tamponata al fosfato NaCl (concentrazione di 10 volte); contiene lo 0,1% di Thimerosal
Control   +	2 mL	Controllo positivo, antigene di Legionella inattivato; pronto per l'uso
Control   -	2 mL	Controllo negativo; pronto per l'uso
Conjugate   1	13 mL	Anticorpi anti <i>L.pneumophila</i> policlonali biotinilati in soluzione proteica stabilizzata; pronto per l'uso; colorazione in giallo
Conjugate   2	13 mL	Poli-coniugato streptavidina-perossidasi in soluzione proteica stabilizzata, pronto per l'uso, colorazione in arancione
Substrate	13 mL	Perossido di idrogeno/TMB; pronto per l'uso
Stop	12 mL	Reagente di bloccaggio; acido solforico 1 N; pronto per l'uso

#### 5. Istruzioni di conservazione per reagenti

Tutti i reagenti devono essere conservati a 2 - 8 °C e possono essere utilizzati fino alla data stampata sull'etichetta. Se il tampone di lavaggio diluito è conservato a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C, può essere usato per un massimo di 4 settimane. Evitare la contaminazione microbica. Non è possibile accettare garanzie della qualità dopo la scadenza dei reagenti.

La busta in alluminio deve essere aperta con le forbici, in modo tale da non rimuovere la chiusura a clip. Le strisce da microtitolazione inutilizzate devono essere immediatamente riposte nella busta in alluminio e conservate a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C.

Evitare l'esposizione diretta alla luce del substrato incolore, per evitare la decomposizione o la colorazione blu per auto-ossidazione. Un substrato che sia diventato blu non deve essere utilizzato.

## 6. Reagenti necessari ma non in dotazione

### 6.1. Reagenti

- Acqua distillata o deionizzata

### 6.2. Accessori

- Flaconi per campioni
- Vorticatore (opzionale, vedere punto 9.3.)
- Micropipetta da 50 - 100  $\mu$ L
- Cilindro graduato (1000 mL)
- Cronometro
- Dispositivo di lavaggio per piastre da microtitolazione o pipette multicanale (300  $\mu$ L)
- Fotometro per piastre da microtitolazione (450 nm e filtro di riferimento 620 - 650 nm)
- Carta filtrante (carta da laboratorio)
- Contenitore di rifiuti con soluzione di ipoclorito allo 0,5%

## 7. Misure precauzionali

Esclusivamente per uso diagnostico *in vitro*.

Questo test deve essere condotto esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici. Attenersi rigorosamente alle istruzioni per l'uso nell'esecuzione del test.

Non introdurre con la bocca campioni o reagenti mediante pipetta ed evitare il contatto con la cute lesa o con le mucose. Durante la manipolazione dei campioni indossare gli appositi dispositivi di protezione individuale (guanti, camice e occhiali di sicurezza adatti) e lavare le mani dopo aver eseguito il test. Non fumare, mangiare o bere negli ambienti in cui si opera con i campioni.

Per ulteriori informazioni consultare la Scheda di sicurezza dei materiali (MSDS) all'indirizzo [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

Il controllo positivo nel kit contiene antigene di Legionella inattivato che, come il campione del paziente, deve essere trattato come potenzialmente infetto in conformità con le disposizioni di sicurezza nazionali vigenti.

Garantire uno smaltimento idoneo e responsabile di tutti i reagenti e i materiali dopo l'uso. Attenersi alle disposizioni nazionali rilevanti per lo smaltimento.

## 8. Raccolta e conservazione dei campioni

I campioni di urina devono essere raccolti in contenitori standard puliti e possono essere conservati per un massimo di 24 ore a temperatura ambiente o a 2 - 8 °C prima dell'uso. Inoltre, è

possibile la conservazione a 2 - 8 °C per altri 3 giorni. Qualora prima dell'uso sia necessaria una conservazione prolungata, i campioni di urina devono essere conservati a -20 °C.

Evitare il ripetuto congelamento e scongelamento del campione. I campioni di urina non devono essere raccolti in contenitori per il trasporto che contengano mezzi di trasporto come conservanti, sieri animali, ioni metallici, agenti ossidanti e detergenti, in quanto potrebbero crearsi interferenze con il test RIDASCREEN® Legionella ELISA.

## 9. Esecuzione del test

### 9.1. Informazioni generali

Tutti i reagenti e la piastra da microtitolazione **Plate** devono essere portati a temperatura ambiente (20 - 25 °C) prima dell'uso. Le strisce da microtitolazione devono essere rimosse dalla busta in alluminio solo dopo il raggiungimento della temperatura ambiente. Mescolare con cura i reagenti immediatamente prima dell'utilizzo. Dopo l'uso, le strisce da microtitolazione (inserite in buste sigillate) e i reagenti devono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C. Una volta usate, le strisce da microtitolazione non devono essere riutilizzate. I reagenti e le strisce da microtitolazione non devono essere utilizzati se l'imballaggio è danneggiato o i flaconi non sono ermetici.

Evitare il contatto diretto dei campioni con i componenti del kit per evitare la contaminazione incrociata.

Il test non deve essere esposto all'irradiazione solare diretta. Si raccomanda di coprire o sigillare con una pellicola in plastica la piastra da microtitolazione per evitare la perdita per evaporazione.

### 9.2. Preparazione dei campioni

Tutta l'urina deve essere mescolata accuratamente e può poi essere usata per il test senza diluizione.

Eventuali cristalli salini che si presentano durante la conservazione dei campioni di urina devono essere completamente sciolti mediante riscaldamento a 37 °C prima di potere usare l'urina nel test. L'urina che per qualsiasi motivo contenga particelle deve essere filtrata prima dell'uso.

### 9.3. Prima incubazione

Dopo avere inserito un numero sufficiente di pozzetti nel telaio di fissaggio, introdurre 100 µL del controllo positivo **Control +**, del controllo negativo **Control -** o del campione di urina. Quindi aggiungere 100 µL dell'anticorpo biotina-coniugato **Conjugate 1** e miscelare (dando dei leggeri colpi sul bordo della piastra); successivamente incubare per 60 minuti a temperatura ambiente (20 - 25 °C).

### 9.4. Lavaggio

Un accurato lavaggio è importante per ottenere risultati corretti e deve pertanto essere effettuato in stretta conformità con le istruzioni. Il prodotto di incubazione dei pozzetti deve essere svuotato in un contenitore per rifiuti per poi essere smaltito nel rispetto delle disposizioni ufficia-

li. Quindi, picchiettare la piastra per svuotarla su carta assorbente rimuovendo l'umidità residua. Lavare la piastra cinque volte utilizzando 300 µl di tampone di lavaggio ogni volta. Assicurarsi che i pozzetti vengano completamente svuotati picchiettandoli per svuotarli dopo ciascun lavaggio su un'area di carta assorbente ancora asciutta e inutilizzata.

Se si utilizza una lavatrice per micropiastre o un sistema ELISA completamente automatico, assicurarsi che la macchina sia correttamente regolata o, se necessario, chiedere le impostazioni al produttore. I dispositivi forniti da R-Biopharm sono già programmati con le impostazioni e i protocolli di lavoro convalidati. Conformemente alle istruzioni per la preparazione dei campioni (vedere punto 9.2.) dovrebbero essere usati solo campioni di urina privi di particelle per evitare di bloccare gli aghi di lavaggio. Inoltre, assicurarsi che tutto il liquido venga aspirato in ogni fase di lavaggio.

#### 9.5. Seconda incubazione

Utilizzare una pipetta per introdurre 100 µL di poli-coniugato streptavidina-perossidasi **Conjugate | 2** nei pozzetti, quindi incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (20 - 25 °C).

#### 9.6. Lavaggio

Lavare come descritto al punto 9.4.

#### 9.7. Terza incubazione

Iniettare nei pozzetti 100 µl di substrato **Substrate**. Quindi incubare la piastra per 15 minuti al buio a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Successivamente inserire in tutti i pozzetti 50 µL di reagente bloccante **Stop** per arrestare la reazione. Dopo aver accuratamente miscelato picchiettando leggermente sul lato della piastra, misurare l'estinzione a 450 nm (opzionale: 450/620 nm). Regolare il punto zero contro aria, ovvero senza la piastra da microtitolazione.

### 10. Controllo della qualità – indicazioni della scadenza dei reagenti

Per il controllo della qualità eseguire il controllo positivo e negativo ad ogni esecuzione del test al fine di garantire la stabilità dei reagenti e la corretta esecuzione del test. Il test è eseguito correttamente se il tasso di estinzione (OD) del controllo negativo è inferiore a 0,2 a 450 nm (inferiore a 0,160 a 450/620 nm) e il valore misurazione del controllo positivo è superiore a 0,8 a 450 nm o a 450/620 nm. Un valore superiore a 0,2 (0,160) per il controllo negativo può indicare un lavaggio insufficiente. La deviazione dai valori richiesti, proprio come un'opacizzazione o una colorazione blu del substrato incolore prima dell'inserimento nei pozzetti, può indicare che i reagenti sono scaduti.

Se i valori stipulati non vengono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare i seguenti punti:

- Data di scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità dell'attrezzatura utilizzata (ad es. calibrazione)
- Procedura di esecuzione del test corretta

- Controllare visivamente che i componenti del kit non presentino contaminazione o perdite: non utilizzare una soluzione di substrato che sia diventata blu.

Se le condizioni continuano a non essere soddisfatte dopo la ripetizione del test, rivolgersi al produttore o al proprio distributore R-Biopharm locale.

## 11. Valutazione e interpretazione

### 11.1. Calcolo del valore limite

Per stabilire il valore limite, introdurre 0,15 unità di estinzione all'estinzione misurata per il controllo negativo.

$$\text{Valore limite} = \text{tasso di estinzione per il controllo negativo} + 0,15$$

### 11.2. Risultato del test

Il campione è considerato positivo se il tasso di estinzione supera il valore limite calcolato di più del 10 %.

Il campione viene considerato marginale e il test deve essere ripetuto se il tasso di estinzione è compreso tra 10 % in meno e 10% in più rispetto al valore limite. Se l'esame ripetuto con un campione di urina fresco rientra ancora nella zona grigia, il campione deve essere considerato negativo.

I campioni che sono inferiori di oltre il 10 % rispetto al valore limite calcolato devono essere considerati negativi.

## 12. Limiti del metodo

Il test RIDASCREEN® Legionella rileva l'antigene solubile di batteri Legionella in campioni di urina. Non è possibile stabilire una relazione tra il livello di estinzione rilevato e l'insorgenza o la gravità della sintomatologia clinica. I risultati ottenuti devono sempre essere interpretati tenendo conto dei segni e dei sintomi clinici.

Un risultato positivo non esclude la presenza di altri patogeni infettivi.

Un risultato negativo non esclude la possibilità di un'infezione da Legionella. Un risultato simile può essere dovuto a escrezione intermittente dell'agente patogeno nell'urina, oppure è possibile che la quantità di antigene nel campione sia insufficiente. Qualora l'anamnesi dia luogo al sospetto di infezione da *Legionella pneumophila*, l'esame deve essere ripetuto con un altro campione di urina.

Un risultato borderline può essere dovuto a distribuzione non omogenea di antigeni nel campione di urina. In tali casi l'esame deve essere ripetuto con un secondo campione o bisogna richiedere un altro campione dell'urina del paziente per esaminarlo.

### 13. Prestazioni e caratteristiche

#### 13.1. Qualità del test

In uno studio di validazione con RIDASCREEN® Legionella ELISA sono stati esaminati retrospettivamente 100 campioni di urina. Questi campioni sono stati prelevati per una diagnosi di routine condotta dal Laboratorio di riferimento per la Legionella di Dresda, in Germania, dove sono stati poi conservati a -20 °C. Dopo lo scongelamento, i campioni sono stati sottoposti a esame comparativo con RIDASCREEN® Legionella ELISA e con un ulteriore test ELISA commerciale. I risultati di questo studio sono riepilogati nella Tabella 1.

Tabella 1: Correlazione tra RIDASCREEN® Legionella ELISA e un ulteriore test ELISA commerciale

		ELISA	
		Positivo	Negativo
RIDASCREEN® Legionella	Positivo	59	2
	Negativo	4	30

Riscontro positivo: 95,2%

Riscontro negativo: 90,9%

#### 13.2. Reattività incrociata

Vari organismi patogeni sono stati esaminati con RIDASCREEN® Legionella ELISA e non hanno evidenziato alcuna reattività incrociata ad eccezione dello *S. aureus*. Questi studi sono stati condotti con sospensioni batteriche che presentavano una concentrazione da 10<sup>6</sup> a 10<sup>9</sup> per mL. I supernatanti e gli antigeni della coltura virale sono rispettivamente indicati. I risultati di questo studio sono elencati nella Tabella 2.

Tabella 2: Reattività incrociata con microrganismi patogeni

Organismo	Origine	Valore medio [OD 450/620]
Adenovirus	Supernatante di coltura cellulare	0,005
<i>Bacillus cereus</i>	Coltura	0,118
<i>Campylobacter coli</i>	Coltura	0,131
<i>Campylobacter jejuni</i>	Coltura	0,068
<i>Candida albicans</i>	Coltura	0,043
<i>Candida glabrata</i>	Coltura	0,023
<i>Citrobacter freundii</i>	Coltura	0,047
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	Coltura	0,003
<i>Enterobacter cloacae</i>	Coltura	0,046
<i>Enterococcus faecalis</i>	Coltura	0,097
<i>Escherichia coli</i>	Coltura	0,057

<i>Haemophilus influenzae</i>	Coltura	0,019
Influenza A/Pechino	Antigene per ELISA	0,011
Influenza A/Sydney	Antigene per ELISA	0,010
Influenza B/Harbin	Antigene per ELISA	0,020
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Coltura	0,035
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Antigene per ELISA	0,022
Virus della parainfluenza	Antigene per ELISA	0,093
<i>Proteus mirabilis</i>	Coltura	0,020
<i>Proteus vulgaris</i>	Coltura	0,038
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Coltura	0,023
Virus respiratorio sinciziale	Antigene per ELISA	0,050
<i>Serratia liquefaciens</i>	Coltura	0,066
<i>Serratia marcescens</i>	Coltura	0,007
<i>Staphylococcus aureus</i>	Coltura	3,579
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Coltura	0,041
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Coltura	0,020
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Coltura	0,049
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Coltura	0,045

### 13.3. Precisione

La riproducibilità del test RIDASCREEN® Legionella ELISA è stata verificata su sei riferimenti che rappresentano l'intero range di misurazione da debolmente ad altamente positivo. 40 replicati di questi riferimenti sono stati esaminati per la determinazione della riproducibilità intra-analisi. Sono stati determinati i valori medi e i coefficienti di variazione (CV) per tre lotti. Per la riproducibilità inter-analisi, le misurazioni dei riferimenti sono state eseguite in 10 giorni lavorativi diversi con 2 serie al giorno con test doppi. Le misurazioni sono state determinate in 3 lotti da 6 tecnici. La riproducibilità inter-lotto è stata determinata per tutti e 3 i lotti. I risultati sono riportati nella Tabella 3.

Tabella 3: Risultati per la riproducibilità/precisione del test RIDASCREEN® Legionella ELISA

Riferimento		Intra-analisi			Inter-analisi			Inter-lotto
		Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotti kit 1-3
Valore medio / CV								
1	MV	3,015	3,248	2,900	2,780	2,499	2,573	2,617
	VC (%)	2,94%	4,71%	3,88%	11,54%	12,15%	7,19%	11,73%
2	MV	2,702	2,868	2,674	2,515	2,180	2,305	2,333
	VC (%)	4,78%	8,70%	4,55%	12,63%	15,27%	8,54%	14,12%
3	MV	1,559	1,460	1,412	1,354	1,094	1,210	1,219
	VC (%)	5,99%	9,65%	5,42%	17,73%	15,94%	10,38%	18,34%

4	MV	0,838	0,701	0,725	0,672	0,513	0,587	0,591
	VC (%)	4,75%	9,72%	6,08%	19,99%	17,46%	11,67%	21,51%
5	MV	0,759	0,618	0,726	0,593	0,449	0,504	0,515
	VC (%)	11,11%	9,09%	7,41%	22,56%	21,44%	13,76%	24,10%
6	MV	0,003	0,000	0,007	0,008	0,001	0,008	0,006
	VC (%)	non disponibile						

#### 13.4. Sensibilità analitica

Per determinare la sensibilità analitica del test RIDASCREEN® Legionella ELISA è stata eseguita l'analisi del limite di bianco (LoB) in 270 test di campioni negativi di urina, e del limite di rilevazione (LoD) in 90 test. I risultati di queste misurazioni sono presentati nella Tabella 4.

Tabella 4: Risultati per la sensibilità analitica del test RIDASCREEN® Legionella ELISA

	MV [OD 450/620]	ng/mL
LoB	0,041	–
LoD	0,060	1,5

#### 13.5. Sostanze interferenti

Le sostanze incluse nell'elenco seguente non hanno mostrato effetti sui risultati dei test quando miscelate in campioni di urina positivi e negativi alla Legionella nelle concentrazioni descritte:

sangue umano (10 % v/v), amoxicillina (antibiotico; 0,72 % w/v), acetaminofene (analgesico; 1,08 % w/v), sciroppo per la tosse contenente codeina (0,25 % v/v), albumina (0,5 % w/v), glucosio (2 % w/v), acido ascorbico (vitamina C; 0,1 % w/v), bilirubina (0,02 % w/v), acido borico (0,26 % w/v), eritromicina (antibiotico; 0,06 % v/v). La levofloxacina ha evidenziato una riduzione correlata alla dose dei valori OD se mescolata con l'urina in una concentrazione corrispondente a 2 o 3 volte la dose giornaliera.

## Appendice

Simboli specifici nel testo:

Plate	Piastra da microtitolazione
Wash	Tampone di lavaggio
Control   +	Controllo positivo
Control   -	Controllo negativo
Conjugate   1	Coniugato 1
Conjugate   2	Coniugato 2
Substrate	Substrato
Stop	Reagente bloccante

## Riferimenti

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