



Raccomandazioni sulle legionelle e sulla legionellosi

Modulo 4 Diagnosi di *Legionella* spp. nei campioni clinici

La diagnosi della legionellosi si basa sulla presenza di referti clinici e/o radiologici e su analisi di laboratorio. In questo modulo vengono spiegati brevemente i vari metodi esistenti per queste analisi di laboratorio.

1 Introduzione	2
2 Coltura	2
3 Antigene	2
4 PCR	3
5 Sierologia	3
6 Tipizzazione	4
Bibliografia	4

Versione del	Versione precedente	Modifica rispetto alla versione precedente
26.04.2024	Revisione totale 2018	Nuova versione del modulo (revisione totale 2024)

1 Introduzione

Nel 2020, secondo un rapporto del Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (ECDC), l'87 % dei casi di legionellosi in Europa è stata diagnosticata utilizzando il test dell'antigene nelle urine. L'uso della coltura, della reazione a catena della polimerasi (PCR) o di una combinazione di metodi per rilevare la presenza di legionelle è molto più raro. La rilevazione tramite coltura e/o PCR è stata riportata solo in circa il 10 % dei casi.

2 Coltura

La coltura di campioni respiratori è ancora considerata il «gold standard» (standard di riferimento) per la diagnosi della legionellosi. Ciò consente di isolare il ceppo batterico e di utilizzarlo successivamente per i test di sensibilità agli antibiotici e per la tipizzazione epidemiologica. Si tratta di una tecnica piuttosto laboriosa che richiede una notevole esperienza. I batteri devono essere coltivati per diversi giorni. Tuttavia, le legionelle non crescono su terreni di coltura standard in laboratori microbiologici, ma necessitano di un terreno di coltura complesso, ovvero uno speciale terreno di coltura con estratto di lievito e carbone attivo (*buffered charcoal yeast extract*, BCYE). È possibile anche eseguire contemporaneamente una coltura di *Legionella* spp. su delle amebe. Questa tecnica può essere utilizzata per coltivare specie che non crescono su BCYE. Tuttavia, questo metodo è attualmente ancora in fase di ricerca.

Rispetto ai tamponi faringei o nasofaringei, le legionelle sono state isolate con maggior successo da campioni di materiale proveniente dal tratto respiratorio inferiore. I campioni che non provengono dal tratto respiratorio inferiore sono molto raramente positivi in coltura.

Gli svantaggi della coltura sono :

- la lunga durata dell'analisi (fino a 14 giorni);
- la bassa sensibilità rispetto ad altri metodi;
- la limitata disponibilità di materiale clinico idoneo, preferibilmente proveniente dal tratto respiratorio inferiore.

Il grande vantaggio di questo metodo è che il ceppo clinico può essere caratterizzato genomicamente e confrontato con campioni ambientali. Questo è uno dei fattori chiave per identificare la fonte d'infezione e contenere la diffusione. È quindi importante, se possibile, eseguire un esame colturale per tutti i pazienti con un test positivo dell'antigene nelle urine (cfr. capitolo 6).

3 Antigene

L'introduzione, alla fine degli anni '90, di test immunoenzimatici per la rilevazione dell'antigene di *L. pneumophila* nelle urine ha permesso di accelerare la diagnosi di legionellosi. L'antigene rilevato è un lipopolisaccaride (LPS) batterico, sulla cui diversità si basa l'identificazione dei sierogruppi di *L. pneumophila*. L'antigene è rilevabile nella maggior parte dei pazienti già a partire da uno a tre giorni dopo la comparsa dei sintomi. Lo sviluppo e la diffusione di kit rapidi per il rilevamento dell'antigene nelle urine, come i test immunocromatografici a flusso laterale o a fluorescenza hanno rivoluzionato la diagnosi della legionellosi consentendo un adattamento precoce della terapia antibiotica.

I kit disponibili in commercio rilevano principalmente *L. pneumophila* sierogruppo 1 (Lp1) e non hanno purtroppo le stesse prestazioni con i ceppi appartenenti ad altri sierogruppi. La sensibilità dipende quindi dal sierotipo che ha causato l'infezione. È dell'86 % per la Lp1 e tra il 74 e il 79 % se si considerano tutti i sierogruppi.

Uno dei principali svantaggi del test dell'antigene nelle urine è rappresentato da segnali aspecifici dovuti agli immunocomplessi presenti nelle urine, che possono influenzare il test e quindi portare a risultati falsi positivi. Questo fenomeno può essere risolto facilmente riscaldando brevemente l'urina a 100 °C. Dato che l'LPS delle legionelle è resistente al calore, il riscaldamento del campione di urina permette di liberare i polisaccaridi batterici dai complessi anticorpali e di eliminare interferenze aspecifiche. Questa semplice procedura di riscaldamento è raccomandata per la conferma di **qualsiasi** test positivo dell'antigene urinario della *Legionella*. Un altro fattore che può causare falsi positivi è la persistenza dell'antigene di legionelle nelle urine. Studi recenti hanno dimostrato che l'antigene può essere rilevato per diversi mesi (fino a un anno) dopo la

scomparsa dei sintomi. Ciò si verifica in circa il 10 % dei casi e soprattutto in pazienti con gravi malattie di base o in soggetti immunocompromessi.

I vantaggi della rilevazione dell'antigene urinario rispetto ad altri metodi diagnostici sono notevoli:

- i campioni di urina sono facilmente reperibili;
- l'antigene può essere rilevato molto presto nel corso della malattia,
- il test è rapido e facile da eseguire;
- il test ha un elevato valore predittivo positivo: ciò significa che la maggior parte delle persone con un risultato positivo al test sono realmente infette da legionelle.

Per il medico, l'utilità del test risiede nell'elevato valore predittivo positivo. Nel caso di sintomi che indicano la legionellosi, un risultato positivo del test suggerisce quindi fortemente che la persona è effettivamente infetta. Tuttavia, un risultato negativo non esclude la legionellosi. Pertanto, se una persona è ancora sospettata di essere infetta, in caso di risultato negativo è necessario utilizzare altri metodi di rilevamento per ulteriori chiarimenti.

Recentemente sono stati sviluppati e lanciati sul mercato dei test basati su altri antigeni come le proteine ribosomiali. Sebbene manchino ancora studi scientifici in merito, questi test sembrano molto promettenti e permetterebbero il rilevamento di altri sierogruppi e persino di altre specie di legionelle.

4 PCR

La PCR è un metodo che può potenzialmente individuare tutte le specie di legionelle conosciute. La PCR utilizzata su campioni provenienti dal tratto respiratorio (secrezioni bronchiali, lavaggio broncoalveolare, biopsie o espettorato) costituisce un metodo di analisi rapido con buona specificità e sensibilità. Purtroppo, i pochi studi disponibili che hanno valutato la PCR in materiali come siero e urine hanno mostrato una bassa sensibilità.

Le tecnologie per l'amplificazione di acidi nucleici richiedono personale appositamente formato e attrezzature sofisticate. Tuttavia, grazie ai progressi tecnologici degli ultimi anni, questi metodi sono sempre più disponibili per i laboratori con un budget ridotto.

Alcuni studi hanno mostrato che l'uso della PCR in aggiunta al test dell'antigene urinario aumenta le diagnosi dei casi di legionellosi del 18–30 %. Con l'utilizzo sempre più frequente di pannelli PCR multiplex (che mirano a più microrganismi contemporaneamente) nella diagnosi delle polmoniti di origine extra-ospedaliera o comunitaria (CAP), anche la diagnosi di legionelle mediante PCR è destinata ad aumentare.

5 Sierologia

Fino alla metà degli anni '90, il rilevamento della legionellosi era basato principalmente sulla diagnosi sierologica. Con la successiva introduzione del test dell'antigene urinario e l'utilizzo sempre più frequente delle tecniche molecolari nei campioni del tratto respiratorio, la diagnosi sierologica ha perso progressivamente importanza.

La sierologia fornisce solo una diagnosi retrospettiva e non è un indicatore tempestivo della malattia. Affidarsi ad una sieroconversione tra campioni in fase acuta e convalescente prelevati a distanza di 4–8 settimane l'uno dall'altro significa che la finestra per il trattamento è passata da tempo. D'altro canto basarsi su un unico titolo anticorpale elevato può essere problematico, poiché diversi studi di prevalenza suggeriscono che, a seconda dall'età, della località e dell'ambiente di lavoro, titoli elevati di anticorpi contro le legionelle possono essere rilevati fino al 30 % degli individui sani.

Riconoscendo tutte queste limitazioni, i test sierologici hanno perso importanza per la diagnosi primaria di legionellosi. Il loro utilizzo è più utile per studi epidemiologici.

6 Tipizzazione

La tipizzazione dei ceppi di *Legionella* spp. isolati da campioni di pazienti e da campioni ambientali serve a determinare o a escludere un collegamento con le fonti di infezione. Consente di analizzare e seguire nel tempo lo sviluppo della distribuzione dei ceppi batterici dal livello locale a quello internazionale.

Si distinguono due tipi di tipizzazione degli isolati coltivati: i metodi fenotipici, come la sierotipizzazione, utilizzano caratteristiche biochimiche o immunologiche degli isolati. I metodi genotipici di tipizzazione molecolare si basano su diversi modelli di sequenze di acidi nucleici del genoma batterico, tra cui, ad esempio, l'*Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), il *Pulsed Field Gel Electrophore* (PFGE), la *Sequence-Based Typing* (SBT) o il *sequenziamento dell'intero genoma* (*whole genome sequencing*, WGS). Con il WGS, il DNA completo delle legionelle può essere rappresentato e confrontato tra loro.

Bibliografia

European Centre for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2020. Stockholm: ECDC; 2022.

Kawasaki T., Nakagawa N., Murata M., Yasuo S., Yoshida T., Ando K, Satoshi O., Okada Y. Diagnostic accuracy of urinary antigen tests for legionellosis: A systematic review and meta-analysis. *Respiratory Investigation* 2022; 60:205-214.

Mercante J. W., Winchell J. M. Current and emerging Legionella diagnostics for laboratory and outbreak investigations. *Clinical Microbiology Reviews* 2015; 28:95-133.

Viasus D., Gaia V., Manzur-Barbur C., Carratalà J. Legionnaires' Disease: Update on Diagnosis and Treatment. *Infectious Diseases and Therapy* 2022; 11:973-986.