

Antigene urinario di *Legionella pneumophila*: efficienza diagnostica di un innovativo test Elisa quantitativo

Gino Ciarrocchi,¹ Barbara Cinti,¹ Marco d'Anzeo,¹ Maria Enrica Cimarelli,² Brunilde Berti,³ Helena Cerutti,³ Francesco Cocola,³ Andrea Ianniello,³ Claudia Soldatini³

¹S.O. Laboratorio Analisi, Sierologia, A.O. Ospedali Riuniti Policlinico Ancona, Italy;

²S.O. Broncopneumologia, A.O. Ospedale Civile Jesi, Italy; ³Centro Ricerca e Sviluppo, Diesse Diagnostics, Siena, Italy

Summary

***Legionella pneumophila* urinary antigen: diagnostic efficiency of a new quantitative Elisa test.**

Background. To provide a rapid and suitable diagnosis of *Legionella pneumophila* serogroup1 (LPsg1) infection, a total of 160 urine samples were collected from 56 suspected or diagnosed patients, 8 from the VEQ-NEQAS Program, 96 from healthy blood donors, to detect LPsg1 urinary antigen by a new automated single device quantitative Elisa assay (Urinary Legionella Antigen Chorus, Diesse).

Materials and Methods. An immunochromatographic rapid test (V-test Legionella, Coris) was used as a reference. Prevalence of specific IgM and IgG LPsg1 antibodies was assessed on 20 sera collected among the 56 patients with disease.

Results. Urinary Ag LPsg1 results of two direct tests from a total of 64 samples (patients and VEQ) showed an overall concordance of 90.6% (58 out of 64); all healthy blood donors resulted as negatives, as well (specificity 100%). Serology positive results (LPsg1 IgM and IgG antibodies) were revealed on 14 out of 20 diagnosed patients sera; instead, both urinary LPsg1 antigen tests resulted as positives in 18 out of 20 urine samples. The combined use of both LPsg1 urinary antigen and specific IgM antibodies improved the diagnostic efficiency

than a single test approach, showing 20 out of 20 patients with at least one positive LPsg1 specific marker.

Conclusions. The new LPsg1 urine antigen quantitative Elisa assay seems to be a useful tool for an early diagnosis of suspected LPsg1 infection and along the follow up of treated patients.

Introduzione

La legionellosi o Malattia dei Legionari (ML) è una severa forma di polmonite causata da *Legionella pneumophila*, clinicamente indistinguibile da altre forme infettive polmonari. Dal punto di vista epidemiologico, *Legionella pneumophila* sierotipo 1 (LPs1) è responsabile del 91% dei casi di legionellosi in USA (13) e del 95% dei casi in Europa (1, 14, 15). Per contro, in Australia e Nuova Zelanda *Legionella longbeachae* è l'agente eziologico nel 50% dei casi (16).

La malattia si presenta con esordio brusco, febbre elevata, tosse non produttiva e insufficienza respiratoria, a cui si possono accompagnare stato confusionale con iposodiemia, vomito, diarrea, artro-mialgie. L'esame Rx rivela uno o più infiltrati essudativi localizzati in diverse aree polmonari (3), fornendo un dato suggestivo seppure non dirimente.

La diagnosi è un rompicapo per il clinico a causa di una serie di fattori negativi, tra i quali: la non specificità dei sintomi, la qualità dei test di laboratorio impiegati e, non ultimo, il pregiudizio di considerare l'infezione come "esotica" (14); viceversa, *L. pneumophila* è uno dei più comuni agenti eziologici di polmonite, responsabile del 1-5% delle infezioni comunitarie e del 5-10% di quelle nosocomiali (1, 5, 14, 15).

L'approccio diagnostico spesso intuitivo ha ricadute negative sull'appropriatezza delle richieste mirate per esami di laboratorio (14, 15). Per contro, l'ampio arsenale di test, diretti e indiretti, differenti per efficienza e significato diagnostico, generano talvolta difficoltà interpretative al clinico (1, 5).

Tra i test diretti, l'esame culturale, ritenuto il *gold standard* microbiologico, permette l'isolamento di *Legionella pneumophila* in terreni selettivi arricchiti (BCYE), partendo da campioni di escreato, sangue, lavaggio bronco-alveolare; gli inconvenienti risiedono nei lunghi tempi di risposta e in una insoddisfacente sensibilità, variabile tra 10-80%, in relazione alla qualità del campione (1, 14).

Il test con tecnica di immunofluorescenza diretta (IFD) è più rapido, ma richiede personale esperto e una buona qualità del campione, spesso difficile da ottenere in pazienti con tosse non produttiva; inoltre, è inficiato da cross-reazioni con *Bacteroides fragilis*, *Pseudomonas* spp ed ha una sensibilità stimata tra 25-60% (1, 5, 14, 15).

Correspondence: Gino Ciarrocchi, S.O. Laboratorio Analisi, Sierologia, A.O. Ospedali Riuniti Policlinico Ancona, Via Conca 71, Ancona 60126, Italy.
Tel.: +071.596.4251 - Fax: +071.596.4638.
E-mail: ciarrokki@libero.it

Key words: legionellosis, specificity, sensitivity, urinary antigen.

Contributions: the authors contributed equally.

Conflict of interests: the authors declare no potential conflict of interests.

©Copyright G. Ciarrocchi et al., 2014
Licensee PAGEPress, Italy
Microbiologia Medica 2014; 29:4890
doi:10.4081/mm.2014.4890

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License (by-nc 3.0) which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

L'impiego di un test elisa per la ricerca qualitativa di antigene di *Legionella pneumophila* sierotipo 1 ha rappresentato una rilevante innovazione, ulteriormente migliorata con la versione del test rapido con tecnica immunocromatografica (1, 8, 9, 14, 15). Quest'ultimo ha in larga misura sostituito i test diretti, almeno nelle aree in cui *Legionella pneumophila* sierotipo 1 ha più larga diffusione (13, 15, 16, 17, 18), poiché l'antigene solubile appare precocemente, già dopo un giorno dall'inizio dei sintomi e persiste per giorni e settimane (6, 8, 9, 12, 14, 15). La sensibilità si attesta tra 70-100%, mentre la specificità sfiora il 100% (1, 14).

I metodi di amplificazione genica per la ricerca del DNA di *Legionella pneumophila* costituiscono potenzialmente una rivoluzione metodologica, poiché sono in grado di poter rilevare tutte le specie. Tuttavia, l'esecuzione dei test, oltre che essere laboriosa, risente di una mancata standardizzazione analitica nell'impiego diagnostico. Da ciò deriva l'ampia variabilità dei risultati ottenuti in differenti tipologie di studio, con evidenze di sensibilità che variano tra 11-100% (1, 4, 10, 14).

La recente introduzione del metodo Real Time PCR appare molto promettente, con eccellenti livelli di sensibilità e specificità (1, 3, 4); il suo impiego nel laboratorio diagnostico, con procedure semplificate e a basso costo, oltre lo stretto ambito della ricerca, costituirebbe un importante salto di qualità.

Tra i test indiretti, il presidio tradizionale della diagnosi di legionellosi si basa sulla risposta immunologica specifica generata dall'infezione, con comparsa di IgM dopo circa 10-14 gg e IgG prodotte dopo 4-6 settimane. La tardiva produzione anticorpale sembra ridurne le potenzialità diagnostiche; tuttavia, nel variabile arco temporale di prima diagnosi, l'apparizione precoce di IgM può addirittura rivelarsi l'unico indizio specifico d'infezione (1, 5, 14, 15, 19, 20).

Con tale vasto potenziale a disposizione, due fattori sembrano irrinunciabili: la rapidità di risposta al quesito clinico e l'efficienza diagnostica dei test impiegati.

Lo scopo dello studio è costituito dalla valutazione dell'utilità clinica di un nuovo test Elisa quantitativo a singolo dispositivo per la ricerca degli antigeni di *Legionella pneumophila* sierotipo 1 (LPs1) in campioni di urine, appartenenti a pazienti con sospetta o accertata legionellosi; verificare altresì se l'uso combinato di test diretto e ricerca sierologica possa migliorare l'efficienza diagnostica.

Materiali e Metodi

Un totale di 160 campioni di urina furono esaminati per la ricerca di antigeni di LPs1: 56 urine raccolte da pazienti con sospetta o accertata diagnosi di legionellosi, 8 campioni di urine di riferimento del programma VEQ_NEQAS, UK, 96 urine fresche di donatori sani asintomatici.

Allo scopo è stato valutato un nuovo test Elisa quantitativo a singolo device, *Legionella urinary antigen Chorus*, DIESSE Diagnostics, Siena (LPsg1 Ag Chorus), eseguito in completa automazione su analizzatore Chorus (Valori di Riferimento: Index <0.6 negativo; 0.6-0.8 border-line; >0.8 positivo). Per confronto è stato impiegato il test immunocromatografico *Legionella V-test* (Coris Diagnostics, Francia), in uso di routine e precedentemente valutato verso l'analogo test *Legionella NOW*, Binax, USA. Ricerca di anticorpi anti-LPs1 IgG e IgM è stata effettuata con distinti test Elisa (*Legionella IgG*, IgM Chorus, DIESSE) in 20 campioni di siero raccolti tra i 56 pazienti in studio. I campioni di urina di 49/56 pazienti erano stati precedentemente esaminati con V-test Coris e poi congelati a -30°C fino alla seduta analitica con il nuovo test; 7 urine fresche appartenevano a nuovi pazienti con accertamento di legionellosi. I 96 campioni di urina di donatori sani furono processati senza congelamento. Nessun campione di urina fu sottoposto a procedura di concentrazione o di trattamento termico.

Risultati

I risultati ottenuti con i due test per la ricerca diretta dell'antigene di LPs1 in 64 campioni di urina complessivi mostrano una concordanza totale del 90.6% (58/64), quattro discordanze maggiori (V-test positivo/Ag Chorus negativo), 2 discordanze minori (V-test border-line/Ag Chorus negativo). Il valore medio di Index in 43 urine positive fu 2.51 (range 0.6-9.0) (Tabella 1). I 96 campioni di urina di donatori sani risultarono tutti negativi sia al test Ag Chorus (specificità 100%) che al V-test, per confronto (concordanza 100%). Valore medio di Index=0.14 (range 0.1-0.3) (Tabella 2). I campioni di urina del programma VEQ-NEQAS, 5 positivi e 3 negativi, diedero risultati corretti e concordanti al 100% con entrambi i test. La ricerca di anticorpi IgG e IgM anti-LPs1 in 20 campioni di siero pervenuti, appartenenti al gruppo di 56 pazienti, risultò positiva per IgM e/o IgG+IgM in 14 casi; l'impiego del solo test diretto fornì positività in 18/20 casi (Tabella 3). L'impiego combinato della ricerca antigene e del dosaggio anticorpale, corredato di dati clinici suggestivi, ha dimostrato la presenza di almeno un marcatore specifico in tutti i 20 pazienti esaminati (Tabella 4). In due casi di legionellosi con isolamento microbiologico di LPs1, fu rivelato antigene urinario e presenza di anticorpi IgM e IgG nel siero.

Discussione

Le indagini di laboratorio nelle infezioni da *L. pneumophila* rivestono un ruolo molto rilevante nella definizione clinica della malattia (1, 5, 14, 15), in particolare, il test per la ricerca di antigeni urinari di LPsg1 ha trovato ampia diffusione, sostituendo, di fatto, l'esame colturale. Il nuovo test Elisa a singolo device ha fornito risultati quanti-

Tabella 1. Confronto tra test Ag LPs1 Chorus e V-test Coris in 64 campioni di urina.

Ag Leg Coris Lotto 3100D1408	Ag Leg Chorus Lotto 020/052	Concordanti	Discordanti
Pos	Pos	43	-
Neg	Neg	13	-
Bl	Bl	1	-
Pos	Bl	1	-
Pos	Neg	-	4
Bl	Neg	-	2
Neg	Bl	-	-
Neg	Pos	-	-
Totale		58	6

Valore medio index campioni positivi=2.51

Concordanza totale=58/64=90.6%

Discordanza totale (maggiori+minori)=6/64=9.4%

Tabella 2. Ricerca di Ag LPs1 urinario in 96 donatori sani asintomatici.

	Negativo	Positivo	Clinica
Ag Leg Chorus	96	0	Negativa
V-test Coris	96	0	Negativa

Concordanza=100%

Specificità=100

tativi, molto interessanti, come si evince dai risultati nel gruppo di pazienti, come inequivocabile marcatore dell'infezione e della clearance del batterio; viceversa inoltre, nel *follow up* il test potrà mostrare un rapido decremento ovvero la scomparsa di Ag LPsg1, come evidenziato da uno dei due casi di antigene LPsg1 negativi, contestuale alla risoluzione della malattia. In altri casi la *clearance* avrà un lento decremento, con scomparsa dell'antigene ben oltre la guarigione clinica. L'elevato standard di qualità è dimostrato dall'allineamento diagnostico con il test preso come riferimento, sia nei 49 campioni di urina conservati provenienti dalla sieroteca che nei 7 nuovi pazienti, due dei quali ebbero diagnosi di legionellosi. Il test Ag Chorus mostra una sensibilità appena inferiore al test rapido, ben compensata da un livello di specificità assoluta. Una totale concordanza e accuratezza di risultati è stata ottenuta anche negli otto campioni di urina del programma esterno di qualità VEQ-NEQAS. In alcuni casi di suggestiva legionellosi il riscontro negativo di antigene LPs1 ottenuto con il nuovo test e, in minor misura, anche con il test di riferimento, dimostrerebbe una scarsa o nulla eliminazione di antigeni ovvero la presenza di frammenti non rilevabili nelle urine. La scelta di verificare la presenza di marcatori sierologici specifici, quale segno indiretto dell'infezione ha rafforzato la capacità diagnostica. Così, nello studio è stato dimostrato che tra i 20 casi indagati con entrambe le procedure analitiche, IgM e IgG antiLPs1 furono rivelati in 14 di essi; in due casi l'antigene non fu rilevato, ma in entrambi si ebbe riscontro di IgM e IgG con elevati e significativi valori.

Dunque, il primo approccio diagnostico si indirizza verso la ricerca di antigene urinario specifico, escreto in una fase precoce dell'infezione; tuttavia, una rapida indagine multiparametrica dà evidenza di un miglioramento dell'efficacia diagnostica e di tempestività di risposta al quesito clinico. Tale protocollo analitico sembra confermato da un recente report relativo ad un cluster epidemico in cui la sensibilità di IgM anti-LPs1 mostrava un range di 30-72%, in relazione al tempo di prelievo del siero, mentre l'uso combinato dei due metodi migliorava la sensibilità fino a 84% (15). Una negatività sierologica IgM in un paziente in cui permane forte sospetto di legionellosi giu-

stifica il ricorso ad un secondo campione (siero convalescente) per la dimostrazione della siero conversione, nonché una nuova ricerca di antigene urinario. Nella corrente pratica clinica è frequente l'invio di campioni biologici scarsamente associati a una precisa ricostruzione anamnestica, ovvero di singoli campioni di siero, non temporalmente definibili, da qui il suggerimento dell'uso combinato dei test. L'interrelazione tra il laboratorio e la clinica potrà ulteriormente migliorare l'appropriatezza della richiesta di esami, concordando rapidi protocolli d'indagine al fine di ottimizzare la qualità del *clinical management*.

Bibliografia

- Den Boer JW, Yzerman PPF. Diagnosis of Legionella infection in Legionnaires' disease. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004; 23: 871-8.
- De Ory F, Echevarria M, Pelaz C, et al. Detection of specific IgM antibody in the investigation of an outbreak of pneumonia due to *Legionella pneumophila* serogroup 1. J Clin Microbiol Infect 2000; 6: 64-9.
- Diederer BMW, Kluytmans JAJW, Vandenbroucke-Grauls CM, Peeters MF. Utility of Real-time PCR for diagnosis of Legionnaires' disease in routine clinical practice. J Clin Microbiol 2008; 46: 671-7.
- Diederer BMW, Kluytmans JAJW, Peeters M. Evaluation of Vircel enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay for detection of antibodies against Legionella pneumophila. Clin Vaccine Immunol 2006; 13: 361-4.
- Fields BS, Benson RF, Besser RE. Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 506-26.
- Guerrero C, Toldos CM, Yagüe G, et al. Comparison of diagnostic sensitivities of three assays (Bartels enzyme immunoassay (EIA), Biotest EIA, and BinaxNOW immunochromatographic test) for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine. J Clin Microbiol 2004; 42: 467-8.
- Hayden RT, Uhl JR, Qian X, et al. Direct detection of *Legionella* species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of LightCycler PCR, in situ hybridization, direct fluorescence antigen detection, and culture. J Clin Microbiol 2001; 39: 2618-26.
- Helbig JH, Uldum SA, Lück PC, Harrison TG. Detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine samples by BinaxNOW immunochromatographic assay and comparison with both Binx Legionella urinary enzyme immunoassay (EIA) and Biotest Legionella urine antigen EIA. J Med Microbiol 2001; 50: 509-16.
- Helbig JH, Uldum SA, Bernander S, et al. Clinical utility of urinary antigen detection for diagnosis of community-acquired, travel-associated, and nosocomial Legionnaires' disease. J Clin Microbiol 2003; 41: 838-40.
- Herpers BL, de Jongh BM, van der Zwaluw K, van Hannen EJ. Real-time PCR assay targets the 23S-5S spacer for direct detection and differentiation of *Legionella* spp and *Legionella pneumophila*. J Clin Microbiol 2003; 41: 4815-6.
- Lever F, Joseph C. Travel-associated Legionnaires' disease in Europe in 2000 and 2001. Euro Surveil 2003; 8:65-72.
- Lindsay DS, Abraham WH, Findlay W, et al. Laboratory diagnosis of Legionnaires' disease due to *Legionella pneumophila* serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods. J Med Microbiol 2004; 53: 183-7.
- Marston BJ, Plouffe JF, File TM, et al. Incidence of community-acquired pneumonia requiring hospitalization. Results of a population-based active surveillance study in Ohio. The community-Based Pneumonia Incidence Study Group. Arch Intern Med 1997; 157: 1709-18.

Tabella 3. Confronto tra test sierologici e Test Antigene urinario LPs1 in 20 pazienti con diagnosi di legionellosi.

	IgG+IgM Positivo	IgG+IgM Negativo	Totale
Ag Leg Chorus Positivo	12	6	18
Ag Leg Chorus Negativo	2*	0	
Totale	14	6	20

*1 caso Ag LPsg1 negativo in legionellosi in corso+1 caso Ag LPsg1 negativo in legionellosi guarita.

Tabella 4. Impiego multiparametrico di test Ag Legionella Chorus e IgG+IgM anti-LPs1 in 20 casi di legionellosi.

	N. casi	Clinica
Ag Leg Chorus Pos/ IgG+IgM Pos	12	Legionellosi
Ag Leg Chorus Pos/ IgG+IgM Neg	6	Legionellosi
Ag Leg Chorus Neg/ IgG+IgM Pos	2	Legionellosi
Totale	20	

14. Murdoch DR. Diagnosis of Legionella infection. Clin Infect Dis, 2003; 36: 64-9.
15. Rojas A, Navarro MD, Fornés FE, et al. Value of serological testing for diagnosis of legionellosis in outbreak patients. J Clin Microbiol 2005; 43: 4022-5.
16. Yu VL, Plouffe JF, Pastoris MC, et al. Distribution of Legionella species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. J Infect Dis 2002; 186: 127-8.
17. Yzerman EP, den Boer JW, Lettinga KD, et al. Sensitivity of three urinary antigen tests associated with clinical severity in a large outbreak of Legionnaires' disease in the Netherlands. J Clin Microbiol 2002; 40: 3232-6.
18. Wever PC, Yzerman EP, Kuijper EJ, et al. Rapid diagnosis of Legionnaires' disease using an immunochromatographic assay for Legionella pneumophila serogroup 1 antigen in urine during an outbreak in the Netherlands. J Clin Microbiol 2000; 38: 2738-9.
19. Wreghitt TG, Nagington J, Gray J. An ELISA test for the detection of antibodies to Legionella pneumophila. J Clin Pathol 1982; 35: 657-60.
20. Pancer K. Patients' age and the dynamics of IgM for *L. pneumophila* sg1. Przegl Epidemiol 2014; 68: 21-26.

Non-commercial use only