

The RIVM logo consists of the lowercase letters 'rivm' in a white, sans-serif font, positioned on a solid yellow rectangular background. This yellow rectangle is part of a larger design that includes a blue background at the top and a white background at the bottom, separated by a horizontal line.

Rapport: 703719040/2009
J.A.C. Schalk et al.

Klinische diagnostiek van legionellapneumonie in Nederland

RIVM-rapport 703719040/2009

Klinische diagnostiek van legionellapneumonie in Nederland

J.A.C. Schalk
W.J. Lodder
P. Brandsema
D.W. Notermans
A.M. de Roda Husman

Contact:
J.A.C. Schalk
Laboratorium voor Zoönosen en Omgevingsmicrobiologie
marjolijn.schalk@rivm.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van VROM, in het kader van Monitoring en Handhaving Drinkwaterwet deelproject Evaluatie Regelgeving Legionella, M/703719/08/LH

© RIVM 2009

Delen uit deze publicatie mogen worden overgenomen op voorwaarde van bronvermelding: 'Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), de titel van de publicatie en het jaar van uitgave'.

Rapport in het kort

Klinische diagnostiek van legionellapneumonie in Nederland

Het RIVM heeft een overzicht gemaakt van klinisch diagnostische testen die de aanwezigheid van legionella kunnen aantonen bij mensen met een longontsteking. Het overzicht is gemaakt in opdracht van het ministerie van VROM.

De testen zijn onder te verdelen in serologische testen, urineantigeentesten, kweektesten en moleculaire testen. Elke test heeft mogelijkheden en beperkingen. De urineantigeentest heeft een aantal belangrijke voordelen ten opzichte van de kweek en serologie en wordt daarom in Nederland veel gebruikt om legionella aan te tonen. Zo is het is een snelle en gevoelige methode en het testmateriaal (urine) is makkelijk te verkrijgen. Een nadeel is dat de urineantigeentest niet in alle gevallen van longontsteking die door legionella worden veroorzaakt, de desbetreffende bacterie detecteert. Zo toont hij voornamelijk één serogroep aan, *Legionella pneumophila* serogroep 1. Bovendien hangt de gevoeligheid van de test af van de ernst van de ziekte. Door deze beperkingen wordt de bijdrage van andere legionellasoorten als ziekteverwekker van longontsteking mogelijk onderschat.

De moleculaire test *polymerase chain reaction* (PCR) kan een veelbelovende aanvulling zijn op de urineantigeentest. Met de test kan snel het DNA van legionella in verschillende soorten patiëntenmateriaal (bloed, urine, sputum) worden aangetoond. Daarnaast kunnen hiermee in principe, afhankelijk van de toegepaste PCR-methode, alle legionellasoorten worden aangetoond. Deze methode moet echter nog verder worden geoptimaliseerd. Vooral voor monsters die niet van de longen worden afgenomen moet de gevoeligheid en specificiteit worden verbeterd.

Trefwoorden:
legionellapneumonie, klinische diagnostiek

Abstract

Clinical diagnostics of *Legionella* pneumonia in the Netherlands

The National Institute for Public Health and the Environment (RIVM) has made an overview of clinical diagnostic tests that can detect *Legionella* in patients with pneumonia. The overview was requested by the Ministry of Housing, Spatial Planning and the Environment (VROM).

The tests can be divided into serological tests, urinary antigen tests, culture and molecular tests. Each test has its own advantages and disadvantages. The urinary antigen test has some important advantages over those of serology and culture and is therefore often used in the Netherlands for the detection of *Legionella*. It is an easy, fast and sensitive method and the test material (urine) is easily available. However, the urinary antigen test cannot detect all cases of pneumonia caused by the bacteria *Legionella*. There is only one serogroup of *Legionella* that can be detected, *Legionella pneumophila* serogroup 1. Furthermore, the sensitivity of the test is dependent on the severity of the disease. Because of these limitations, it is possible that the contribution of other *Legionella* species has been underestimated.

The molecular test, polymerase chain reaction (PCR) is a useful supplement to the urinary antigen test. This method can detect the *Legionella* DNA in various kinds of patient materials (blood, urine, sputum) very fast. Furthermore, depending on the method used, all *Legionella* species can be detected. However, PCR does require further optimization, especially for non-respiratory samples, in order to increase sensitivity and specificity.

Key words:

Legionella pneumonia, clinical diagnostics

Dankwoord

Wij willen graag Saskia Rutjes, Ciska Schets en Wim van der Hoek bedanken voor het becommentariëren van het rapport.

Inhoud

Samenvatting	7
1 Inleiding	8
1.1 Incidentie van legionella-pneumonie	8
1.2 Legionella, de veroorzaker van legionella-pneumonie	9
1.3 Doel	9
2 Diagnostische methoden	10
2.1 Serologie	10
2.2 Urineantigeentest	10
2.3 Kweek	11
2.4 PCR	11
3 Legionellapneumoniediagnostiek in Nederland	15
4 Legionella als ziekteverwekker	17
5 Conclusie	18
Literatuur	19
Bijlage 1	23

Samenvatting

De diagnostische testen voor het vaststellen van legionellapneumonie zijn onder te verdelen in serologische testen, urineantigeentesten, kweektesten en PCR-testen. Serologische testen zijn gericht op het aantonen van antilichamen tegen legionella in bloed. Urineantigeentesten zijn gericht op de detectie van legionella-antigenen in urine. Met kweektesten worden legionellabacteriën uit sputum of andere respiratoire monsters opgekweekt. Met PCR-testen kan legionella-DNA worden aangetoond in verschillende patiëntenmaterialen. Met de huidige serologische testen en urineantigeentesten wordt alleen *Legionella pneumophila* aangetoond. Legionellabacteriën die niet tot de *L. pneumophila* soort behoren (*L. non-pneumophila*) worden met deze testen gemist. Met kweektesten en PCR kunnen wel alle legionellasoorten aangetoond worden, dus ook de *L. non-pneumophila*. De urineantigeentest is een snelle en gevoelige methode en het testmateriaal (urine) is makkelijk te verkrijgen; de gevoeligheid hangt af van de ernst van de ziekte. Kweek en serologie hebben als nadeel dat het enige tijd duurt voordat resultaten beschikbaar zijn, waardoor de behandeling van de patiënt mogelijk niet op tijd gestart kan worden. Verder heeft kweek als nadeel dat het benodigde respiratoire patiëntenmateriaal vaak moeilijk te verkrijgen is. PCR is een snelle methode waarmee, afhankelijk van de gebruikte methode, alle legionellasoorten kunnen worden aangetoond. PCR kan worden uitgevoerd op sputum, maar ook op serum en urine. Echter, de resultaten voor gevoeligheid en specificiteit van de toegepaste test verschillen erg tussen laboratoria onderling.

Uit een studie uitgevoerd in 2007 door het RIVM blijkt dat van de diagnostische laboratoria in Nederland die diagnostiek voor legionellapneumonie uitvoeren, 74 % over een urineantigeentest beschikt en 84 % over een kweektest. Slechts 23 % van de diagnostische laboratoria beschikt over PCR. Uit de jaarrapportage respiratoire infectieziekten 2007/2008 blijkt dat in 2007/2008 in 78 % van de gerapporteerde gevallen van legionellapneumonie de diagnose gesteld werd met behulp van de urineantigeentest. Dit geeft aan dat deze test een veel toegepaste methode is voor de diagnostiek van legionellapneumonie. Echter, het is niet bekend of ook andere methoden worden toegepast indien de urineantigeentest een negatief resultaat geeft.

Studies waarbij patiënten met longontsteking zijn onderzocht met behulp van kweek of PCR geven een indruk van de bijdrage van de verschillende legionellasoorten als ziekteverwekker. De resultaten zijn niet eenduidig, maar geven aan dat in Europa 2-11 % van de gevallen van legionellapneumonie mogelijk wordt veroorzaakt door *L. non-pneumophila*. Indien enkel de urineantigeentest wordt toegepast als diagnostische methode zal een deel van de gevallen van legionellapneumonie worden gemist én wordt een onderschatting verkregen van de bijdrage van *L. non-pneumophila* als ziekteverwekker. PCR is een veelbelovende aanvulling op de urineantigeentest waarmee snelle detectie van legionella-DNA mogelijk is in verschillende soorten patiëntenmateriaal. Deze methode behoeft echter nog verdere optimalisatie om de gevoeligheid en specificiteit te verhogen, met name voor niet-respiratoire monsters.

1 Inleiding

Legionellapneumonie (veteranenziekte) is een ernstige vorm van longontsteking, die wordt veroorzaakt door de bacterie legionella. Daarnaast kan legionella ook pontiac fever veroorzaken, een acute griepachtige ziekte. In Nederland heeft legionella veel aandacht gekregen na een uitbraak van legionellapneumonie bij een bloemenshow in Bovenkarspel in 1999 (Den Boer et al., 2002). De laatste jaren is er een toename te zien van het aantal legionellapneumoniepatiënten in Nederland (Dijkstra et al., 2008). In de periode 2005-2008 werden circa 300-400 gevallen van legionellapneumonie gemeld per jaar (Dijkstra et al., 2008).

1.1 Incidentie van legionellapneumonie

In Nederland wordt bij circa 10 % van alle sterftegevallen pneumonie (longontsteking) geregistreerd als doodsoorzaak. Daarmee is pneumonie in Nederland de meest voorkomende doodsoorzaak als gevolg van een infectieziekte. Een pneumonie kan worden veroorzaakt door een scala aan micro-organismen. De meest frequent gevonden ziekteverwekker bij longontsteking die niet in het ziekenhuis is opgelopen (community acquired pneumonia, CAP) is *Streptococcus pneumoniae* (pneumokok). De legionellabacterie is na de pneumokok één van de meest frequent voorkomende bacteriële veroorzakers van pneumonie (Vergis et al., 2000; Van der Eerden et al., 2005; Von Baum et al., 2008). In wetenschappelijke studies waarbij uitgebreide diagnostiek bij CAP-patiënten wordt ingezet, blijft de verwekker echter bij 40-60 % van de patiënten onbekend (Jennings et al., 2008; Van der Eerden et al., 2005; Vila-Corcoles et al., 2009). In de praktijk wordt veel minder diagnostiek verricht; de meeste pneumoniepatiënten worden door hun huisarts gezien en behandeld, waarbij in Nederland in 2007/2008 bij slechts 12 % van deze eerstelijnspatiënten diagnostiek door middel van kweek werd ingezet, terwijl 7 % naar een specialist werd doorverwezen (Dijkstra et al., 2008). Bij het merendeel van de patiënten met pneumonie in de eerste lijn is dus geen diagnostiek verricht en blijft de ziekteverwekker onbekend. Ook bij driekwart van de patiënten die met pneumonie in het ziekenhuis wordt opgenomen blijft de ziekteverwekker onbekend (ICD-code 486).

In een recente prospectieve studie (CAPNETZ, Competence Network for Community Acquired Pneumonia) werd uitgebreide legionelladiagnostiek ingezet bij 2503 CAP-patiënten uit diverse Duitse regio's. Hiervan was 69 % opgenomen in het ziekenhuis. Bij 38,8 % van de totale patiëntenpopulatie werd een pathogeen gevonden en bij 3,8 % van de patiënten werd de diagnose legionellapneumonie vastgesteld (Von Baum et al., 2008). Opmerkelijk is dat het percentage legionellapneumonie bij gehospitaliseerde patiënten even hoog was als bij patiënten zonder ziekenhuisopname. Vaak werd aangenomen dat een legionellapneumonie ernstig verloopt en in de meeste gevallen tot ziekenhuisopname zal leiden. Deze studie geeft aan dat de huisarts ook veel patiënten met een legionellapneumonie ziet, zonder dat herkend wordt dat het een legionellapneumonie betreft. De patiënten zonder ziekenhuisopname waren gemiddeld jonger, even vaak man als vrouw, hadden minder vaak onderliggende aandoeningen, een milder ziekteverloop en ontvingen vaker afdoende antibiotische behandeling dan de patiënten met ziekenhuisopname. Extrapolatie van de resultaten van de CAPNETZ-studie naar de Nederlandse situatie zou betekenen dat circa 1000 patiënten jaarlijks met een legionellapneumonie in het ziekenhuis worden opgenomen en 3000 tot 6000 patiënten zich met een legionellapneumonie bij de huisarts melden (Versteegh et al., 2009). Met de huidige gegevens verkregen in de routine surveillance van legionellapneumonie in Nederland is het niet mogelijk aan te geven hoe groot de werkelijke ziektelast door legionella is, aangezien bij de meeste patiënten geen

uitgebreide diagnostiek wordt gedaan. Wel lijkt het aannemelijk dat het aantal patiënten groter zou kunnen zijn dan de 300 tot 400 patiënten die jaarlijks worden gemeld (Versteegh et al., 2009).

1.2 Legionella, de veroorzaker van legionellapneumonie

Het genus *Legionella*, de veroorzaker van legionellapneumonie, omvat op het ogenblik ten minste vijftig soorten met zeventig afzonderlijke serogroepen. Deze soorten worden in Tabel 1 opgesomd, waarbij onderscheid wordt gemaakt tussen soorten die geassocieerd zijn met klinische gevallen en soorten die dit vooralsnog niet zijn (naar WHO, 2007). Bij *L. pneumophila* worden zestien serogroepen onderscheiden. De soorten *L. bozemanii*, *L. longbeachae*, *L. hackeliae*, *L. sainthelensi*, *L. spiritensis*, *L. erythra*, *L. quinlivanii* en *L. londiniensis* omvatten twee serogroepen. Van de resterende soorten is één serogroep bekend (WHO, 2007).

Tabel 1 Onderverdeling van legionellasoorten naar associatie met klinische gevallen

Legionellasoorten, geassocieerd met klinische gevallen
<i>L. anisa</i> , <i>L. birminghamensis</i> , <i>L. bozemanii</i> , <i>L. cincinnatiensis</i> , <i>L. dumoffii</i> , <i>L. erythra</i> , <i>L. feeleei</i> , <i>L. gormanii</i> , <i>L. hackeliae</i> , <i>L. jordanis</i> , <i>L. lansingensis</i> , <i>L. longbeachae</i> , <i>L. maceachernii</i> , <i>L. micdadei</i> , <i>L. oakridgensis</i> , <i>L. parisiensis</i> , <i>L. pneumophila</i> , <i>L. sainthelensi</i> , <i>L. tusconensis</i> , <i>L. wadsworthii</i>
Legionellasoorten, <u>niet</u> geassocieerd met klinische gevallen
<i>L. adalaidensis</i> , <i>L. beliardensis</i> , <i>L. brunensis</i> , <i>L. busanensis</i> , <i>L. cherii</i> , <i>L. drozanskii</i> , <i>L. drancourtii</i> , <i>L. fairfieldensis</i> , <i>L. fallonii</i> , <i>L. geestiana</i> , <i>L. genomospecies 1</i> , <i>L. gratiana</i> , <i>L. gresilensis</i> , <i>L. israelensis</i> , <i>L. jamestowniensis</i> , <i>L. londiniensis</i> , <i>L. lytica</i> (comb. nov.), <i>L. moravica</i> , <i>L. nautarum</i> , <i>L. quateirensis</i> , <i>L. quinlivanii</i> , <i>L. rowbothamii</i> , <i>L. rubrilucens</i> , <i>L. santicrucis</i> , <i>L. shakespearei</i> , <i>L. spiritensis</i> , <i>L. steigerwaltii</i> , <i>L. taurinensis</i> , <i>L. waltersii</i> , <i>L. worsleiensis</i>

In Europa worden de meeste ziektegevallen als gevolg van infectie met legionella veroorzaakt door *L. pneumophila*-serogroep 1 (70 %). De overige serogroepen van *L. pneumophila* zijn verantwoordelijk voor 20-30 % van de ziektegevallen en waarschijnlijk wordt 5-10 % van de infecties veroorzaakt door *L. non-pneumophila*-soorten (Joseph, 2004). In Australië en Nieuw-Zeeland wordt ongeveer 30 % van de ziektegevallen veroorzaakt door *L. longbeachae*, afkomstig uit potgrond (Yu et al., 2002). Het is niet uit te sluiten dat een vertekend beeld wordt verkregen van de legionellasoorten die ziekte veroorzaken doordat met diagnostische methoden bepaalde legionellasoorten beter kunnen worden aangetoond dan andere.

1.3 Doel

Deze studie is een inventarisatie van de momenteel toegepaste methoden voor klinische diagnostiek van legionellapneumonie in Nederland en de mogelijkheden en beperkingen van deze methoden, waarbij met name aandacht is besteed aan de legionellasoorten die met de verschillende methoden gedetecteerd kunnen worden. Hierbij is wat dieper ingegaan op de ontwikkelingen op het gebied van de moleculaire methode *polymerase chain reaction* (PCR) als diagnostische methode voor detectie van legionella.

2 Diagnostische methoden

Longontsteking als gevolg van een legionellabesmetting is op basis van symptomen niet te onderscheiden van longontsteking veroorzaakt door andere ziekteverwekkers (Mulazimoglu en Yu, 2001). Voor een adequate behandeling van legionellapneumonie met specifieke antibiotica is het belangrijk dat de juiste diagnose snel kan worden gesteld (Heath et al., 1996). Een diagnostische methode moet dus vroeg in het ziekteproces ingezet kunnen worden en snel resultaat opleveren. Er zijn momenteel verschillende diagnostische methoden voor legionellapneumonie beschikbaar, die onder te verdelen zijn in: serologische testen, urineantigeentesten, kweek- en PCR-testen (gereviewd door Den Boer en IJzerman, 2004; WHO, 2007; Diederer, 2008^b). Omdat longontsteking door verschillende pathogenen kan worden veroorzaakt, is het bij diagnostische methoden voor legionellapneumonie uitermate belangrijk dat geen kruisreactie wordt verkregen met andere micro-organismen, met andere woorden dat de methode een hoge specificiteit heeft. Daarnaast is de gevoeligheid van de methode van belang, dat wil zeggen dat bij een patiënt met legionellapneumonie ook inderdaad een positief testresultaat wordt verkregen. Hiermee hangt samen dat het wenselijk is dat met de gebruikte methode alle legionellasoorten aangetoond kunnen worden. Verder is het van belang dat het patiëntenmateriaal dat nodig is voor de methode makkelijk te verkrijgen is.

2.1 Serologie

Serologische methoden zijn gericht op het aantonen van antilichamen tegen legionella in het bloed van patiënten. De testen berusten op indirecte immunofluorescentie assay (IFA, McDade et al., 1977), microagglutination test (MAT, Farshy et al., 1978; Harrison en Taylor, 1982) of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, Farshy et al., 1978). De diagnose legionellapneumonie wordt gesteld indien er een viervoudige stijging in anti-legionella-antilichamen wordt waargenomen of indien er seroconversie plaatsvindt. Het is dus van belang dat één bloedmonster vroeg genoeg wordt genomen wanneer er nog geen stijging in antilichamen heeft plaatsgevonden, en één op het moment dat de stijging hoog genoeg is. Een nadeel van serologische testen is dat pas enkele weken na het optreden van de eerste symptomen antilichamen zijn aan te tonen in het bloed van de patiënt, terwijl voor een goede behandeling van legionellapneumonie een snelle diagnose gewenst is. Dit beperkt het klinisch nut van de serologische test. De gevoeligheid van serologische testen varieert van 70-90 % (WHO, 2007). Serologische testen zijn gericht op de detectie van antilichamen tegen *L. pneumophila*-serogroep 1. De gevoeligheid en specificiteit van serologische testen voor andere legionellasoorten - en serogroepen is niet uitgebreid onderzocht (Murdoch, 2003).

2.2 Urineantigeentest

De urineantigeentest is een zeer snelle methode waarmee *L. pneumophila*-serogroep 1 antigenen in urine van de patiënt kunnen worden aangetoond. Detectie is soms al mogelijk vanaf dag één na het optreden van de eerste ziekteverschijnselen. Methoden die berusten op detectie van urineantigeen zijn enzyme immunoassay (EIA) methoden (Berdal et al., 1979) of immunochromatographische (ICT) methoden (Wever et al., 2003). Met name ICT-testen zijn snel en eenvoudig uit te voeren. De meeste urineantigeentesten kennen een gevoeligheid van 75-99 % en een specificiteit van nagenoeg 100 % (WHO, 2007). De gevoeligheid van de urineantigeentest blijkt wel afhankelijk van de ernst van de ziekte; bij een milder verlopend ziektebeeld is de test minder gevoelig (40-53 %, IJzerman et al., 2002;

Lück et al., 2008). Concentratie van het urinemonster verhoogt de testgevoeligheid, met name voor de patiënten met een minder ernstig ziektebeeld (IJerman et al., 2002). De bestaande urineantigeentesten zijn met name gevoelig voor detectie van *L. pneumophila*-serogroep 1 (Plouffe et al., 1995; Dominguez et al., 1999). De gevoeligheid voor andere *L. pneumophila*-serogroepen varieert van 14-69 % (gereviewd door Den Boer en IJerman, 2004). Bij legionellabacteriën die niet tot de *L. pneumophila* soort behoren (*L. non-pneumophila*) is de test vrijwel altijd negatief (Benson et al., 2000; Okada et al., 2002). Met het invoeren van de urineantigeentest in de jaren negentig van de vorige eeuw is er dan ook een toename te zien in de diagnose van legionellapneumonie veroorzaakt door *L. pneumophila*-serogroep 1 (Ricketts en Joseph, 2005; Benin et al., 2002).

2.3 Kweek

De kweektest voor legionella wordt uitgevoerd met Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) agar-platen met hieraan toegevoegd α -ketoglutarate (Feeley et al., 1979; Pasculle et al., 1980). Antibiotica worden eventueel aan de platen toegevoegd om de groei van andere bacteriën of gist te remmen (Edelstein, 1981). Een belangrijk voordeel van de kweektest is dat isolaten van de legionellabacteriën worden verkregen, die vervolgens verder getypeerd kunnen worden. Dit is van belang bij het opsporen en elimineren van infectiehaarden om zo meer ziektegevallen te kunnen voorkomen (Bencini et al., 2005). De kweektest wordt uitgevoerd met sputum of andere respiratoire monsters, zoals broncho-alveolaire lavage (BAL)-vloeistof. Een probleem hierbij is dat minder dan 50 % van de patiënten spontaan geschikt sputum ophoest (Murdoch, 2003), waardoor diagnose via een kweektest op sputum vaak niet uitvoerbaar is. Overige respiratoire monsters worden verkregen via invasieve technieken, wat belastend is voor de patiënt. Een nadeel van de kweektest is dat de test relatief lang duurt; pas drie tot tien dagen na het inzetten van de test zijn duidelijke kolonies zichtbaar. De kweektest heeft een hoge specificiteit van 100 %. De gevoeligheid van kweektesten is wisselend (zie Tabel 2).

Antibioticagebruik door de patiënt voor afname van materiaal kan, afhankelijk van het middel, het kweekresultaat beïnvloeden. Met de kweekmethode kunnen alle tot nu toe bekende en mogelijk onbekende legionellasoorten worden aangetoond, echter er is verschil in groei-efficiëntie op BCYE-platen tussen verschillende legionellasoorten. Lee et al. (1993) hebben de groei van 28 legionellasoorten op verschillende BCYE-media vergeleken. Hieruit blijkt dat *L. pneumophila* het beste groeit op BCYE-platen. Zes soorten *L. non-pneumophila* (*L. birminghamensis*, *L. cherii*, *L. cincinnatiensis*, *L. santacrucis*, *L. steigerwaltii* en *L. longbeachea*) groeiden slecht op alle geteste media. Verder bleken *L. santacrucis*, *L. rubrilucens* en *L. erythra* slecht te groeien op platen waar het antibioticum vancomycine aan was toegevoegd en 11 van de 27 geteste *L. non-pneumophila* soorten groeiden niet op platen met cefamandole (Lee et al., 1993).

2.4 PCR

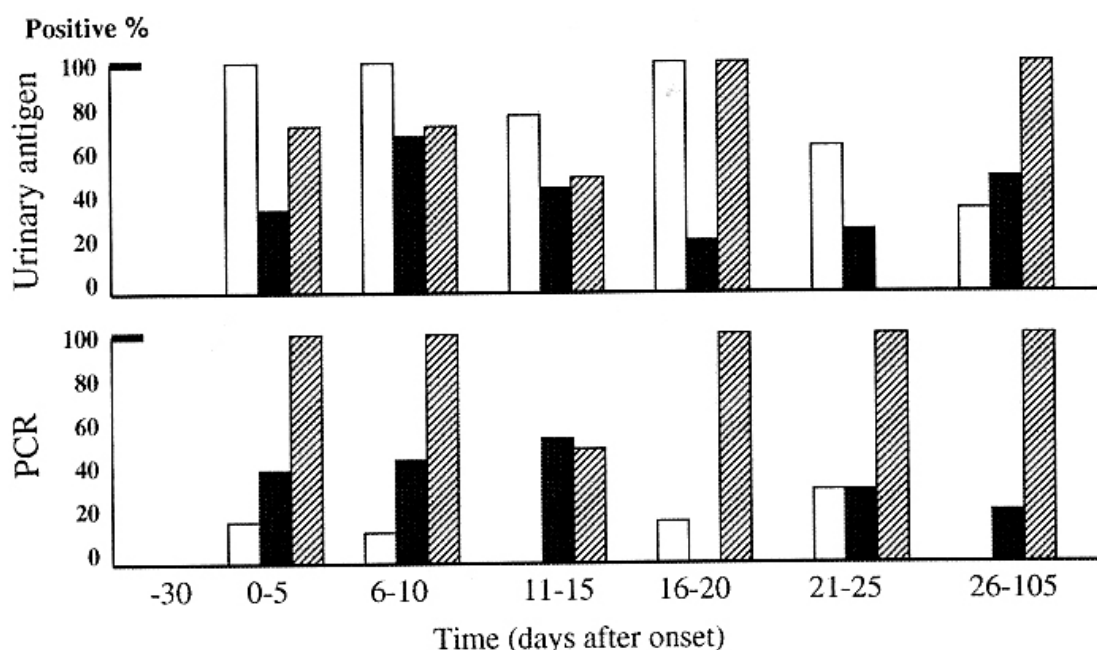
PCR-detectie van legionella-DNA is een methode die nog volop in ontwikkeling is en waarvoor nog maar weinig commerciële kits verkrijgbaar zijn. In de literatuur worden veel verschillende methoden voor PCR-detectie van legionella ten behoeve van klinische diagnostiek beschreven (gereviewd door Den Boer en IJerman, 2004 en Diederiksen, 2008^b). Het principe van PCR-detectie van legionella-DNA is vermeerdering (amplificatie) van een specifiek stuk DNA van het legionellagenoom via een enzymatische reactie tot een hoeveelheid die gedetecteerd kan worden. Door het gebruik van twee selectieve primers, een sense en antisense primer, wordt specifiek het tussenliggende DNA-fragment geamplificeerd met behulp van het enzym Taq-polymerase. De keuze van de primers bepaalt welk fragment van het genoom geamplificeerd wordt. Is de locatie van de primers gelegen in een

geconserveerd fragment van het genoom dan zullen veel verschillende legionellasoorten kunnen worden gedetecteerd. Als gekozen wordt voor primers die een variabel deel van het genoom amplificeren kunnen specifiek bepaalde legionellasoorten gedetecteerd worden. Zo zullen PCR-methoden die gericht zijn tegen het 5S, 16S of 23 S rRNA gen de meeste legionellasoorten kunnen detecteren. Met PCR-methoden die als target het *mip*-gen hebben kan specifiek bijvoorbeeld *L. pneumophila* worden gedetecteerd.

Het geamplificeerde DNA kan op verschillende manieren gedetecteerd worden. Bij de conventionele PCR worden de verkregen PCR-producten aan het eind van de reactie geanalyseerd door middel van agarose-gelelectroforese (eindpuntdetectie). Hierbij worden PCR-producten gescheiden op grootte. De producten kunnen vervolgens zichtbaar worden gemaakt door kleuring met bijvoorbeeld SYBR-gold. Door deze kleuring worden alle nucleïnezuren aangekleurd, zowel de specifieke amplificaten als de bijproducten. Een specifieke detectiemethode wordt verkregen door het DNA uit de gel over te brengen op een filter (Southern blot), waarna het DNA gedetecteerd kan worden door te hybridiseren met een specifieke probe. De gehybridiseerde probe kan vervolgens zichtbaar gemaakt worden door de probe te incuberen met een geschikt substraat, waardoor een chemiluminescerend signaal ontstaat dat gedetecteerd kan worden. Naast de eindpuntdetectiemethoden kunnen PCR-fragmenten ook 'real-time' gedetecteerd worden. Tijdens de amplificatiereactie wordt het DNA fluorescerend gelabeld. De fluorescentie wordt direct gemeten en uitgezet in een grafiek. Als voldoende fluorescerende kopieën zijn ontstaan zal de fluorescentie boven het achtergrondniveau uitstijgen en zal een toename in fluorescentie zichtbaar worden, meestal vanaf ongeveer 10^{11} kopieën. Ook bij real-time-detectie kan gebruikgemaakt worden van kleurstoffen die nucleïnezuren aankleuren, bijvoorbeeld SYBR-green, of van probes die gaan fluoresceren nadat ze gehybridiseerd zijn met een specifiek stuk DNA. Voordeel is dat de real-time-PCR-methode snel is en beduidend minder arbeidsintensief dan de conventionele PCR-technieken. Recente studies met real-time-PCR-technieken voor legionella tonen aan dat deze technieken een redelijke gevoeligheid en hoge specificiteit bezitten (gereviewd door Den Boer en IJzerman, 2004). Interne controles kunnen worden gebruikt om de aanwezigheid van PCR-remmende factoren in het monster uit te sluiten.

In multiplex PCR-methoden worden meerdere primers en probes, specifiek voor meerdere typen bacteriën en/of virussen gecombineerd in één PCR-reactie, zodat de aanwezigheid van verschillende pathogenen gelijktijdig onderzocht kan worden (Templeton et al., 2003; Sung et al., 2009).

PCR-detectie van legionella-DNA in respiratoire monsters heeft een hoge specificiteit en gevoeligheid van respectievelijk 94-99 % en 85-92 % (WHO, 2007). Echter, zoals eerder vermeld, zijn respiratoire monsters vaak moeilijk te verkrijgen. Veelbelovend is dan ook de detectie van legionella-DNA in andere patiëntenmaterialen, zoals urine en serum (gereviewd door Den Boer en IJzerman, 2004 en Diederens, 2008^b). Lindsay et al. (2004) vinden met een conventionele PCR gericht op het 5S rRNA gen een piek in legionella-DNA in het serum, zes tot tien dagen na het begin van de ziekte. Deze piek correspondeert met de urineantigeenpiek. Diederens et al. (2006) tonen met behulp van een real-time-PCR gericht tegen het 5S rRNA gen, voor twee legionellapneumoniepatiënten, een correlatie aan tussen ernst van de ziekte gedurende de behandeling en legionella-DNA in serum. De gevoeligheid voor PCR in serum en urine is 33-70 % (WHO, 2007) en is lager dan de gevoeligheid voor respiratoire samples. Koide et al. (2006) hebben de gevoeligheid van een PCR gericht op het 5S rRNA gen in serum, urine en respiratoire monsters van 33 patiënten vergeleken met de gevoeligheid van de urineantigeentest gedurende het ziekteverloop (zie Figuur 1). De gevoeligheid van PCR op respiratoire monsters is hoger dan de gevoeligheid van de urineantigeentest en eveneens hoger dan de gevoeligheid van PCR op serum en urine. Een piek van het legionella-DNA in serum is te zien elf tot vijftien dagen na het begin van de ziekte (Figuur 1).



Figuur 1 Vergelijking van gevoeligheid van urineantigeentest (boven) en PCR (onder) voor detectie van legionella in urine, serum en respiratoire monsters gedurende het verloop van de ziekte. Open balk: urine, dichte balk: serum, gestreepte balk: respiratoir (Koide et al., 2006)

Een nadeel van PCR is dat er grote verschillen zijn in gevoeligheid en specificiteit tussen laboratoria (Den Boer en IJzerman, 2004; Murdoch, 2003). Verder is de specificiteit van de PCR vaak lager dan 99 % waardoor fout-positieve resultaten worden verkregen (Cloud et al., 2000; Mendonca et al., 2006; Den Boer en IJzerman, 2004). Echter, het is vaak onduidelijk of dit daadwerkelijk fout-positieven zijn of dat de referentie methode faalt (Diederer et al., 2008^b). Het is mogelijk dat de gevoeligheid van PCR lager is voor patiënten met een milder ziekteverloop, echter dit is niet uitgebreid onderzocht (Diederer et al., 2007).

In Tabel 2 zijn de eigenschappen van de bestaande diagnostische methoden met elkaar vergeleken.

Tabel 2 Eigenschappen van diagnostische methoden voor legionellapneumonie

	Patiëntenmateriaal	Legionellasoort	Gevoeligheid ^a	Specificiteit ^a
Serologie	Serum,	<i>L. pneumophila</i>	70-90 %	95-99 %
UAG	Urine	<i>L. pneumophila</i>	75-99 %	99-100 %
Kweek	Sputum	<i>Legionella</i> spp.	5-70 %	100 %
	BAL		30-90 %	100 %
PCR	Respiratoire monsters,	<i>Legionella</i> spp., <i>L. pneumophila</i>	85-92 %	94-99 %
	Serum, urine	<i>Legionella</i> spp., <i>L. pneumophila</i>	33-70 %	98 %

Legionella spp.; *Legionella* species (alle legionellasoorten) ^a WHO, 2007

Met name de urineantigeentest heeft een aantal belangrijke voordelen ten opzichte van de overige diagnostische methoden. Ten eerste zijn de antigenen in de urine al snel na het optreden van de eerste ziekteverschijnselen aan te tonen en bovendien heeft de test een korte doorlooptijd waardoor de diagnose snel kan worden gesteld, zodat een adequate behandeling tijdig kan worden gestart. Dit in tegenstelling tot serologie en kweek. Verder is het benodigde patiëntenmateriaal voor de urineantigeentest makkelijk te verkrijgen in tegenstelling tot dat voor kweek. Daarnaast kent de urineantigeentest een hoge specificiteit en een redelijke gevoeligheid. Een nadeel van de methode is echter dat bij legionellapneumonie veroorzaakt door *L. non-pneumophila* de urineantigeentest een negatief resultaat zal geven en in de meeste gevallen ook indien de legionellapneumonie wordt veroorzaakt door *L. pneumophila* anders dan serogroep 1. Bij een milder verlopend ziektebeeld is de gevoeligheid van de test matig. Een tweede diagnostische methode is in bovenstaande gevallen nodig om de diagnose legionellapneumonie te kunnen stellen. In geval van legionellapneumonie veroorzaakt door een *L. non-pneumophila* kan de diagnose alleen gesteld worden met behulp van kweek of met behulp van een PCR-methode gericht op alle legionellasoorten. Omdat PCR een snelle methode is en toegepast kan worden op verschillende soorten patiëntenmateriaal, zoals serum, lijkt PCR een veelbelovende methode voor diagnostiek van legionellapneumonie. Maar PCR heeft nog verdere ontwikkeling om met name de gevoeligheid en specificiteit voor niet-respiratoire monsters te verbeteren.

3 Legionellapneumoniediagnostiek in Nederland

Om een beeld te krijgen van de methoden die worden toegepast voor legionelladiagnostiek in Nederlandse laboratoria is informatie verzameld via verschillende bronnen. In 2007 is door het RIVM in opdracht van het ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport (VWS) een inventarisatie uitgevoerd van laboratoriumdiagnostiek van volksgezondheidsrelevante micro-organismen (Katchaki et al., 2008). In deze inventarisatie is in kaart gebracht welke methoden laboratoria in Nederland ter beschikking hebben om infectieziekten aan te tonen. Hierbij zijn 260 laboratoria, zowel medisch-microbiologische als klinisch-chemische als andere, aangeschreven. Van de 260 laboratoria hebben in totaal 91 geparticipeerd in de inventarisatie, waaronder 86 medisch-microbiologische laboratoria. Onder deze laboratoria is geïnventariseerd welke diagnostische methoden zij in gebruik hebben voor de detectie van 143 voor de openbare gezondheidszorg belangrijke micro-organismen. Aangezien 95 % van de aangeschreven medisch-microbiologische laboratoria hebben deelgenomen aan deze inventarisatie werd een goed beeld verkregen van de beschikbare diagnostische methoden bij de medisch-microbiologische laboratoria in Nederland voor de belangrijkste micro-organismen (Katchaki et al., 2008).

Van de 91 participerende laboratoria gaven 57 laboratoria (63 %) aan te beschikken over diagnostische methoden voor legionella. Hiervan had 84 % de beschikking over een kweekmethode, 74 % een antigeentest, 35 % een serologietest en 23 % een PCR-test (zie Bijlage 1 en Katchaki et al., 2008). De meeste laboratoria die legionella kunnen detecteren beschikken dus over een kweektest en/of een urineantigeentest. Serologie en PCR zijn veel minder gangbaar. Voor niet alle laboratoria die beschikken over een PCR-methode is bekend of de PCR-methode gericht is op alle legionellasoorten of alleen *L. pneumophila*. Op de website van de werkgroep moleculaire diagnostiek (www.wmdi.nl) melden tien laboratoria te beschikken over een legionella-PCR. Bij al deze laboratoria betreft het een *L. pneumophila*-specifieke PCR. Zes van de tien laboratoria beschikken daarnaast ook over een PCR, gericht op alle legionellasoorten.

Uit de jaarrapportage respiratoire infectieziekten 2007/2008 (Dijkstra et al., 2008) is informatie verkregen over de diagnostische methoden die zijn gebruikt bij de vaststelling van legionellose in Nederland (zie Tabel 3). Deze informatie is gebaseerd op gegevens van legionellosemeldingen in OSIRIS. Dit is een elektronisch meldingssysteem voor het doorgeven naar het RIVM van bij de GGD's gemelde infectieziekten.

Tabel 3 Diagnostische methode bij vaststelling diagnose legionellose (Dijkstra et al., 2008)

Methoden van diagnostiek*	2007/2008 n=296	2006/2007 n=459	2005/2006 n=278
Aantonen van antigeen in urine	225 (76,0 %)	383 (83,4 %)	213 (76,6 %)
Kweek	42 (14,2 %)	43 (9,3 %)	19 (6,8 %)
PCR	28 (9,5 %)	36 (7,8 %)	19 (6,8 %)
Eenmalige hoge titerstijging	16 (5,4 %)	33 (7,1 %)	28 (10,1 %)
Viervoudige titerstijging	15 (5,1 %)	18 (3,9 %)	32 (11,5 %)

* Totaal is hoger dan 100 %, omdat bij 18,9 % van de meldingen meer dan 1 laboratoriumtest werd verricht.

In 2007/2008 werd bij 76 % van de legionellosegevallen de diagnose gesteld met behulp van een urineantigeentest, in slechts 14 % van de gevallen met behulp van kweek en in 9,5 % van de gevallen met behulp van PCR (Dijkstra et al., 2008). Dit geeft aan dat de urineantigeentest een veel toegepaste methode is voor de diagnose van legionellapneumonie. Dit komt overeen met het feit dat de meeste diagnostische laboratoria beschikken over een urineantigeentest. De laatste jaren is er zowel in Nederland als in andere Europese landen een toename van diagnostiek met behulp van de urineantigeentest te zien en een afname van diagnostiek met behulp van kweek (Dijkstra et al., 2007, 2008; WHO, 2007). In slechts 18,9 % van de meldingen wordt er meer dan één laboratoriumtest gerapporteerd waarmee de diagnose legionellapneumonie is vastgesteld (Dijkstra et al., 2008). Er is niet onderzocht of andere methoden worden ingezet indien de urineantigeentest een negatief resultaat geeft.

4 Legionella als ziekteverwekker

Studies waarbij patiënten met pneumonie zijn onderzocht via PCR of kweek geven een indruk van de bijdrage van de verschillende legionellasoorten als ziekteverwekker. Van de patiëntisolaten in Nederland uit 2007/2008 die met behulp van kweek waren verkregen en waren geïdentificeerd, betrof het bij 83,3 % van de legionellapneumoniepatiënten een *L. pneumophila*-serogroep 1 en bij 7,1 % een *L. pneumophila* van een andere serogroep. Bij 7,1 % van de isolaten betrof het wel *L. pneumophila*, maar was de serogroep niet gespecificeerd. Bij 2,4 % (één patiënt) betrof het een *L. non-pneumophila* (Dijkstra et al., 2008).

In Nederland hebben Diederens et al. (2008^a) van 149 gehospitaliseerde patiënten met longontsteking uit de periode december 2002 tot november 2005 respiratoire monsters getest via 16S PCR, specifiek voor alle legionellasoorten. Tevens zijn de monsters getest via urineantigeentest en/of kweek. Van deze 149 patiënten waren er 37 positief in de 16S PCR. Hiervan waren 3 monsters fout-positief. Van de overige 34 legionella-PCR-positieve patiënten betrof het slechts bij één patiënt (3 %) een *L. non-pneumophila*, namelijk *L. longbeachae*.

In een Franse studie werd op 259 patiëntisolaten, verkregen via kweek, een legionellatypering en soort-identificatie uitgevoerd. Bij 95,4 % van de isolaten werd *L. pneumophila*-serogroep 1 gevonden, en bij 3,6 % een *L. pneumophila* van een andere serogroep. *L. non-pneumophila* werd bij slechts 1,2 % (drie patiënten) gevonden. Het betrof bij twee patiënten *L. anisa* en bij een patiënt *L. tucsonensis* (Doleans et al., 2004).

Van de 916 legionella-isolaten uit de European Working Group for Legionella Infections (EWGLI)-database die waren verkregen met kweek en waren getypeerd betrof het bij 78,6 % een *L. pneumophila*-serogroep 1, bij 8,2 % een *L. pneumophila* van een andere serogroep en bij 8,4 % een *L. pneumophila* waarvan de serogroep niet bekend was. Bij 15 isolaten (1,6 %) betrof het *L. non-pneumophila* (vijfmaal *L. bozemanii*, tweemaal *L. dumoffi*, eenmaal *L. gormanii*, zesmaal *L. longbeachae* en eenmaal *L. micdadei*) (Ricketts en Joseph, 2005).

In Duitsland is een uitgebreide studie uitgevoerd naar de oorzaak en incidentie van legionellapneumonie in CAP-patiënten, waarbij zowel patiënten die in het ziekenhuis waren opgenomen als patiënten die niet in het ziekenhuis waren opgenomen werden onderzocht (Von Baum et al., 2008). Van de 53 patiënten waarbij legionellapneumonie werd vastgesteld met behulp van kweek en/of PCR betrof het in zes gevallen (11 %) *L. non-pneumophila* (tweemaal *L. anisa*, tweemaal *L. bozemanii*, eenmaal *L. longbeachae* en eenmaal *L. erythra*). In vier gevallen was soort-identificatie niet mogelijk. Het percentage *L. non-pneumophila* is hoger dan het percentage dat in eerdere studies werd gevonden. Het verschil tussen deze studie en eerdere studies (Diederens et al., 2008^a; Ricketts en Joseph, 2005; Doleans et al., 2004) is dat in deze studie ook patiënten zijn betrokken die niet in het ziekenhuis werden opgenomen. Mogelijk dat legionellapneumonie veroorzaakt door *L. non-pneumophila* onder gezonde personen een milder ziekteverloop heeft dan legionellapneumonie veroorzaakt door *L. pneumophila*. Meldingen van legionellapneumonie veroorzaakt door *L. non-pneumophila* bij patiënten die in het ziekenhuis zijn opgenomen betreft vaak immuungecompromitteerden (Muder en Yu, 2002; Harris et al., 1998; Johnson en Huseby, 1997). Patiënten met voorafgaande ziekenhuisopname vanwege immuunonderdrukking waren in deze studie niet opgenomen.

5 Conclusie

Met de in klinische laboratoria gebruikte urineantigeentesten en serologische testen kan alleen legionellapneumonie veroorzaakt door *L. pneumophila* worden vastgesteld. Met kweek- en PCR-testen kunnen de meeste legionellasoorten worden gedetecteerd. Van de 57 laboratoria in Nederland die legionelladiagnostiek uitvoeren beschikt 84 % over een kweekmethode, 74 % over een antigeentest, 35 % over een serologietest en 23 % over een PCR-test. In 2007/2008 werd in Nederland bij 76 % van de legionellapneumonie-gevallen die werden gemeld in OSIRIS de diagnose gesteld met behulp van een urineantigeentest. In slechts 14 % van de gevallen met behulp van kweek en in 9,5 % van de gevallen met behulp van PCR. De urineantigeentest is dus de methode waarmee het meest legionellapneumonie wordt vastgesteld.

Bij legionellapneumonie veroorzaakt door *L. non-pneumophila* zal de urineantigeentest een negatief resultaat geven en in de meeste gevallen ook indien legionellapneumonie wordt veroorzaakt door *L. pneumophila* anders dan serogroep 1. Er is niet onderzocht of er andere methoden worden ingezet indien de urineantigeentest een negatief resultaat geeft. Studies waarbij de diagnose legionellapneumonie wordt gesteld met behulp van kweek of PCR geven geen eenduidig beeld van de bijdrage van *L. non-pneumophila* als ziekteverwekker. Deze varieert van 1-11 % van de legionellapneumonieën. Deze studies laten echter wel zien dat het overgrote deel van de gevallen van legionellapneumonie in Europa veroorzaakt wordt door *L. pneumophila*-serogroep 1 (78,6-95,4 %). De meeste gevallen van legionellapneumonie zullen dus met de urineantigeentest gediagnosticeerd worden. Echter, bij het voornamelijk toepassen van de urineantigeentest is een onderschatting van het aantal gevallen van legionellapneumonie én een onderschatting van de bijdrage van *L. non-pneumophila* als ziekteverwekker te verwachten. Het toepassen van een tweede diagnostische methode dient dus aanbeveling om onderdiagnostiek te verminderen.

Legionellapneumonie veroorzaakt door *L. non-pneumophila* kan alleen worden gediagnosticeerd met behulp van kweek of PCR. Echter, het benodigde patiëntenmateriaal voor kweek is vaak niet beschikbaar. Kweek heeft verder als nadeel de wisselende gevoeligheid per laboratorium. Echter, het verkrijgen van patiënten-isolaten is voor het typeren van de legionellabacteriën die verantwoordelijk zijn voor de pneumonie van essentieel belang en noodzakelijk voor de bronopsporing. Zelfs bij een positieve urineantigeentest zou altijd een kweek op sputum moeten worden ingezet, indien mogelijk (Bencini et al., 2005).

PCR is een veelbelovende methode die nog volop in ontwikkeling is. Met behulp van PCR zouden meerdere legionellasoorten kunnen worden aangetoond en bovendien is PCR een snelle methode die kan worden uitgevoerd op zowel sputum, serum als urine. PCR is niet in alle laboratoria een beschikbare methode en daarbij beschikken sommige laboratoria alleen over een *L. pneumophila* specifieke PCR. PCR-methoden voor het aantonen van legionella hebben een aantal nadelen zoals fout-positieve resultaten en wisselende resultaten tussen laboratoria. De precieze waarde, vooral op niet-respiratoire materialen dient nog verder onderzocht te worden. Indien PCR voor detectie van legionella-DNA in klinische monsters verder geoptimaliseerd en gestandaardiseerd wordt kan het een waardevolle aanvulling zijn op de urineantigeentest.

Literatuur

Von Baum, H., S. Ewig, R. Marre, N. Suttorp, S. Gonschior, T. Welte, C. Lück (2008) for the Competence Network for Community Acquired Pneumonia study Group. Community-acquired *Legionella* pneumonia: new insights from the German Competence Network for Community Acquired Pneumonia. Clin. Infect. Dis. 46: 1356-1364.

Bencini, M.A., E.P.F. IJzerman, J.P. Bruin, J.W. den Boer (2005) Drie patiënten met *Legionella*-pneumonie, in verband gebracht met een sauna, een koeltoren en een caravan in Nederland. Ned. Tijdschr. Geneesk. 149: 1973-1977.

Benin, A.L., R.F. Benson, R.E. Besser (2002) Trends in Legionnaires disease, 1980-1998: declining mortality and new patterns of diagnosis. Clin. Infect. Dis. 35: 1039-1046.

Benson, R.F., P.W. Tang, B.S. Fields (2000). Evaluation of the Binax and Biotest urinary antigen kits for detection of Legionnaires' disease due to multiple serogroups and species of *Legionella*. J. Clin. Microbiol. 38: 2763-2765.

Berdal, B.P., C.E. Farshy, J.C Feely (1979). Detection of *Legionella pneumophila* in urine by enzyme-linked immunospecific assay. J. Clin. Microbiol. 9: 575-578.

Boer, J.W. den, E.P.F. IJzerman, J. Schellekens, K.D. Lettinga, H.C. Boshuizen, J.E van Steenberg, A. Bosman, S. van den Hof, H.A. van Vliet, M.F. Peeters, R.J. van Ketel, P. Speelman, J.L. Kool, M.A.E. Conyn-van Spaendonck (2002) A large outbreak of Legionnaires' disease at a flower show, the Netherlands, 1999. Emerging Infectious Dis 8: 37-43.

Boer, J.W. den, E.P.F. IJzerman (2004) Diagnosis of *Legionella* infection in Legionnaires' disease. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 23: 871-878.

Cloud, J.L., K.C. Carroll, P. Pixton, M. Erali, D.R. Hillyard (2000) Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. J. Clin. Microbiol. 38: 1709-1712.

Diederer, B.M.W., C.M.A. de Jong, J.A.J.W. Kluytmans, A. van der Zee, M.F. Peeters (2006) Detection and quantification of *Legionella pneumophila* DNA in serum: case reports and review of the literature. J. Med. Microbiol. 55: 639-642.

Diederer, B.M.W., J.P. Bruin, J.W. den Boer, M.F. Peeters, E.P.F. IJzerman (2007) Sensitivity of *Legionella pneumophila* DNA detection in serum samples in relation to disease severity. J. Med. Microbiol. 56: 1255.

Diederer, B.M.W., J.A.J.W. Kluytmans, C.M. Vandenbroucke-Grauls, M.F. Peeters (2008^a) Utility of real-time PCR for diagnosis of Legionnaires' disease in routine clinical practice. J. Clin. Microbiol. 46: 671-677.

Diederer, B.M.W. (2008^b) *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. J. Infection 56: 1-12.

Dijkstra, F., A.B. van Gageldonk-Lafeber, P. Brandsema, M. Du Ry van Beest Holle, A. Meijer, I.M. van der Lubben, B. Wilbrink, M.A.B. van der Sande (2007) Jaarrapportage respiratoire infectieziekten 2005/2006. RIVM-briefrapport 210231001, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven.

Dijkstra, F., A.B. van Gageldonk-Lafeber, P. Brandsema, I.H.M. Friesema, M. Robert-Du Ry van Beest Holle, I.M. van der Lubben, B. Wilbrink, A. Meijer, W. van der Hoek, M.A.B. van der Sande (2008) Jaarrapportage respiratoire infectieziekten 2007/2008. RIVM-briefrapport 210231003, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven.

Doleans, A., H. Aurell, M. Reyrolle, G. Lina, J. Freney, F. Vandenesch, J. Etienne, S. Jarraud (2004) Clinical and environmental distributions of *Legionella* strains in France are different. J. Clin. Microbiol. 42: 458-460.

Dominguez, J., N. Gali, L. Matas, P. Pedroso, A. Hernandez, E. Padilla, V. Ausina (1999) Evaluation of a rapid immunochromatographic assay for the detection of *Legionella* antigen in urine samples. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 18: 896-898.

Edelstein, P.H (1981) Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens. J. Clin. Microbiol. 14: 298-303.

Eerden, M.M. van der, F. Vlassembler, C.S. de Graaff, T. Groot, H.M. Jansen, W.G. Boersma (2005) Value of intensive diagnostic microbiological investigation in low- and high-risk patients with community-acquired pneumonia. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 24: 241-249.

Farshy, C.E., G.C. Klein, J.C. Feeley (1978) Detection of antibodies to Legionnaires disease organism by microagglutination and micro-enzyme-linked immunosorbent assay tests. J. Clin. Microbiol. 7: 327-331.

Feeley, J.C., R.J. Gibson, G.W. Gorman, N.C. Langford, J.K. Rasheed, D.C. Machel, W.B. Baine (1979) Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. J. Clin. Microbiol. 10: 437-441.

Harris, A., M. Lally, M. Albrecht (1998) *Legionella bozemanii* pneumonia in three patients with AIDS. Clin. Infect. Dis. 27: 97-99.

Harrison, T.G., A.G. Taylor (1982) A rapid micro agglutination test for the diagnosis of *Legionella pneumophila* (serogroup 1) infection. J. Clin. Pathol. 35: 1028-1031.

Heath, C.H., D.I. Grove, D.F. Looke (1996) Delay in appropriate therapy of *Legionella* pneumonia associated with increased mortality. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 15: 286-290.

IJzerman, E.P., J.W. den Boer, K.D. Lettinga, J. Schellekens, J. Dankert, M. Peeters (2002) Sensitivity of three urinary antigen tests associated with clinical severity in a large outbreak of Legionnaires' disease in the Netherlands. J. Clin. Microbiol. 40: 3232-3236.

Jennings, L.C., T.P. Anderson, K.A. Beynon, A. Chua, R.T.T. Laing, A.M. Werno, S.A. Young, S.T. Chambers, D.R. Murdoch (2008) Incidence and characteristics of viral community acquired pneumonia in adults. Thorax 63: 42-48.

Johnson, K.M., J.S. Huseby (1997) Lung abscess caused by *Legionella micdadei*. Chest 111: 252-253.

Joseph, C.A. (2004) European Working Group for Legionella infections. Legionnaires' disease in Europe 2000-2002. Epidemiol. Infect. 132: 417-424.

Katchaki, J., L.M. Kortbeek, D. Notermans (2008). Een inventarisatie van laboratoriumdiagnostiek van volksgezondheidsrelevante micro-organismen, update 2007. RIVM-rapport 230071001.

Koide, M., F. Higa, M. Tateyama, I. Nakasone, N. Yamane, J. Fujita (2006) Detection of *Legionella* species in clinical samples: comparison of polymerase chain reaction and urinary antigen detection kits. Infection 34: 264-268.

Lee, T.C., R.M. Vickers, V.L. Yu, M.M. Wagener (1993) Growth of 28 *Legionella* species on selective culture media: a comparative study. J. Clin. Microbiol. 31: 2764-2768.

Lindsay, D.J.S., W.H. Abraham, W. Findlay, P. Christie, F. Johnston, G.F.S. Edwards (2004) Laboratory diagnosis of legionnaires' disease due to *Legionella pneumophila* serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods. J. Med. Microbiol. 53: 183-187.

Lück, C., J.H. Helbig, R. Marre, H. von Baum (2008) The usefulness of microbiological diagnostic methods for the detection of *Legionella* infections in the acute phase of illness. 23 EWGLI meeting Madrid 2008.

McDade, J.E., C.C. Shepard, D.W. Fraser, T.R. Tsai, M.A. Redus, W.R. Dowdle (1977) Legionnaires' disease: isolation of bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. N. Engl. J. Med. 297: 1197-1203.

Mendonca, R., P. Wallace, W.G. NacKay, S. Rottiers, S. Crevecoeur, N. Maes, M.J. Struikens (2006) External quality assessment for the detection of *Legionella pneumophila* by nucleic acid amplification technology (NAAT) – a European pilot program, p. 54. Programme and abstracts 21st meet. Eur. Working Group *Legionella* Infect., Lisbon, Portugal.

Muder, R.R., V.L. Yu (2002) Infection due to *Legionella* species other than *L. pneumophila*. Clin. Infect. Dis. 15: 990-998.

Mulazimoglu, L., V.L. Yu (2001) Can Legionnaires disease be diagnosed by clinical criteria? A critical review. Chest 120: 1049-1053.

Murdoch, D.R. (2003) Diagnosis of *Legionella* infection. Clin. Infect. Dis. 36: 64-69.

Okada, C., F. Kura, A. Wada, H. Inagawa, G.H. Lee, H. Matsushita (2002) Cross-reactivity and sensitivity of two *Legionella* urinary antigen kits, Biotest EIA and Binax NOW, to extracted antigens from various serogroups of *L. pneumophila* and other *Legionella* species. Microbiol. Immunol. 46: 51-54.

Pasculle, A.W., J.C. Feeley, R.J. Gibson, L.G. Cordes, R.L. Myerowitz, C.M. Patton, G.W. Gorman, C.L. Carmack, J.W. Ezzell, J.N. Dowling (1980) Pittsburgh pneumonia agent: direct isolation from human lung tissue. J. Infect. Dis. 6: 727-732.

Plouffe, J.F., T.M. File Jr., R.F. Breiman, B.A. Hackman, S.J. Salstrom, B.J. Marston, B.S. Fields (1995) Re-evaluation of the definition of Legionnaires' disease: use of the urinary antigen assay. Community based incidence study group. Clin Infect Dis 20: 1286-1291.

Ricketts, K.D., C.A. Joseph, on behalf of the European Working Group for Legionella Infections (2005) Legionnaires' disease in Europe 2003-2004. Eurosurveillance 10: 256-259.

Sung, R.Y., P.K. Chan, T. Tsen, A.M. Li, W.Y. Lam, A.C. Yeung, E.A. Nelson (2009) Identification of viral and atypical bacterial pathogens in children hospitalized with acute respiratory infections in Hong Kong by multiplex PCR assays. J. Med. Virol. 81: 153-159.

Templeton, K.E., S.A. Scheltinga, P. Sillekens, J.W. Crielaard, A.P. van Dam, H. Goossens, E.C.J. Claas (2003) Development and clinical evaluation of an internally controlled, single-tube multiplex real-time PCR assay for detection of *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species. J. Clin. Microbiol. 41: 4016-4021.

Vergis, E.N., E. Akbas, V.L. Yu (2000) *Legionella* as a cause of severe pneumonia. Semin Respir. Crit. Care Med. 21: 295-304.

Versteegh, J.F.M., P.S. Brandsema, W.J. Lodder, A.M. de Roda Husman, J.A.C. Schalk, N.G.F.M. van der Aa. (2009). Betekenis van Legionella-soorten voor preventiebeleid van leidingwaterinstallaties. RIVM-briefrapport 609715003, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven.

Vila-Corcoles, A., O. Ochoa-Gondar, T. Rodriguez-Blanco, X. Raga-Luria, F. Gomez-Bertomeu, Epivac study Group (2009) Epidemiology of community-acquired pneumonia in older adults: a population-based study. Respir. Med. 103: 309-316.

Wever, P.C., D.W. Notermans, I.I. Tulevski, J.K. Schattenkerk, M.D. de Jong MD (2003) Detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in bronchoalveolar lavage fluid by an immunographic assay. J. Clin. Microbiol. 41: 2265.

WHO, 2007. *Legionella* and the prevention of legionellosis.
www.who.int/water_sanitation_health/emerging/legionella.pdf 21-08-2009

Yu, V.L., J.F. Plouffe, M.C. Pastoris, J.E. Stout, M. Schousboe, A. Widmer, J. Summersquill, T. File, C.M. Heath, D.L. Paterson, A. Cheresky (2002) Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey., J. Infect. Dis. 186: 127-128.

Bijlage 1

Diagnostische methoden voor legionella in Nederlandse laboratoria

Lab. no	Kweek	Antigeen	Serologie	PCR
1	J	NI	N	J
2	J	J	J	NI
3	J	J	J	NI
4	J	NI	NI	NI
5	J	J	NI	NI
6	J	NI	J	NI
7	J	NI	NI	NI
8	NI	NI	NI	J
9	J	J	NI	NI
10	J	N	N	N
11	J	NI	J	NI
12	J	J	N	N
13	J	J	N	N
14	J	J	N	N
15	J	J	NI	NI
16	J	J	N	N
17	J	J	N	J
18	J	J	J	NI
19	J	J	J	NI
20	J	J	J	J
21	J	J	N	J
22	J	NI	NI	NI
23	J	J	NI	NI
24	J	J	J	J
25	J	J	N	N
26	J	J	J	N
27	J	J	J	N
28	N	N	N	N
29	J	J	N	N
30	NI	J	NI	NI
31	J	J	J	J
32	J	J	N	N
33	J	J	N	NI
34	J	NI	NI	NI
35	NI	J	J	J
36	NI	J	J	NI
37	J	J	N	N
38	J	NI	J	J
39	J	J	J	N
40	NI	J	NI	NI
41	J	J	N	N
42	J	J	J	NI
43	NI	J	J	J

44	NI	NI	Ni	NI
45	J	J	J	J
46	J	J	J	J
47	J	NI	NI	NI
48	J	J	J	NI
49	J	J	NI	NI
50	J	J	NI	J
51	J	N	N	N
52	NI	NI	NI	NI
53	J	J	N	N
54	J	J	NI	NI
55	J	J	N	N
56	J	J	N	N
57	J	J	NI	NI

J=ja, N=nee, NI=niet ingevuld. Overgenomen uit Katchaki et al., 2008

RIVM

Rijksinstituut
voor Volksgezondheid
en Milieu

Postbus 1
3720 BA Bilthoven
www.rivm.nl