

Evaluation of an immunochromatographic test for the identification of *Legionella* genus and *Legionella pneumophila* serogroups 1–15 from cultures

Evaluación de un test inmunocromatográfico para la identificación de *Legionella* género y *Legionella pneumophila* serogrupos 1 a 15 desde cultivos

Dear Editor,

Legionella is an important cause of both community-acquired and nosocomial pneumonia. Human infection has two clinical entities: Pontiac Fever (a self-limited flu-like illness) and Legionnaires' Disease (a severe multisystem disease involving pneumonia).¹ The genus *Legionella* (L) includes nearly 60 species with a considerable number of serogroups (J.P. Euzéby: <http://www.bacterio.cict.fr/>). Of all species of *Legionella*, *Legionella pneumophila* (LPN) accounts for >90% of human infections and serogroup 1 for 70–80% of these. Legionellosis can also be caused by LPN serogroups 2, 3, 4, 5 or 6 and other L species (e.g., *L. micdadei* and *L. longbeachae*).² Isolation by culture is still of major importance in environmental analysis and clinical diagnosis and is essential for epidemiological studies and to characterize the isolate causing an outbreak.^{1,3} The objective of this study was to evaluate a novel immunochromatographic test (ICT) designed for the identification of *Legionella* colonies from bacterial culture. The test includes two strips: one for L identification and another one with two test lines for LPN serogroups 2–15 and *L. pneumophila* serogroup 1 (LPN1) identification. *Legionella* identification is based on a combination of monoclonal antibodies (mAb) (developed at Vircell, S.L., Granada, Spain), adsorbed on both the colloidal gold and the membrane, targeting specific constituents of the bacterial cell wall: the peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL) for L,

the major outer membrane protein (MOMP) for LPN and the lipopolysaccharide (LPS) for LPN1. PAL was selected to detect genus because it is a constant and highly conserved antigen of the *Legionella* membrane.⁴ MOMP is useful to identify LPN strains because it is present in the membrane of LPN serogroups 1–15 but not in that of non-pneumophila *Legionella*.⁵ Finally, LPS is a highly immunogenic cell surface component that offers serogroup/mAb subgroup specificity. Most of the clinical isolates, especially those associated with outbreaks, contained a specific epitope for mAb 2 and mAb 3/1 from the Dresden Panel.^{6,7} Of these, mAb 3/1 reacts with the 8-O-acetyl group from legionaminic acid which is a key component of LPN1 LPS,⁸ confirming that LPS is a suitable antigen to identify serogroup 1 of LPN.

A total of 211 samples were used to analyze the performance of the ICT. They were bacteria strains from reference collections (NCTC, DSMZ, ATCC) (42 L, 27 LPN (13 LPN1 + 14 LPN2–15); 141 isolated from 64 water samples received by SGS Tecnos S.A. (Madrid, Spain) for *Legionella* testing (35 L, 30 LPN (17 LPN1 + 13 LPN2–15), 106 non-*Legionella* (NOL)), which were characterized using a commercial latex slide test (*Legionella* Latex Test, Oxoid, UK) following the manufacturer's instructions; and 28 clinical isolates: 1 LPN1 Murcia⁹ (Vircell, S.L.'s collection) and 27 NOL from Hospital Neurotraumatológico de Jaén (Jaén, Spain) which were identified by biochemical panels (Microscan Walkaway, Siemens, Germany). All *Legionella* reference strains and the clinical isolated LPN1 Murcia were grown on a specific culture medium for *Legionella*, BCYE (Biomérieux, France), while blood-agar plates (Oxoid, UK) were used for the NOL clinical isolates. Environmental isolates samples were cultivated in parallel with both types of plate. One false negative result was obtained for the LPN1 test line (see Table 1) on the ICT. This specimen was re-analyzed by using direct immunofluorescence assays with a commercial mAb against LPN1 (clone Lp1 MAB 1 ATCC) and an in-house rabbit antiserogroup 1 anti-serum along with performing a commercial ELISA (Bartels,

Table 1
Comparison of methods and statistical results for the ICT *Legionella* lines.

ICT <i>Legionella</i> classification									
Reference method classification ^a	Genus <i>Legionella</i>			<i>L. pneumophila</i> sg. ^b 1			<i>L. pneumophila</i> sg. ^b 2–15		
	+	–	N ^c	+	–	N ^c	+	–	N ^c
+	78	0	78	30	1	31	58	0	58
–	0	133	133	0	180	180	0	153	153
N ^c	78	133	211	30	181	211	58	153	211
ICT <i>Legionella</i> statistical results ^a									
	Genus <i>Legionella</i>		<i>L. pneumophila</i> sg. ^b 1 line		<i>L. pneumophila</i> sg. ^b 1–15 line		Overall		
Sensitivity	100 (94.2–100)		96.7 (81.4–99.8)		100 (92.3–100)		98.7 (92.1–99.9)		
Specificity	100 (96.5–100)		100 (97.4–100)		100 (96.9–100)		100 (96.5–100)		
PPV ^d	100 (94.2–100)		100 (85.9–100)		100 (92.3–100)		100 (94.1–100)		
NPV ^e	100 (96.5–100)		99.4 (96.5–99.9)		100 (96.9–100)		99.2 (95.3–99.9)		
AC ^f	1		1		1		0.9953		
LRP ^g	Infinity		Infinity		Infinity		Infinity		
LRN ^h	0		0.0322		0		0.0128		
γ ⁱ	1		0.968		1		0.987		

^a 95% confidence intervals are given in parenthesis.

^a Reference method: *Legionella* Latex Test (Oxoid, UK) and Microscan Walkaway (Siemens, Germany) for environmental and clinical isolates respectively, and references of ATCC, NCTC y DSMZ for characterized legionellae.

^b sg., serogroup.

^c N, total number of samples.

^d PPV, positive predictive value.

^e NPV, negative predictive value.

^f AC, accuracy.

^g LRP, likelihood ratio positive.

^h LRN, likelihood ratio negative

ⁱ γ: Youden index.

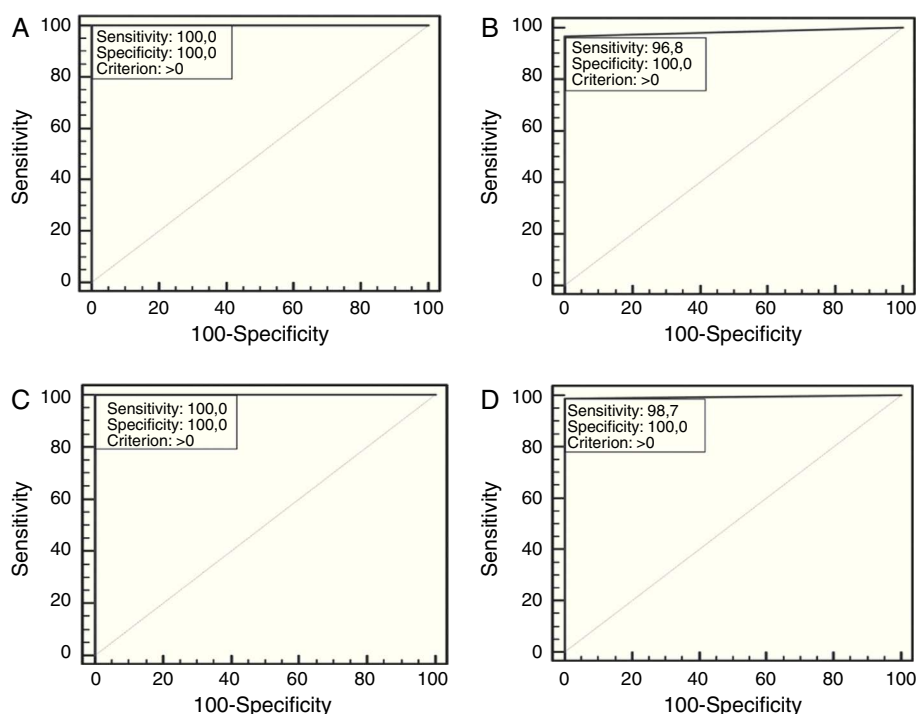


Fig. 1. ROC curves generated: (A) genus *Legionella* line (area under curve: 1), (B) *L. pneumophila* serogroup 1 line (area under curve: 0.968), (C) *L. pneumophila* serogroups 1–15 line (area under curve: 1) and (D) overall ICT lines (area under curve: 0.987).

Ireland) for LPN1. The sample was negative in all three assays, suggesting that the commercial reference latex could have produced a false positive. Statistical analysis was performed with VassarStats (<http://www.vassarstats.net>). The Receiving Operating Characteristic (ROC) curves were generated with Medcalc® Software (<http://www.medcalc.org/>). As shown in Table 1, sensitivities of 100%, 100% and 96.7% were obtained for L, LPN and LPN1, respectively, and the overall sensitivity was 98.7%. The ICT showed a specificity of 100%. Predictive values, likelihood ratios, the Youden index and the accuracy provide optimal values for the classifier too. The ROC curves show the suitable performance of the classifier. The highest exactitude is achieved when the area under curve is 1, which was reached for the genus and the LPN2–15 lines; meanwhile, for the LPN1 line it was almost ideal (see Fig. 1).

Summarizing, the evaluated ICT has shown suitable reliability and agreement with the reference methods. The ICT can identify *Legionella* genus and can differentiate between serogroup 1 and serogroups 2–15. The statistical results show a successful and non-random classification. So, the ICT can be considered a fast, easy-to-handle and reliable test for *Legionella* diagnosis in samples from cultures. It also represents a suitable confirmation method, due to its simplicity and high specificity and sensitivity values.

Funding

These studies have been fully funded by the company Vircell, S.L. (Santa Fe, Granada).

Conflict of interest

Teresa Pardo, José Manuel Delgado and José Rojas are employees of Vircell, S.L. Antonio Fuertes works for SGS Tecnos, S.A. (Madrid)

and has worked on the assignment and analysis of part of the samples evaluated.

All authors voluntarily publish this article and have no personal interest in these studies except that of disseminating scientific findings that have been planned and implemented, as well as monitoring, conducting research and analysis of results.

Bibliografía

- Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin Microbiol Rev. 2002;15:506–26.
- Percival SL. Microbiology of waterborne diseases. Elsevier Limited; 2004.
- Hornei B, Ewig S, Tartakovsky I, Lajoie L, Surman-Lee S, Fry N, et al. Laboratory aspects of Legionella. In: Bartram J, editor. Legionella and the prevention of legionellosis. World Health Organization; 2007. p. 175–92.
- Moon J-H, Yang J-A, Sim H-S, Park DW, Sohn JW, Lee HK, et al. Antigenic diversity of a 19-kilodalton peptidoglycan-associated lipoprotein among Legionella species determined by reactivity patterns to monoclonal antibodies. In: Cianciotto, Nicholas P, editors. Legionella: state of the art 30 years after its recognition. ASM Press; 2006. p. 76–8.
- Nolte FS, Conlin CA. Major outer membrane protein of Legionella pneumophila carries a species-specific epitope. J Clin Microbiol. 1986;23:643–6.
- Joly JR, McKinney RM, Tobin JO, Bibb WF, Watkins ID, Ramsay D. Development of a standardized subgrouping scheme for Legionella pneumophila serogroup 1 using monoclonal antibodies. J Clin Microbiol. 1986;23:768–71.
- Helbig JH, Bernander S, Castellani-Pastoris M, Etienne J, Gaia V, Lauwers S, et al. Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of Legionella pneumophila serogroups and monoclonal subgroups. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2002;21:710–6.
- Lück PC, Schuppler M, Helbig JH. Changes in the lag-1 locus of Legionella pneumophila serogroup 1 strains results in different lipopolysaccharides by monoclonal antibodies but do not influence virulence. In: Reinhard M, editor. Legionella. ASM Press; 2002. p. 52–5.
- García-Fulgueiras A, Navarro C, Fenoll D, García J, González-Diego P, Jimenez-Buñuales T, et al. Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain. Emerg Infect Dis. 2003;9:915–21.

María Teresa Pardo-García^{a,*}, José Manuel Delgado-Calvo-Flores^a,
José Rojas-González^a, Antonio Fuertes-Ortiz^b

^a Vircell, S.L., Santa Fe, Granada, Spain

^b SGS Tecnos S.A., Laboratorio de Microbiología de Medio Ambiente
y Prevención, Madrid, Spain

* Corresponding author.

E-mail addresses: terexa@correo.ugr.es, terexapg@yahoo.es
(M.T. Pardo-García).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2013.03.020>

Síndrome confusional agudo por levofloxacin

Acute confusional syndrome due to levofloxacin

Sr. Editor:

El levofloxacin es una quinolona fluorada de tercera generación que presenta un buen perfil de tolerancia. Los principales efectos adversos son los gastrointestinales (5%) y alteraciones del sistema nervioso central (SNC) (0,2-1,1%)^{1,2}. Describimos el caso de una mujer que presentó un síndrome confusional agudo secundario a levofloxacin y que remitió tras su retirada. El caso fue notificado al Sistema Español de Farmacovigilancia.

Mujer de 41 años sin antecedentes de interés, en concreto sin historia de consumo de alcohol, tabaco o drogas de abuso, que ingresa por síndrome confusional agudo. Había sido ingresada 5 días antes con diagnóstico de neumonía extrahospitalaria y tratada con azitromicina (500 mg i.v./24 h) y ceftriaxona (2 g i.v./24 h). Durante el ingreso no había presentado clínica neurológica y, dada la evolución satisfactoria, fue dada de alta a los 3 días a tratamiento con levofloxacin (500 mg/24 h). Tras 48 h de iniciar tratamiento con levofloxacin y sin consumo de otros fármacos concomitantes es traída a urgencias por cuadro confusional de varias horas de evolución con déficit de atención, deterioro de la memoria reciente y desorientación temporoespacial. En la exploración estaba afebril, consciente, no presentaba agitación psicomotriz ni alucinaciones, estaba desorientada en tiempo y parcialmente en espacio, no recordaba quién la había traído a urgencias ni sabía el motivo, sin recordar nada de lo acontecido en las últimas horas, con preguntas repetitivas; el resto de la exploración general y neurológica no mostraba alteraciones de interés. La analítica de sangre con hemograma, bioquímica, hormonas tiroideas, proteinograma y gasometría resultaron normales. La determinación de tóxicos en orina fue negativa. Se realizó una punción lumbar con resultado normal. Los cultivos de sangre, orina y líquido cefalorraquídeo resultaron negativos. Los estudios serológicos para virus de la inmunodeficiencia humana, lúes, *Brucella*, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, virus herpes simple I y II, y *Borrelia* fueron negativos. Se realizó un electroencefalograma que resultó normal. Los estudios de imagen (tomografía axial computarizada y resonancia magnética cerebral) no mostraron alteraciones. Con el diagnóstico de síndrome confusional agudo fue suspendido el levofloxacin. A las 24 h de la suspensión del levofloxacin la paciente se encontraba orientada y la exploración cognitiva realizada mostraba un Minimental test de 35/35, presentando amnesia de los sucedidos las 24 h anteriores. Con diagnóstico de síndrome confusional agudo en relación con levofloxacin fue dada de alta a tratamiento con telitromicina (800 mg/día) durante 4 días. En la revisión efectuada a los 3 meses la paciente permanecía asintomática.

Las fluorquinolonas son agentes antibacterianos frecuentemente prescritos con utilidad en un amplio rango de infecciones bacterianas. Los efectos adversos comúnmente asociados con las fluorquinolonas incluyen toxicidad gastrointestinal y del SNC, así como otros efectos secundarios que incluyen anormalidades en el electrocardiograma, alteración del metabolismo de la

glucosa, fototoxicidad, tendinitis y rotura de tendones, hipersensibilidad y alteraciones cutáneas³. Dentro de las fluorquinolonas el levofloxacin es una quinolona bien tolerada, y sus principales efectos secundarios son las manifestaciones gastrointestinales (que ocurren en el 5% de los pacientes), la fototoxicidad y la afectación del SNC (0,2-1,1%)^{1,2}; esta última sobre todo en forma de cefalea, vértigo, insomnio e inquietud principalmente, pero también como cuadros alucinatorios, delirio y crisis convulsivas⁴.

El desarrollo de efectos adversos de las fluorquinolonas sobre el SNC parece relacionado con la afinidad por los receptores del ácido gamma-aminobutírico (GABA) y los receptores del glutamato. Las quinolonas, mediante su radical R7, bloquearían la unión GABA sobre su receptor GABA A, ejercerían un efecto inhibitorio sobre el sistema GABA y como resultado inducirían una estimulación del SNC. Por otro lado, hay similitudes estructurales de las fluorquinolonas con ácido kinurénico y otros componentes similares que son ligandos endógenos de los receptores de glutamato, lo que podría mostrar una interacción de las quinolonas con los receptores de glutamato. En este sentido, recientes estudios experimentales demuestran que la acción convulsiva de las quinolonas es antagonizada por antagonistas de los receptores de glutamato, estando implicados ambos receptores: N-metil-D-aspartato (receptores NMDA) y ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (receptores AMPA)/Kainato (KA) receptor⁵. La interacción del levofloxacin con estos receptores puede ocasionar un estatus epiléptico no convulsivo y estados de delirio^{6,7}. El estatus no convulsivo asociado al uso de fluorquinolonas se puede manifestar por un cuadro confusional o de delirio; por esto, tal como se hizo en nuestra paciente, es importante realizar un electroencefalograma para descartar esta seria complicación. Los factores de riesgo para la neurotoxicidad del levofloxacin incluyen: insuficiencia renal, pacientes ancianos, enfermedad cardiovascular aterosclerótica, enfermedad del SNC subyacente (epilepsia, enfermedad cerebrovascular) y la coadministración con otros fármacos que descenden el efecto GABA como los antibióticos: penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes o los antiinflamatorios no esteroideos^{2,3,8}.

En el caso que describimos la paciente presentaba un cuadro confusional sin mostrar clínica de delirio o síntomas psicóticos. Nuestra paciente no presentaba evidencia de infección del SNC, alteración metabólica, ingestión de tóxicos, enfermedad del SNC o fallo orgánico sistémico; no tomaba otros fármacos (antiinflamatorios no esteroideos...) que pudiesen ser responsables del cuadro clínico y las exploraciones complementarias realizadas fueron normales. La paciente había sido tratada durante 72 h con ceftriaxona, y cuando se produce la sintomatología llevaba 48 h sin este fármaco, y aunque nos parece poco probable, no se puede descartar que pudiera haber condicionado el efecto. El inicio del cuadro confusional a las 48 h del inicio del levofloxacin junto con la reversión del cuadro tras su suspensión hacen altamente probable la relación del cuadro confusional con el fármaco. En la revisión de la literatura se ha descrito de forma ocasional la presencia de delirio en relación con levofloxacin y, a pesar de que el cuadro confusional figura en la ficha técnica del fármaco como un efecto secundario «raro» (1/1.000 a 1/10.000)⁹, solo hemos encontrado un caso descrito en la literatura que relacione el fármaco con síndrome