

Comparison of three assays currently used for diagnosis of legionellosis

Maria Chiucini, Anna Fabio, Marisa Meacci, Barbara Meccugni, Valentina Gilioli, Valeria Petocchi, Giuliana Fabio, Anna Maria Teresa Sabbatini, Sara Tagliazucchi, Sandra Mattioli, Fabio Rumpianesi

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

Key words: *Legionella pneumophila*, cultures, urinary antigen, antibody research

Confronto dei test diagnostici correntemente utilizzati per la diagnosi di legionellosi

SUMMARY

The laboratory diagnosis of Legionnaires' disease is extremely complex due to the difficulty of isolating and identifying the etiological agent in a short time and also for the frequent late appearance of antibodies. For this reason it should use not only the cultures but also other diagnostic tests such as urinary antigen and antibody research.

Our study evaluated the performance of these methods. We calculated the positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV), sensitivity and specificity of each test.

INTRODUZIONE

La diagnosi di laboratorio di legionellosi risulta estremamente complessa per la difficoltà di isolare e identificare l'agente eziologico in tempi brevi, ma anche per la sovente comparso tardiva degli anticorpi (1). Per tale ragione occorre utilizzare, oltre all'isolamento culturale, altri test diagnostici come la ricerca dell'antigene urinario e la ricerca anticorpale (4). Il nostro studio è rivolto alla valutazione delle prestazioni delle suddette metodiche. A tale scopo è stato calcolato il Valore Predittivo Positivo (VPP) ed il Valore Predittivo Negativo (VPN), la sensibilità e specificità di ciascun test.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati 3540 campioni biologici pervenuti presso la Struttura Complessa di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Modena dal 2003 al 2009. I campioni suddetti provengono da 2547 pazienti ricoverati per sospetta infezione da *L. pneumophila* (Tabella 1).

Isolamento culturale

È stato condotto mediante l'impegno di terreni di coltura specifici selettivi arricchiti: BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) e MWY (Wadowsky - Yee Medium) della ditta Oxoid (Basingstoke, Hampshire, UK). Le eventuali colonie cresciute su BCYE e su MWY sono state sottoposte a sierotipizzazione mediante test di agglutinazione al lattice (Oxoid), che identifica *L. pneumophila* sierogruppo (sg)1, 2-14 e *L. longbeachae* 1-2, *L. bozemanii* 1-2, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. jordanis*, *L. micdadei*, *L. anisa*. In presenza di un'agglutinazione dei sg da 2-14, si è proceduto ad applicare un'ulteriore metodica per identificare lo specifico sierogruppo di *L. pneumophila* (Pro-Lab Diagnostics, Richmond Hill, Canada).

Antigene solubile nelle urine

L'antigene solubile urinario è stato ricercato mediante due metodiche immunocromatografiche ed una immunoenzimatica. Le metodiche immunocromatografiche sono BinaxNOW (Inverness Medical, Molenstraat, Netherlands) che permette il rilevamento qualitativo dell'antigene solubile di *L. pneumophila* sg1 e ?/pect legionella (Oxoid, Basingstoke, UK) che permette il rilevamento indifferenziato di *L. pneumophila* sg 1/sg 6. La metodica immunoenzimatica: ELISA (BIO-TEST, Dreieich, Germany) permette di rilevare *L. pneumophila* di sg1 e sg 2-4, 6 e 10.

Ricerca di anticorpi nel siero

Il dosaggio degli anticorpi anti-Legionella di classe IgG ed IgM, eseguito mediante test ELISA *Legionella pneumophila* sg 1-7 (Virino/Serion GmbH, Würzburg, Germany), è stato

condotto su coppie di sieri, come indicato nelle linee guida regionali (2), allo scopo di evidenziare un'eventuale sieroconversione.

RISULTATI

Come mostrato in Tabella 2, gli esiti ottenuti hanno evidenziato una negatività del 95.5% (3381/3540) ed una positività del 4.1% (144/3540) per tutte le indagini eseguite. Sono stati riscontrati 15 esiti borderline di cui 14 relativi alla valutazione dell'antigenuria e uno relativo al dosaggio di IgG. L'isolamento culturale, eseguito su 458 campioni, ha evidenziato assenza di crescita di *L. pneumophila* nel 96.3% dei casi (441/458) e crescita nel 3.7% (17/458); la sierotipizzazione ha evidenziato stipti di sg 1.

La rilevazione dell'antigene solubile urinario ha evidenziato esiti positivi pari al 3.4% (78/2314) e esiti negativi pari al 96.0% (2222/2314).

I risultati sierologici di IgG ed IgM hanno rilevato una positività per IgM nel 4.9% (19/384) indice di infezione primaria o di permanenza delle immunoglobuline. Le IgG sono risultate positive nel 7.8% dei pazienti (30/384) indicando una risposta specifica secondaria alle IgM.

L'analisi degli risultati ottenuti dalle metodiche diagnostiche impiegate e dalle condizioni cliniche dei pazienti, riportate nella cartella di dimissione, permettono di quantificare il valore di ciascun test (Tabelle 3-5). A tale scopo è stato calcolato il Valore Predittivo Positivo (VPP), per valutare quanti soggetti siano stati correttamente diagnosticati come malati ed il Valore Predittivo Negativo (VPN) per valutare quanti soggetti siano stati diagnosticati correttamente come non affetti da legionellosi. Sapendo che la prevalenza della malattia è bassa, e quindi il VPP dei test non sarà mai vicino al 100%, è stata appositamente valutata una popolazione a rischio di legionellosi.

Come mostrato in Tabella 3, l'isolamento culturale dimostra massima sensibilità e specificità e un VPP e un VPN corrispondenti al 100%.

La Tabella 4 evidenzia che la sensibilità del test per la rilevazione dell'antigene urinario si è collocata su valori intermedi rispetto a quelli riferiti dalle specifiche del kit (75 - 99%), mentre la specificità si è collocata nel range riferito (99-100%). È risultato ottimale il VPN superiore al VPP.

Nella Tabella 5 si riportano i dati relativi al dosaggio anticorpale; tale test ha dimostrato una ridotta sensibilità rispetto a quanto dichiarato dalla ditta produttrice che riporta valori variabili dal 70-80%. La specificità è risultata elevata e superiore a quella dichiarata. Il VPP è risultato inferiore al VPN (96.9%).

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

Tabella 1. Numero di esami suddivisi per tipologia di indagine

Periodo 2003-2009	Isolamento colturale materiali respiratori	Antigene urinario	Sierologia IgG/IgM	Totale
N° esami	458	2314	384/384	3540

Tabella 2. Risultati ottenuti suddivisi per tipologia di esame

Periodo 2003 - 2009	Esito positivo	Esito negativo	Esito borderline	Totale esami
Isolamento colturale materiali respiratori	17 (3.7%)	441 (96.3%)	/	458 (13%)
Ag urinario	78 (3.4%)	2222 (96.0%)	14 (0.6%)	2314 (65.4%)
Anti-Legionella IgG	30 (7.8%)	353 (91.9%)	1 (0.3%)	384 (10.8%)
Anti-Legionella IgM	19 (4.9%)	365 (95.1%)	/	384 (10.8%)
Totale	144 (4.1%)	3381 (95.5%)	15 (0.4%)	3540

Tabella 3. Validità dell'isolamento colturale

	Malati	Sani	Totale
Positivi	a (VP) 17	b (FP) 0	a+b 17
Negativi	c (FN) 0	d (VN) 441	c+d 441
Totale	a+c 17	b+d 441	a+b+c+d 458
Sensibilità: a/(a+c)	17/17 = 100%		
Specificità: d/(b+d)	441/441 = 100%		
VPP: a/(a+b)	17/17 = 100%		
VPN: d/(c+d)	441/441 = 100%		

Tabella 4. Validità della rilevazione dell'antigene urinario

	Malati	Sani	Totale
Positivi	a (VP) 69	b (FP) 9	a+b 78
Negativi	c (FN) 15	d (VN) 2221	c+d 2236
Totale	a+c 84	b+d 2230	a+b+c+d 2314
Sensibilità: a/(a+c)	69/84 = 82.1%		
Specificità: d/(b+d)	2221/2230 = 99.6%		
VPP: a/(a+b)	69/78 = 88.5%		
VPN: d/(c+d)	2221/2236 = 99.3%		

Tabella 5. Validità del dosaggio anticorpale (IgM e IgG)

	Malati	Sani	Totale
Positivi	a (VP) 37	b (FP) 12	a+b 49
Negativi	c (FN) 22	d (VN) 697	c+d 719
Totale	a+c 59	b+d 709	a+b+c+d 768
Sensibilità: a/(a+c)	37/59 = 62.7%		
Specificità: d/(b+d)	697/709 = 98.3%		
VPP: a/(a+b)	37/49 = 75.5%		
VPN: d/(c+d)	697/719 = 96.9%		

DISCUSSIONE

Il *test* per la ricerca di antigene urinario ha presentato ottima specificità e buona sensibilità con elevato VPN e quindi ha dimostrato di individuare correttamente il maggior numero di soggetti non affetti da legionellosi.

Gli esiti relativi al dosaggio anticorpale hanno mostrato bassa sensibilità; il VPN è risultato ottimale mentre il VPP è risultato inferiore probabilmente, come indicato dalla ditta produttrice, a causa di cross-reattività con altri agenti patogeni.

I risultati ottenuti dall'isolamento colturale hanno dimostrato la più elevata sensibilità e specificità ed ottimo VPP e VPN; pertanto l'isolamento colturale si riconferma il gold standard diagnostico ma, per la non facile reperibilità dei campioni e i tempi relativamente lunghi di crescita delle colonie, deve essere affiancato dalle altre metodiche descritte ai fini di una più rapida e completa definizione etiologica della malattia (3).

BIBLIOGRAFIA

1. Bartram J, Chartier Y, Lee J, Pond K, Surman-Lee S. *Legionella* and the prevention of legionellosis. *World Health Organizations* 2007.
2. Bollettino Ufficiale RER. Deliberazione della Giunta Regionale 21 luglio 2008, n.1115. *Approvazione linee guida regionali per la sorveglianza e il controllo della legionellosi.*
3. Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and Legionnaire's disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15 (3): 506-26.
4. Stout JE, Rihs JD, Yu VL. *Legionella*. In: Manual of clinical microbiology, Murray PR, et al. Eds., 8th Edition., *ASM Press, Washington DC* 2003; 809-82.