

METODI DIAGNOSTICI NELLA LEGIONELLOSI

La sensibilità e specificità dei metodi diagnostici sono abbastanza elevate solo per *L. pneumophila* sierogruppo 1.

Ricerca di antigeni solubili nell'urina: La presenza dell'antigene solubile di *Legionella* nelle urine (antigenuria) si rileva nella maggior parte dei pazienti **da uno a tre giorni dopo l'insorgenza dei sintomi, con un picco a 5-10 giorni; può persistere per alcune settimane o mesi, soprattutto in pazienti immunocompromessi, dove può persistere per quasi un anno.** Inoltre, essendo la sensibilità al test spesso associata alla gravità della malattia, per evitare una mancata diagnosi nei casi di polmonite meno grave si dovrebbe fare ricorso ad altri test diagnostici. **La sua presenza, tuttavia, può essere a volte intermittente,** quindi in casi dubbi si consiglia la ripetizione dell'esame e l'associazione con altri test diagnostici. **Questo test è attualmente validato esclusivamente per *L. pneumophila* sierogruppo 1,** anche se, in una certa percentuale di casi, è stata riscontrata positività a seguito di infezioni causate da altri sierogruppi di *Legionella*. **Pertanto la positività del test non implica necessariamente che l'agente eziologico sia *L. pneumophila* sierogruppo 1, anche se questa è la situazione più frequente.** La conferma può essere ottenuta solo con l'utilizzo di altri metodi diagnostici (coltura, sierologia). La determinazione dell'antigene urinario può essere effettuata attraverso due metodiche:

- **Il metodo immunoenzimatico (EIA),** che ha una specificità dell'80–85%, simile a quella della coltura, ma una sensibilità maggiore. La determinazione dell'antigene urinario mediante EIA è **il metodo di scelta per la diagnosi di infezione da *L. pneumophila* sierogruppo 1.**
- **Il metodo immunocromatografico** è un saggio molto rapido (**15 min-1h**) per la rilevazione dell'antigene di *L. pneumophila* sierogruppo 1 che non richiede particolari attrezzature di laboratorio. Tuttavia, campioni con bassa concentrazione di antigene potrebbero dare un risultato debole.

Vantaggi: i campioni sono ottenuti facilmente, è rilevabile nelle fasi precoci della malattia e il test è facile e rapido da effettuare, oltre che specifico.

Svantaggi: proprio per la sua persistenza, **può risultare difficile distinguere tra infezione acuta, fase di convalescenza o infezione pregressa.** Un altro limite del test è che rileva prevalentemente gli antigeni di *L. pneumophila* sierogruppo 1. Uno studio sistematico che ha saggiato il test con numerosi ceppi di *Legionella* ha rilevato una **totale assenza di reattività di antigeni di specie di *Legionella non-pneumophila*.** Falsi positivi sono stati descritti in pazienti con malattia da siero e in infezioni ascrivibili a *Nocardia asteroides*.

Esame colturale: L'isolamento mediante coltura è considerato il **metodo diagnostico di elezione** per la diagnosi di legionellosi. I campioni utilizzabili dovrebbero essere raccolti prima dell'inizio della terapia antibiotica. I campioni comprendono **espettorato, BAL, tracheoaspirato, liquido pleurico, parenchima polmonare, ascesso** (in alcuni casi *Legionella* è stata trovata anche in campioni provenienti da siti extra polmonari come **sangue, liquido sinoviale, liquido pericardico e campioni autoptici**). L'isolamento del batterio richiede terreni di coltura specifici poiché *Legionella* non cresce sui terreni di uso comune, ed ha tempi di crescita relativamente lunghi (4-10 giorni). **L'analisi mediante coltura è estremamente importante, perché è il criterio diagnostico più specifico, permette l'isolamento di tutte le specie e sierogruppi e consente lo studio comparativo con ceppi di *Legionella* isolati dall'ambiente, presumibilmente associati all'infezione, al fine di individuare la fonte dell'infezione.** E' necessario prendere in considerazione una diagnosi di legionellosi se si osservano batteri Gram-negativi nelle secrezioni delle basse vie respiratorie di un paziente immunocompromesso, con una coltura negativa dopo 24 ore sui terreni di uso corrente.

Metodi sierologici

- **Immunofluorescenza indiretta (IFI):** un aumento significativo del titolo anticorpale si presenta da 1 a 9 settimane dopo l'insorgenza della malattia in circa i $\frac{3}{4}$ dei pazienti con coltura positiva per *L. pneumophila* sierogruppo 1. In media i pazienti sviluppano anticorpi in due settimane. **La determinazione della classe anticorpale (IgG, IgM, IgA) non è di aiuto nel differenziare tra un'infezione in atto e un'infezione pregressa.** Tuttavia, un **aumento di 4 volte o più del titolo anticorpale tra due sieri prelevati nella fase acuta e convalescente della malattia ha valore diagnostico.** Un risultato positivo su un singolo siero ha un valore diagnostico presuntivo. In generale comunque, il metodo sierologico **ha un valore predittivo positivo piuttosto basso.** Inoltre si possono avere **falsi negativi** a causa della scarsa risposta anticorpale di pazienti con polmonite da *Legionella* che generalmente hanno difese immunitarie compromesse oppure a causa della sieroconversione a volte molto tardiva, oppure semplicemente a causa dell'età avanzata in cui si verifica un naturale declino della risposta immunitaria. La specificità e la sensibilità dell'immunofluorescenza indiretta è stata valutata **solo per *L. pneumophila* sierogruppo 1.** **L'esistenza di reattività crociata tra *Legionelle* e altri microrganismi (ad es. *Campylobacter* e *Pseudomonas* spp) e la difficoltà di distinguere tra infezione in atto o infezione pregressa in caso di campione singolo di siero o di titolo anticorpale costante, rende la conferma diagnostica più complessa .**
- **Microagglutinazione ed ELISA:** sono test sierologici più specifici per *L. pneumophila* sierogruppo 1. La **microagglutinazione** è un metodo rapido ed economico che permette di evidenziare anticorpi appartenenti essenzialmente alla classe IgM, per questo motivo, e per tutto quanto detto in merito alla risposta anticorpale è una tecnica scarsamente utilizzata nella diagnosi di legionellosi. Il **metodo ELISA** viene utilizzato sempre più frequentemente nei laboratori di diagnostica, grazie alla diffusione di numerosi **kit commerciali**; la concordanza tra il test ELISA e l'immunofluorescenza è del 91% circa. La sensibilità è tra l'80% e il 90% e la specificità è di circa il 98%.

Immunofluorescenza diretta (DFA): l'evidenziazione di *Legionella* nei campioni clinici, pur permettendo di confermare la diagnosi di polmonite da *Legionella* entro poche ore, ha una validità inferiore al metodo colturale. La tecnica si esegue in 2-3 ore circa, richiede una certa preparazione ed esperienza nella lettura del preparato ed è influenzata dalla specificità degli antisieri utilizzati e dalle dimensioni del preparato esaminato. La DFA effettuata su escreato può dare risultati positivi fino a 2-4 giorni dopo l'inizio della terapia antibiotica ed è un metodo efficace inoltre con campioni di aspirati endotracheali, trans tracheali e su biopsie polmonari. Pazienti con legionellosi diagnosticata mediante coltura, hanno una DFA positiva tra il 25-70%, tuttavia la specificità del test è superiore al 99,9%, pertanto un risultato negativo non esclude la diagnosi di legionellosi, ma un risultato positivo ha quasi sempre un valore diagnostico.

Amplificazione di geni specifici mediante PCR: Recentemente sono stati sviluppati protocolli di **"multiplex realtime PCR"** per la diagnosi di polmoniti causate da *Legionella*, in cui si evidenziano contemporaneamente *L. pneumophila* sierogruppo 1, tutti i sierogruppi di *L. pneumophila* e le altre specie di *Legionella*. Attraverso la multiplex real-time PCR sono stati sviluppati anche dei saggi attraverso i quali è possibile mettere in evidenza simultaneamente il DNA di *Legionella* e di alcuni dei microrganismi più frequentemente associati con le infezioni polmonari quali *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Streptococcus*. Richiede tempi di analisi di poche ore e ha una sensibilità pari, se non superiore, all'esame colturale. La sensibilità della PCR dipende dal tipo di campione: è più elevata (> 99%) per analisi effettuate su campioni del tratto respiratorio (espettorato, broncoaspirato, broncolavaggio) e si riduce per campioni rappresentati da altri liquidi corporei (sieri o urine). La specificità è data dal gene e/o dalla porzione di gene target scelto per l'amplificazione. I geni target più frequentemente analizzati sono: *mip*, 16S rDNA, 5S rDNA³.