

SHORT COMMUNICATIONS

Combined use of two rapid test in *Legionella pneumophila* infections

Gino Ciarrocchi¹, Marco D'anzeo¹, Maria Enrica Cimarelli², Brunilde Berti³, Francesco Petrini³

¹S.O. Laboratorio analisi, Sierologia, A.O. Ospedali Riuniti – Ancona;

²S.O. Broncopneumologia, A.O. Ospedale Civile – Jesi;

³Centro Ricerca e Sviluppo, Diesse - Siena

Key Words: legionellosis, specificity, sensitivity, elisa test

Usò combinato di due test rapidi nelle infezioni da *Legionella pneumophila*

SUMMARY

Legionella pneumophila serogroup 1 (LPSg1) is the prevalent cause of legionellosis in many geographical areas of the world. LPSg1 infection may presents a severe pulmonary disease whose clinical picture is undistinguishable from that of other *pneumotropic* agents. In addition, a low clinical suspicion and some limitations in diagnostic tests (overall the lack of a "gold standard") make a correct diagnosis of legionnaires' disease easy to be missed. To provide a rapid and suitable diagnosis in patients with clinical signs and symptoms resembling legionnaires' disease, specific antibodies (IgM and IgG) against LPSg1 were detected in 25 sera collected from 22 male and female subjects using a rapid ELISA test (*Legionella Chorus*). Results were compared with those obtained by a standard ELISA (*Legionella Vircel*), which was set as the reference.

In addition, a total of 16 urine specimen from individual patients were furtherly assessed for LPSg1 antigen by a rapid immunochromatographic test (BinaxNOW *Legionella*).

In a control group of 104 healthy subjects, IgM and IgG *Legionella Chorus* specificity values were 99%. Agreement of IgM and IgG values with those obtained by the *Legionella Vircel* test were 98% and 95.5%, respectively.

In patients with confirmed legionnaires' disease, IgM agreement between the above reported tests was 88%; IgM *Legionella Chorus* sensitivity was 88%.

LPSg1 urine antigen was positive in 12 out of 16 examined specimen. Among these, 9 showed IgM positive sera. Conversely, 4 patients with IgM positive sera were negative upon urinary antigen.

Although antigen detection remains the method of choice to diagnose LPSg1 infection, the combination antigen detection plus rapid serology methods provides an additional tool for rapid diagnosis.

Received July 17, 2009

Accepted September 17, 2009

INTRODUZIONE

La legionellosi o Malattia dei Legionari è una severa forma di polmonite causata da *Legionella pneumophila*, clinicamente indistinguibile da altre forme infettive polmonari. Dal punto di vista epidemiologico, *Legionella pneumophila* sierotipo1 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).

La diagnosi di legionellosi è un rompicapo per il clinico a causa di una serie di fattori negativi, a partire dalla non specificità dei sintomi, dalla qualità dei test di laboratorio e, non ultimo, dal pregiudizio di considerare l'infezione come "esotica" (14). Viceversa, *Legionella 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).

Il quadro clinico non specifico dell'infezione contribuisce ad un approccio diagnostico spesso intuitivo, che ha ricadute negative sull'appropria-

Corresponding author: Gino Ciarrocchi

S.O. Laboratorio analisi, Sierologia, A.O. Ospedali Riuniti - Ancona

Tel. 071 5964251 - Fax 071 5964638

E-mail: ciarrokki@libero.it

tezza delle richieste di esami di laboratorio (14,15). Da parte sua, il laboratorio presenta un ampio arsenale di test, diretti e indiretti, differenti per efficienza e significato diagnostico, talvolta difficilmente interpretabile dal clinico (1,5).

Tra i test diretti, l'esame colturale mira all'isolamento microbiologico di *Legionella pneumophila* in terreni selettivi arricchiti (BCYE), partendo da campioni di escreato, sangue, lavaggio bronco-alveolare. Il metodo colturale è ancora ritenuto il "gold standard" diagnostico; tuttavia, i lunghi tempi di risposta ed una insoddisfacente sensibilità, variabile tra 10-80%, in relazione alla qualità del campione, ne limitano sempre più l'impiego (1,14). Il test con tecnica di immunofluorescenza diretta (IFD) è più rapido, ma richiede personale esperto, buona qualità del campione, spesso difficile da ottenere in pazienti con tosse non produttiva; inoltre, esso è inficiato da cross-reazioni con *Bacteroides fragilis*, *Pseudomonas sp* ed ha una sensibilità stimata tra 25-60% (1,5,14,15).

L'impiego di un test elisa per la ricerca qualitativa di antigene di *Legionella pneumophila* sierotipo1 ha rappresentato nella routine diagnostica una rilevante innovazione, ulteriormente migliorata dall'impiego di un test rapido basato sulla tecnica immunocromatografica (1,8,9,14,15).

Quest'ultimo ha in larga misura sostituito i test diretti, almeno nelle aree in cui *Legionella pneumophila* sierotipo1 ha più larga diffusione (13,15,16,17,18). 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 innovazione rappresentata dal 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 produzio-

ne anticorpale sembra ridurre le potenzialità diagnostiche; tuttavia, nel breve arco temporale di prima diagnosi, ampiamente variabile, l'apparizione precoce di IgM può addirittura rivelarsi l'unico indizio specifico d'infezione (1,5,14,15). Con tale vasto potenziale a disposizione, ma in assenza di un vero "gold standard", il laboratorio dovrà quindi scegliere un percorso diagnostico semplice e razionale, tenendo bene in mente due fattori irrinunciabili: la rapidità di risposta al quesito clinico e l'efficienza dei test impiegati. Si può ipotizzare allo scopo un uso combinato di test rapidi, per la ricerca di significativi marcatori d'infezione, che compaiono nei fluidi biologici in tempi differenti durante l'infezione: frazioni costitutive specifiche del germe (antigene solubile), e anticorpi specifici di classe IgM e IgG, conseguenza di una specifica risposta immunologica. Lo studio si propone di dimostrare l'efficacia diagnostica di un test elisa rapido impiegato per la ricerca nel siero di IgM anti- *Legionella pneumophila* sierotipo1, immediatamente eseguibile anche con singolo device su mini-analizzatore automatico; verificare il miglioramento diagnostico con l'aggiunta di un secondo test rapido per la ricerca di antigene di *Legionella pneumophila* sierotipo1.

MATERIALI E METODI

Nel periodo gennaio 2008 – marzo 2009 furono selezionati 22 casi di infezione da *Legionella pneumophila* sierotipo1 in soggetti maschi e femmine adulti, connotati da segni clinici compatibili con quadri di legionellosi, secondo criteri altrove definiti (3). Per la diagnosi di laboratorio un totale di 25 campioni di siero e 16 campioni di urina furono raccolti per la ricerca, rispettivamente, di IgM e IgG anti- *Legionella pneumophila* sierotipo1 e dell'antigene solubile specifico. Di tre pazienti pervennero due campioni di siero (acuto e convalescente) e due campioni di urina distanziati nel tempo.

Per lo studio furono impiegati:

- un test elisa rapido a singolo device, per la ricerca di IgM e IgG anti- *Legionella pneumophila* sierotipo 1, eseguito in completa automazione su mini-analizzatore Chorus (Diesse Diagnostici, Siena, Italia);
- un test elisa classico di confronto per la ricerca di anticorpi di classe IgG e IgM anti- *Legionella pneumophila* sierotipo1 (Vircel S.L., Granada, Spagna);
- un test rapido immunocromatografico (IC) per ricerca di antigene solubile di *Legionella pneumophila* sierotipo1 su campioni di urina non concentrata (Legionella NOW – Binax, USA);
- test di conferma per IgG e IgM specifiche con

tecnica di immunofluorescenza indiretta (IFI) (Focus Inc, USA – Alifax, Italia).

RISULTATI

Il test elisa rapido Chorus fu in precedenza confrontato con il test elisa Vircel nella ricerca di IgM e IgG, esaminando 104 sieri di soggetti sani, 14 sieri con elevata lipemia, 20 sieri con emolisi. La concordanza tra i due test fu del 98% per IgM e 95,2% per IgG (Tabella 1; Tabella 2). Nessuna positività aspecifica fu riscontrata nei sieri lipemici ed emolizzati (dati non mostrati).

La ricerca di IgM anti-*Legionella pneumophila* sierotipo1 nei 25 sieri risultò concordemente positiva con entrambi i test sierologici in 19/25 (76%); concordemente negativa in 3 casi, nei quali avvenne la successiva sieroconversione di tipo IgM nei campioni di siero convalescente (Figura I).

I tre sieri discordanti IgM Chorus positivi/Vircel negativi ebbero conferma positiva al test IFI IgM. La sensibilità del test IgM Chorus fu 88%. La ricerca di IgG anti-*Legionella pneumophila* sierotipo1 fu concordemente positiva in 7 sieri e negativa con entrambi i test in 17 (Figura II).

La ricerca di antigene urinario eseguita su 16 campioni di urina risultò positiva in 12 casi e negativa in quattro; 12 pazienti antigene positivi mostravano contemporanea positività al test IgM Chorus in 9 casi; mentre 4 casi antigene negativi risultarono IgM Chorus positivi (Figura III).

Nell'impiego combinato di test sierologico IgM Chorus e test antigenico urinario, i 16 pazienti esaminati risultavano: positivi ad entrambi i test in 9 casi; antigene positivi/IgM negativi in 3 casi; IgM positivi/antigene negativi in 4 (Figura IV).

Tutti i 13 soggetti IgM Chorus positivi ebbero conferma al test IFI-IgM (dati non mostrati).

Discussione

I dati complessivi dello studio dimostrano l'affidabilità del test IgM Chorus, il cui valore diagnostico è confermato in larga parte dal contestuale riscontro dell'antigene urinario di *Legionella*; inoltre, il test si caratterizza per la rapidità di esecuzione, l'economicità derivata dall'uso di un singolo supporto.

Assumendo come fondamentali gli elevati standard di qualità dei test impiegati e la rapidità di risposta al quesito clinico, il contributo diagnostico del laboratorio appare rilevante, se non decisivo. La concordanza del test rapido IgM-Chorus con il classico test elisa mostra livelli di eccellenza, in un ambito epidemiologico a bassa prevalenza infettiva.

Riguardo alla sensibilità, i nostri dati osservazionali, corredati da una generica definizione temporale dei sieri, non sono confrontabili con quelli di studi allo scopo dedicati; piuttosto, essi illustrano la capacità di un test rapido di rilevare la presenza

non casuale di differenti marcatori diagnostici in pazienti con segni clinici acuti di legionellosi.

Ciò è mostrato nella nostra esperienza dall'evidenza che IgM anti-*Legionella pneumophila* sierotipo1 erano presenti nel 88% dei sieri, al di sopra dei dati riportati in altri studi (1,14,15).

Altrettanto evidente risulta il miglioramento dell'efficacia diagnostica derivata dall'impiego combinato della ricerca dell'antigene di *Legionella* in campioni di urina con la determinazione di IgM specifiche. Tale concetto sembra altresì confermato da un recente report relativo ad un cluster epidemico, in cui venne utilizzato un identico test elisa classico (15). In quello studio la sensibilità per IgM anti-*Legionella pneumophila* sierotipo1 variava dal 30% e al 72%, in relazione all'esame sul primo o sul secondo siero, rispettivamente, mentre l'uso combinato del test sierologico e di quello antigenico permetteva di raggiungere una sensibilità del 84%.

Nei casi di negatività, in cui permane un forte sospetto di legionellosi, appare invece indispensabile il ricorso all'esame di un secondo campione per la dimostrazione della sieroconversione e/o della comparsa urinaria dell'antigene di *Legionella*, come mostrato in tre casi dello studio.

Tutto ciò induce a considerare i sieri esaminati nel nostro studio quali primi campioni "tardivi" o potenziali secondi campioni e, almeno nei casi di concordante positività di IgM e di antigene urinario, interpretabili come veri indicatori d'infezione da *Legionella pneumophila* sierotipo1.

Il test rapido per la ricerca di antigene urinario si è rivelato diagnostico in 12/16 campioni; in tre casi antigene solubile risultò positivo in tutti i primi campioni, con conferma nei secondi campioni inviati.

La ricerca contemporanea di IgM e Ag urine aumentò la sensibilità a 13/16. Tutti i 16 pazienti risultavano positivi ad almeno uno dei due test.

Gli anticorpi di classe IgG anti-*Legionella pneumophila* sierotipo1 fornirono per contro un debolissimo contributo diagnostico in prima diagnosi. In nessun siero erano presenti IgG come singolo marcatore d'infezione.

Pur concordando sulla possibile lunga persistenza di IgM e talora anche dell'antigene (1,13,14), in pazienti con fondato sospetto di legionellosi, il riscontro sul primo campione di almeno un marcatore biologico di *Legionella pneumophila* appare nel complesso di grande rilevanza, qualora associato ad un significativo quadro clinico. L'estrema semplicità d'uso e i brevissimi tempi di risposta dei test impiegati contribuiscono in modo determinante a ridurre la fase d'incertezza diagnostica e a migliorare la corretta definizione clinica dell'infezione.

Tabella 1. Confronto tra test IgM Legionella Vircel vs IgM Legionella Chorus in 104 pazienti negativi per legionellosi

IgM	Vircel – elisa		
	POS	B.I.	NEG
CHORUS – elisa	POS	-	1
	B.I.	-	-
	NEG	1	102

CONCORDANZA = 102/104 (98 %)

Tabella 2. Confronto tra test IgG Legionella Vircel vs IgG Legionella Chorus in 104 pazienti negativi per legionellosi

IgG	Vircel – elisa		
	POS	B.I.	NEG
CHORUS – elisa	POS	-	1
	B.I.	-	-
	NEG	4	99

CONCORDANZA IgG 99/104 (95,2 %)

IgM Vircel / IgM Chorus	Totale campioni N=25
Positivo/Positivo	19
Positivo / Negativo	0
Negativo / Positivo	3
Negativo / Negativo	3*

(*) – successiva sieroconversione positivo/positivo

Figura I. Confronto tra test IgM Legionella Vircel e IgM Legionella Chorus in 25 sieri di pazienti con legionellosi

IgG Vircel / IgM Chorus	Totale campioni N=25
Positivo/Positivo	7
Positivo / Negativo	0
Negativo / Positivo	1
Negativo / Negativo	17

Figura II. Confronto tra test IgG Legionella Vircel e IgG Legionella Chorus in 25 sieri di pazienti con legionellosi

Totale Ag urina N = 16	IgM Chorus pos	IgM Chorus neg
Ag urina pos N = 12	9	3
Ag urina neg N = 4	4	0

Figura III. Confronto tra test IgM Legionella Chorus e test antigenico in 16 pazienti con legionellosi

IgM Vircel / IgM Chorus + Ag urina	Totale = 16
IgM pos + Ag urina pos	9
IgM pos + Ag urina neg	4
IgM neg + Ag urina pos	3
IgM neg + Ag urina neg	0

Figura IV. Uso combinato di test IgM Legionella Chorus e test antigenico in 16 pazienti con legionellosi

CONCLUSIONI

I dati della nostra esperienza evidenziano che l'ef-

ficacia dei test proposti, il loro impiego combinato e la rapidità di esecuzione, costituiscono un fondamentale presidio nell'approccio di prima diagnosi. L'impiego combinato di test sierologici rapidi, insieme alla ricerca di frammenti antigenici di *Legionella pneumophila* è consigliabile ove sussistano una scarsa definizione temporale dell'inizio dei sintomi, nonché la disponibilità di un singolo siero da esaminare. Tale approccio riduce l'eventualità di un report completamente negativo ed attenua l'effetto delle ritardate o mancata produzione anticorpale. Una ricerca negativa di marcatori di legionellosi in prima diagnosi e la persistenza del sospetto clinico, dovrà condurre per contro ad una ulteriore e completa indagine. In attesa che le tecniche di biologia molecolare propongano al laboratorio diagnostico procedure adeguatamente standardizzate e di semplice impiego, i protocolli analitici basati su tecniche tradizionali innovative, di elevata efficienza diagnostica, costituiscono tuttora un presidio in grado di offrire un contributo rilevante alla diagnosi di legionellosi.

BIBLIOGRAFIA

- Den Boer JW, Yzerman FPF. 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, et al. Utility of Real-time PCR for diagnosis of Legionnaires' disease in routine clinical practice. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(2):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(3):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; Lúck PC, et al. Detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine samples by BinaxNOW immunochromatographic assay and comparison with both BinaxNOW 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 nosoco-

- mial Legionnaires' disease. *J Clin Microbiol*, 2003; 41: 838-40
10. Herpers BL, de Jongh BM, van der Zwaluw K, *et al.* 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
 11. Lever F, Joseph C. Travel-associated Legionnaires' disease in Europe in 2000 and 2001. *Euro Surveil*, 2003; 8:65-72
 12. Lindsay DS, Abraham WH, Findlay W, *et al.* Laboratory diagnosis of Legionnaires' disease due to *Legionella pneumophila* serogroup1: comparison of phenotypic and genotypic methods. *J Med Microbiol*, 2004; 53:183-7
 13. 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
 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(8):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* serogroup1 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