

Evaluation of a rapid immunochromatographic assay for the detection and identification of *Legionella* spp. strains isolated from cultures

Maria Chiucini¹, Marisa Meacci¹, Monica Losi², Mariagrazia Apice¹, Lorena Pozzi¹, Antonella Grotto¹, Monica Pecorari¹, Giuliana Fabio¹, Sara Tagliazucchi¹, Fabio Rumpianesi¹

¹ Struttura Complessa di Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria Modena,

² Clinica Malattie Apparato Respiratorio, Dipartimento di Oncologia, Ematologia e Patologia dell'Apparato Respiratorio, Università di Modena & Reggio Emilia, Modena

Keys words: *Legionella* spp, Immunochromatographic assay, Cultures

Valutazione di un test rapido immunocromatografico per la rilevazione e per l'identificazione di ceppi di *Legionella* spp. isolati da colture

SUMMARY

The Legionnaires' disease is a major issue in the healthcare because it ranks among the emerging infectious diseases in our country, particularly those caused by *Legionella pneumophila* serogroup 1. The severity of the infection is related to several factors including the virulence of the bacterium and the immune status of patient. Since the clinical diagnosis of *Legionella* infections or pneumonia with different etiology is extremely difficult, the use of new diagnostic techniques in rapid identification plays a key role. The aim of our study was to evaluate the performance of a new immunochromatographic assay can detect and identify strains of *Legionella* spp. from the cultures.

INTRODUZIONE

La legionellosi rappresenta un problema rilevante nell'ambiente sanitario collocandosi tra le malattie infettive emergenti, in particolare quelle causate da *Legionella pneumophila* sierogruppo (sg) 1 (2, 4). La gravità dell'infezione è correlata a diversi fattori, tra questi la virulenza del batterio e lo stato immunitario del paziente. Poiché la diagnosi clinica differenziale tra infezioni da *Legionella* e polmoniti a diversa etiologia risulta estremamente difficile, l'utilizzo di nuove tecniche diagnostiche a rapida identificazione riveste un ruolo fondamentale. Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare la performance di un nuovo test rapido immunocromatografico, VIRapid *Legionella* Culture che rileva ed identifica ceppi di *Legionella* spp. direttamente da coltura.

MATERIALI E METODI

Il kit VIRapid *Legionella* Culture è stato testato con 50 ceppi batterici isolati da coltura di cui 40 appartenenti al genere *Legionella* e 10 appartenenti ai più comuni agenti batterici coinvolti in polmoniti. Tutti i ceppi di *Legionella* erano stati identificati tramite sierotipizzazione e/o sequenziamento, mentre i 10 ceppi delle altre specie batteriche erano stati identificati tramite il sistema Vitek2 (bioMérieux S.p.A., Italia). I ceppi sono stati suddivisi in tre gruppi (Tabella 1): il gruppo 1 comprende i ceppi di *Legionella pneumophila* sg1, il gruppo 2 comprende i ceppi appartenenti a sierogruppi di *Legionella pneumophila* differenti dal sg 1 e i ceppi di *Legionella* species non *pneumophila*, il gruppo 3 comprende i ceppi batterici di altri generi.

I ceppi di *Legionella* selezionati, appartenenti alla ceppoteca della Struttura Complessa di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria del Policlinico di Modena, sono stati scongelati, riseminati nel terreno specifico per *Legionella* (BCYE) ed incubati a 35°C in ambiente microaerofilo con il 2.5% di CO₂. Dopo tre giorni di incubazione è stata valutata la crescita delle colonie e le eventuali contaminazioni. I 40 ceppi di *Legionella* sono stati testati sia con il kit VIRapid *Legionella* Culture (Viracell, Granada, Spain) distribuito in Italia da Technogenetics srl, che con il metodo da noi correntemente utilizzato per la sierotipizzazione *Legionella* Latex Test (Oxoid, Basingstoke, Hants, UK). Il kit VIRapid *Legionella* Culture identifica i ceppi di

Legionella utilizzando una metodica immunocromatografica che permette di discriminare qualitativamente tra genere, specie e sierogruppo. Vengono utilizzati anticorpi monoclonali specifici per diverse componenti della parete batterica.

In particolare per l'identificazione di genere si utilizzano anticorpi monoclonali anti-Peptidoglycan-Associated-Lipoprotein (anti-PAL); per l'identificazione di specie si usano anticorpi monoclonali diretti verso la proteina Major Outer Membrane Protein (MOMP), un epitopo presente in tutte le *Legionella pneumophila* sg 1-15; infine per l'identificazione di *Legionella pneumophila* sg 1, il bersaglio degli anticorpi monoclonali è il lipopolisaccaride (LPS).

Il test VIRapid *Legionella* Culture si esegue prelevando alcune colonie direttamente dalla piastra risospingendole in un medium fornito dal kit che promuove la lisi delle componenti parietali. Il lisato batterico viene successivamente dispensato all'interno dei pozzetti del test. La prima reazione immunologica ha luogo tra i componenti batterici ed il corrispondente anticorpo monoclonale coniugato all'oro colloidale. Questi complessi migrano lungo la strip di nitrocellulosa e vanno a determinare la comparsa di una linea rossa in caso di legame con l'anticorpo monoclonale complementare presente sulla membrana.

Dopo circa 30 minuti di incubazione a temperatura ambiente è possibile effettuare la lettura dei risultati. Per determinare la positività o meno del campione viene utilizzata una card di lettura fornita dal kit. Essa dispone di quattro livelli colorimetrici di risposta corrispondenti ad altrettanti valori numerici adimensionati che vanno da 0.5 a 3. Se l'intensità delle linee del test è inferiore al valore minimo pari a 0.5, il campione viene considerato negativo; la rilevazione di un'intensità di banda superiore al valore di 0.5, invece, depone per la positività del campione testato (Figura I).

Il test permette di identificare l'appartenenza del ceppo testato al genere *Legionella* per la presenza nella strip di una banda specifica di colore blu che indica il genere.

La presenza o l'assenza delle due bande di colore rosso nella strip che indica la specie identifica rispettivamente *Legionella pneumophila* sg 1 (Figura II) e *Legionella* non *pneumophila* (immagine non riportata). La presenza della sola banda intermedia tra la banda per il sierogruppo 1 e quella di controllo identifica *Legionella pneumophila* sg 2-15

Corresponding author: Maria Chiucini

Struttura Complessa di Microbiologia e Virologia, Azienda Integrata Ospedaliero-Universitaria, Policlinico,
Via del Pozzo 71, 41100 Modena - Tel.: 059 4223752 - Fax: 059 4223625
E-mail: chiucini@yahoo.it

(Figura III). La sola presenza delle bande di controllo nelle due strip è indicativa della non appartenenza al genere *Legionella* (immagine non riportata).

RISULTATI E DISCUSSIONE

I 40 ceppi di *Legionella* analizzati nello studio sono stati testati sia con il kit VIRapid Legionella Culture sia con il metodo da noi correntemente utilizzato Legionella Latex Test (Tabelle 2 e 3). I risultati del test VIRapid Legionella Culture concordano con quelli ottenuti con il kit Legionella Latex Test tranne che per un ceppo di *Legionella pneumophila* Corby (3) ed uno dei due ceppi di *Legionella taurinensis* (ceppo 39, Tabella 3) per i quali l'identificazione di specie è stata eseguita tramite sequenziamento del gene 16S rRNA (1). In particolare i due ceppi non hanno mostrato agglutinazione con il kit Legionella Latex Test, risultando negativi, mentre con il kit VIRapid Legionella Culture sono stati identificati come *Legionella pneumophila* species il primo ceppo e come appartenente al genere *Legionella* il secondo ceppo. In relazione al Gruppo 3 nessuno dei batteri da noi selezionati ha cross-reagito con il kit VIRapid Legionella Culture. Pertanto, da questi dati preliminari, il kit VIRapid Legionella Culture ha mostrato una sensibilità ed una specificità pari al 100%. Il riconoscimento tramite l'uso di tale kit di un ceppo ambientale quale *Legionella taurinensis* evidenzia le sue potenzialità identificative. Infatti per le caratteristiche intrinseche del test, che include una strip dedicata all'identificazione di genere, in linea teorica esso dovrebbe essere capace di identificare tutti i ceppi batterici appartenenti al genere *Legionella*. Ad ogni modo non è possibile escludere aprioristicamente la possibilità che esistano ceppi di *Legionella* con differenze antigeniche tali da determinare una mancata reattività del test. Diversamente il kit Legionella Latex Test dichiara di poter riconoscere un numero limitato di *Legionella* spp. che non include la *Legionella taurinensis*, ma in realtà ha riconosciuto uno dei due ceppi (ceppo 40, Tabella 3). Un risultato degno di nota è quello relativo al riconosci-

mento da parte del kit VIRapid Legionella Culture di un ceppo di *Legionella pneumophila* non riconosciuta dal test Legionella Latex Test.

Nonostante questi dati debbano essere considerati preliminari anche per il numero esiguo di campioni analizzati, da questo studio emerge l'importanza di valutare nuovi strumenti diagnostici in grado di riconoscere un più ampio numero di *Legionella* spp. oltre che di poter identificare con chiarezza quelle specie correlate ad una maggiore patogenicità. In conclusione il kit VIRapid Legionella Culture si è dimostrato di rapido allestimento, di semplice e chiara interpretazione ed in ultimo, ma non di minore importanza, vantaggioso per il rapporto costi/benefici.

Tabella 2. Risultati ottenuti dall'analisi dei ceppi del Gruppo 1.

	VIRapid Legionella Culture		Totale
	Positivi	Negativi	
Legionella	16	0	16
Latex Test	0	0	0
	Totale	0	16

Tabella 3. Risultati ottenuti dall'analisi dei ceppi del Gruppo 2.

	VIRapid Legionella Culture		Totale
	<i>L. pneumophila</i> sg 2-15	<i>L. non pneumophila</i>	
Legionella	15	0	15
Latex Test	0	7	7
	Negativo	1	2
	Totale	8	24

Tabella 1. Ceppi batterici testati.

	N° ceppi	Specie	Provenienza
Gruppo 1	1-15	<i>L. pneumophila</i> sg 1	isolato clinico
	16	<i>L. pneumophila</i> sg 1	isolato ambientale
Gruppo 2	17-19	<i>L. pneumophila</i> sg 3	isolato ambientale
	20	<i>L. pneumophila</i> sg 4	isolato ambientale
	21-23	<i>L. pneumophila</i> sg 6	isolato ambientale
	24	<i>L. pneumophila</i> sg 8	isolato ambientale
	25	<i>L. pneumophila</i> sg 8	isolato ambientale
	26	<i>L. pneumophila</i> sg 9	isolato ambientale
	27	<i>L. pneumophila</i> sg 9	isolato ambientale
	28	<i>L. pneumophila</i> sg 10	isolato ambientale
	29	<i>L. pneumophila</i> sg 12	isolato ambientale
	30	<i>L. pneumophila</i> sg 14	isolato ambientale
	31	<i>L. pneumophila</i> sg 14	isolato ambientale
	32	<i>L. pneumophila</i> ceppo Corby	isolato ambientale
	33	<i>L. anisa</i>	isolato ambientale
	34	<i>L. anisa</i>	isolato ambientale
Gruppo 3	35-37	<i>L. dumoffii</i>	isolato ambientale
	38	<i>L. bozemanii</i>	isolato ambientale
	39	<i>L. taurinensis</i>	isolato ambientale
	40	<i>L. taurinensis</i>	isolato ambientale
	41	<i>S. pneumoniae</i>	isolato clinico
	42	<i>S. aureus</i>	isolato clinico
	43	<i>S. aureus</i>	isolato clinico
	44	<i>E. cloacae</i>	isolato clinico
	45	<i>P. aeruginosa</i>	isolato clinico
	46	<i>P. mirabilis</i>	isolato clinico
	47	<i>K. oxytoca</i>	isolato clinico
	48	<i>K. pneumoniae</i>	isolato clinico
	49	<i>E. coli</i>	isolato clinico
	50	<i>E. coli</i>	isolato clinico



Figura I. Card di lettura del kit VIRapid Legionella Culture.

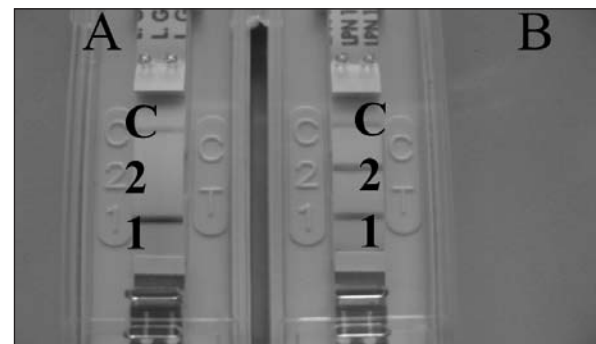


Figura II. Identificazione di *Legionella pneumophila* sg 1 mediante kit VIRapid Legionella Culture

A: strip di genere; C: banda di controllo; 1: banda genere *Legionella*; 2: assente
 B: strip di specie; C: banda di controllo; 1: banda di *Legionella pneumophila* sg 1; 2: banda di *Legionella pneumophila* sg 1-15.



Figura III. Identificazione di *Legionella pneumophila* sg 2-15 mediante kit VIRapid *Legionella* Culture

A: strip di genere; C: banda di controllo; 1: banda genere *Legionella*; 2: assente

B: strip di specie; C: banda di controllo; 1: assente; 2: banda di *Legionella pneumophila* sg 1-15.

BIBLIOGRAFIA

1. Cloud JL, Carroll KC, Pixton P, Erali M, Hillyard DR. Legionella pathogenicity: genome structure, regulatory networks and the host cell response. *Int J Med Microbiol* 2007; 297 (7-8): 577-87.
2. Fields BS, Benson RF, Besser RE. Legionella and Legionnaire's disease: 25 years of investigation. *Clin Microb Rev* 2002; 15 (3): 506-26.
3. Steinert M, Heuner K, Buchrieser C, Albert-Weissenberger C, Glöckner G. Legionella pathogenicity: genome structure, regulatory networks and the host cell response. *Int J Med Microbiol* 2007; 297 (7-8): 577-87.
4. 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.