

REGIONE VENETO  
AZIENDA ULSS 18  
ROVIGO



**AGGIORNAMENTO SU PREVENZIONE E CONTROLLO DELLA  
LEGIONELLOSI NELLE STRUTTURE SANITARIE E ALBEGHIERE  
DEL VENETO**

**Venezia 29 gennaio 2008**

**DIAGNOSTICA MICROBIOLOGICA**

**M. SCARIN**

**MICROBIOLOGIA**

**AZIENDA SANITARIA ULSS 18 ROVIGO**

## LA DIAGNOSI MICROBIOLOGICA DELLE LEGIONELLOSI

Famiglia Legionellaceae 48 specie e oltre 60 sierogruppi

20 specie sono state documentate come patogene per l'uomo

>90 % delle infezioni *Legionella pneumophila* sierogruppo 1 -4-6 (sierogruppo 1 c.a. 80%) 30% in Australia e Nuova Zelanda (50% *L. longbeachae*)

Ampiamente diffuse in natura negli ambienti acquatici sia naturali che artificiali

Legionella è un microrganismo “fastidious” dal punto di vista nutrizionale

Comunemente isolato in presenza altri microrganismi quali amebe che supportano la loro crescita

# Caratteristiche cliniche delle infezioni da Legionella

Trasmissione per inalazione del microrganismo presente in aerosol da una fonte ambientale o iatrogena in seguito all'impiego di nebulizzatori o umidificatori

## Polmonite

**(sintomatologia indistinguibile da altri agenti eziologici)**

È la forma più comune, la severità varia da forme moderate a mortali.

Esordio brusco dopo un periodo di incubazione di 2-10 giorni con febbre, mialgia, mal di testa, e tosse non produttiva, talora diarrea acquosa e sintomatologia neurologica da moderato mal di testa ad una encefalopatia.

Diagnostica per immagine presenta infiltrati con progressione di consolidamento spesso con versamento pleurico.

## Malattia non polmonare o febbre di Pontiac

Forma febbrile acuta che insorge 24-48 ore dopo l'esposizione a qualsiasi specie ma in particolare a *L.pneumophila*, *L. feeleii*, *L. micdadei*, *L. anisa*.

La malattia assomiglia ad una influenza e di solito è autolimitante senza coinvolgimento polmonare.

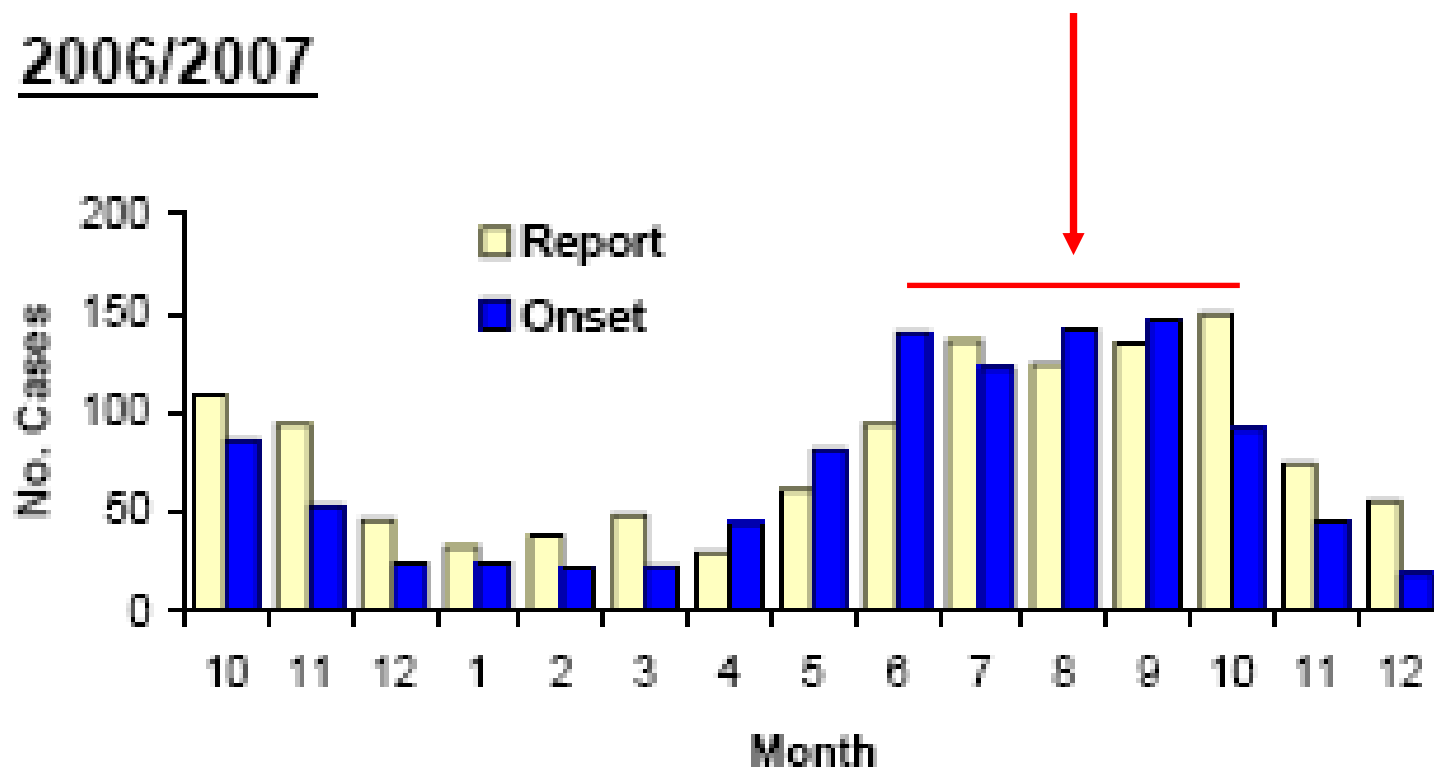
**TABLE 2****Cases of legionnaires' disease and rate per million population by selected countries, EWGLI, 2003-2004**

Country	Population (millions)	All reported cases 2003 (Rate)	All reported cases 2004 (Rate)
Belgium	10.4	8.9	15.6
Denmark	5.4	19.1	19.1
England and Wales	52.7	5.9	5.8
France	60.2	17.2	19.9
Germany	82.5	3.6	4.8
Italy	57.8	9.7	9.7
Netherlands	16.3	13.7	14.8
Spain	41.1	28.7	23.8
Sweden	9.0	8.8	12.1
Switzerland	7.4	24.1	20.0

Source: Information obtained from the European Working Group for Legionella Infections (EWGLI) <http://www.ewgli.org/>

**Figure 1. Total cases by report and onset month**

**2006/2007**



# **Fattori di rischio predisponenti**

**Fumo di sigaretta**

**Patologie polmonari  
croniche**

**Età**

**Immunosoppressione**

**Interventi chirurgici**

**Pazienti trapiantati**

**Viaggi**

# Case Definitions



## Confirmed case

An acute lower respiratory infection with focal signs of pneumonia on clinical examination and/or radiological evidence of pneumonia and one or more of the following:

- Isolation of any Legionella organism from respiratory secretion, lung tissue or blood.
- A fourfold or greater rise in specific serum antibody titre to *L. pneumophila* sg1.
- The detection of specific Legionella antigen in urine using validated reagents and methods recommended by EWGLI in 1998.

# Presumptive case (1)



An acute lower respiratory infection with focal signs of pneumonia on clinical examination and/or radiological evidence of pneumonia and one or more of the following:

- A fourfold or greater rise in specific serum antibody titre to *L. pneumophila* other serogroups or other *Legionella* species.
- A single high titre\* in specific serum antibody to *L. pneumophila* sg1 or other serogroups or other *Legionella* species.
- The detection of specific *Legionella* antigen in respiratory secretion or direct fluorescent antibody (DFA) staining of the organism in respiratory secretion or lung tissue using evaluated monoclonal reagents.
- The detection of *Legionella* specific DNA by polymerase chain reaction (PCR).





## Presumptive case (2)

### European Working Group for Legionella Infection

- “A single high titre\* in specific serum antibody to *L.pneumophila* sg1 or other serogroups or other *Legionella* species”
- \* A single high serological titre: as differing serological testing methods are used in different countries, and as an international accepted exercise has not been carried out, no specific serological test or titre level can be specified. It is suggested however that the single high titre result considered to indicate recent *Legionella* infection, in presence of compatible symptoms, by set at a sufficiently high level to the specific for *Legionella* infection ( i.e. to produce a low level of false positives)

# LEGIONELLA

## and the prevention of legionellosis

Edited by:

Jamie Bartram, Yves Chartier, John V Lee,  
Kathy Pond and Susanne Surman-Lee

© World Health Organization 2007

Despite the availability of immunological and molecular genetic methods, diagnosis of Legionnaires' disease is generally effective only for *L. pneumophila* serogroup 1. The sensitivity and specificity of methods for diagnosing and identifying other *L. pneumophila* serogroups and species of *Legionella* are far from perfect (Tartakovsky, 2001).

**La diagnosi di legionellosi è essenzialmente diagnosi di  
*Legionella pneumophila* sg 1**

# Strumenti del Laboratorio di Microbiologia per la diagnosi di Legionella

## Dati anagrafici e clinico-anamnestici

(la ricerca va eseguita in particolare su pazienti di età >40 anni, immunodepressi o che non rispondono ad una terapia con beta-lattamici o che possono essere stati esposti a *Legionella* in caso di un episodio epidemico, Bartlett JG Clin Inf Dis 1998, 26:811-838)

- **Isolamento in coltura**
- **Ricerca dell'antigene urinario**
- **Ricerca diretta con metodo di (DFA)**
- **Test immunosierologici (IFI-ELISA)**
- **Ricerca del DNA con tecniche molecolari**

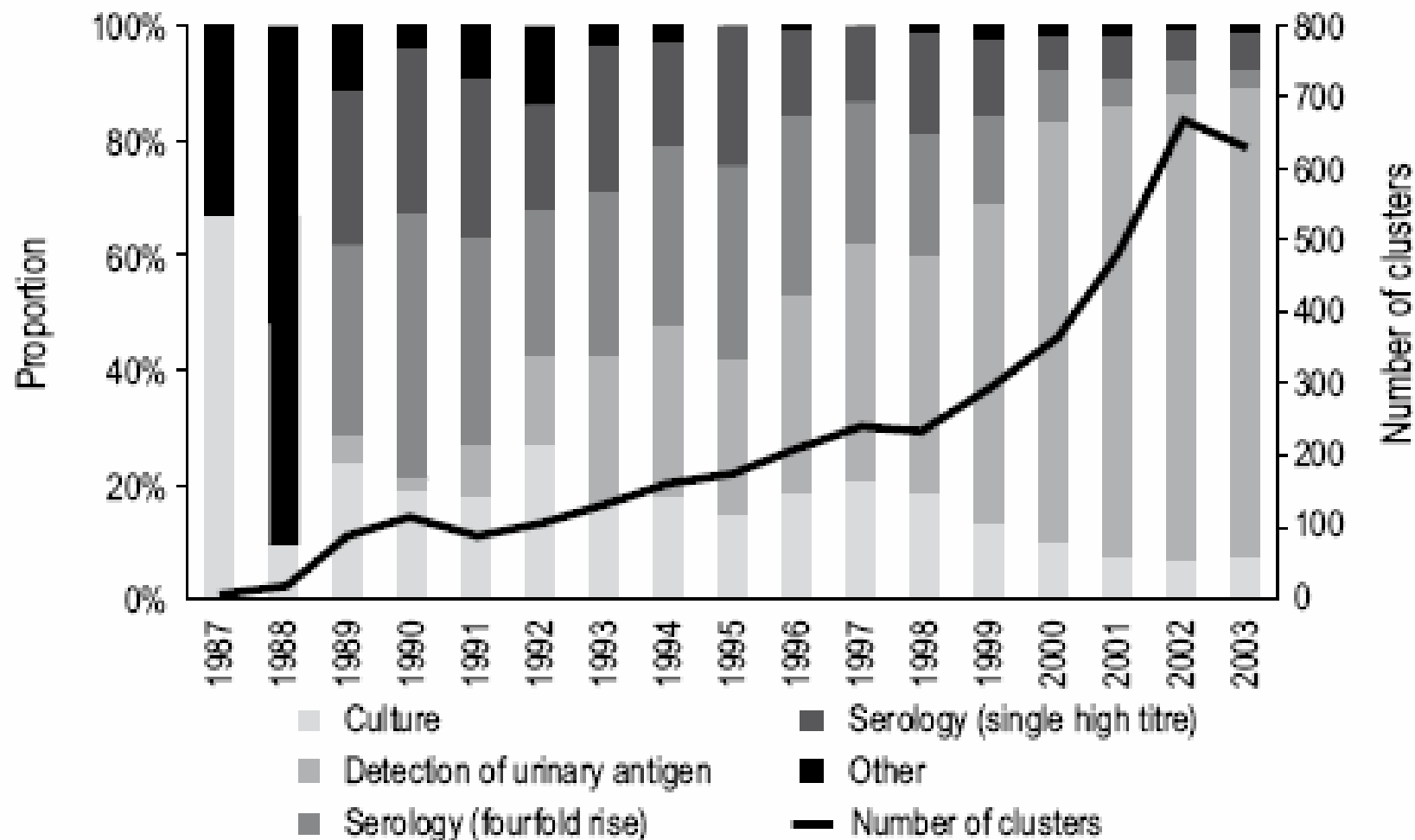
TABLE 5

Cases of legionnaires' disease and proportion by main method of diagnosis, EWGLI, 2003-2004

Main method of diagnosis	<i>L. pneumophila</i> sg1 n (%)	<i>L. pneumophila</i> (other serogroup), or serogroup not determined n (%)	Other <i>Legionella</i> species or species unknown n (%)	All cases n (%)
Isolation	720 (10.3%)	152 (10.0%)	44 (7.0%)	916 (10.0%)
Antigen detection				
Urinary	5885 (84.0%)	629 (41.2%)	180 (28.4%)	6694 (73.0%)
Serology				
Seroconversion	140 (2.0%)	228 (14.9%)	104 (16.4%)	472 (5.1%)
Serology				
Single high titre	205 (2.9%)	352 (23.1%)	138 (21.8%)	695 (7.6%)
Antigen detection				
Respiratory	9 (0.1%)	26 (1.7%)	2 (0.3%)	37 (0.4%)
PCR	9 (0.1%)	61 (4.0%)	32 (5.1%)	102 (1.1%)
Other	16 (0.2%)	10 (0.7%)	7 (1.1%)	33 (0.4%)
Unknown	23 (0.3%)	68 (4.5%)	162 (19.9%)	217 (2.4%)
<b>Total</b>	<b>7007 (100%)</b>	<b>1526 (100%)</b>	<b>633 (100%)</b>	<b>9166 (100%)</b>

(Each case counted once only)

Method of diagnosis by year of onset of disease



Source: Information obtained from the European Working Group for Legionella Infections (EWGLI) <http://www.ewgli.org/>

## **Esame colturale (gold-standard)**

**Sempre allestito, anche per l'importanza nel definire la sorgente dell'epidemia e nel caso di infezioni da Legionelle diverse da *L. pneumophila sierogruppo 1***

**Tecniche selettive sono essenziali per l'isolamento del microrganismo (impiego di terreni specifici )**

**I campioni respiratori pesantemente contaminati da microrganismi che colonizzano le alte vie respiratorie devono essere pretrattati**

**Trattamento a caldo e la diluizione del campione sono i metodi più semplici indicati (trattamento a caldo a 50°C per 30 minuti)**

**Campioni respiratori (espettorato, broncoaspirato) vanno processati anche se presente rilevante contaminazione delle secrezioni orali, indipendentemente dall'aspetto purulento**

## Esame colturale

I terreni di coltura primaria oltre a supportare la crescita di *Legionella* spp. devono essere idonei per la coltura con materiali contaminati e mantenere la stabilità

Terreno base BCYE (charcoal yeast extract + tampone ACES+pirofosfato ferrico+L-cisteina idrocloruro+  $\alpha$ -chetoglutarato)

Terreni con supplementi BMPA $\alpha$  - BCYEA

La fertilità dei terreni dovrebbe essere provata impiegando ceppi di *Legionella* non adattati a crescere nei terreni coltura

Incubazione a  $35\pm 1^\circ\text{C}$  per >14 giorni (?) in atmosfera umida ed esaminati ogni 2-3 giorni

# Raccolta del campione

**Prima della terapia (possibilmente)**

**La coltura è consigliata anche se il paziente è in terapia**

**Espettorato va coltivato anche se non ha i criteri di idoneità**

**Lavaggio broncoalveolare (preferibile)**

**Liquido pleurico**

**Tessuti e biopsie aggiungere dell'H<sub>2</sub>O sterile (NO! sol. fisiologica)**

**Trasporto del campione il più rapidamente possibile**

**Se il campione non è processato immediatamente può essere conservato per 48 h a temperatura di +4°C**





## Esame colturale

Materiale	Sensibilità (%)	Specificità (%)	Osservazioni
Espettorato	5-70	100	<ul style="list-style-type: none"><li>•Gold standard</li><li>•Altamente specifico</li><li>•Richiesti almeno 2-4 giorni per la crescita. Raramente &gt;14</li></ul>
BAL o aspirato tracheale	30-90	100	
Biopsia polmone	90-99	100	
Sangue	10-30	100	

Stout JE New E J 1997, 337: 682-687;

Harrison T Clin Infect Dis 1998, 4(7): 359-365;

Fields BS Clin Microbiol Rew 2002, 15(3): 506-526;

Luck PC Journ Lab Med 2002, 26(2/3):174-182

# Esame colturale: problematiche

**Non è una diagnostica di routine**

**50% dei pazienti al momento del ricovero non hanno secrezione, spesso non è possibile raccogliere un campione spontaneo o sufficientemente idoneo**

**Il paziente è in terapia**

**Necessario un campione di origine profonda ottenuto con tecnica di prelievo invasiva (talora non praticabile)**

**Molti laboratori di diagnostica microbiologica non sono attrezzati**

**Il campione raccolto in particolare espettorato talora non è di qualità elevata**

**La decontaminazione non è talora sufficiente ad abbattere in modo significativo i microrganismi colonizzanti le alte vie**

**Difficoltà di disporre di terreni specifici e di qualità**

**Giorni di osservazione (10-14)**

**Scarso expertise**

## **ANTIGENE URINARIO (1)**

**Antigene viene rilevato precocemente nelle urine, all'esordio dei sintomi (1-3 giorni)**

**Il test può risultare positivo per alcune settimane anche quando altre indagini sono negative**

**E' un test altamente specifico (>99%) per la diagnosi di legionellosi da *Legionella pneumophila* sierogruppo 1**

**Sensibilità (75-99%)**

## **ANTIGENE URINARIO (2)**

**Helbig JH et al. J Clin Microbiol 2003, 41: 838-840**

**317 campioni di urine da pazienti con LD confermata**

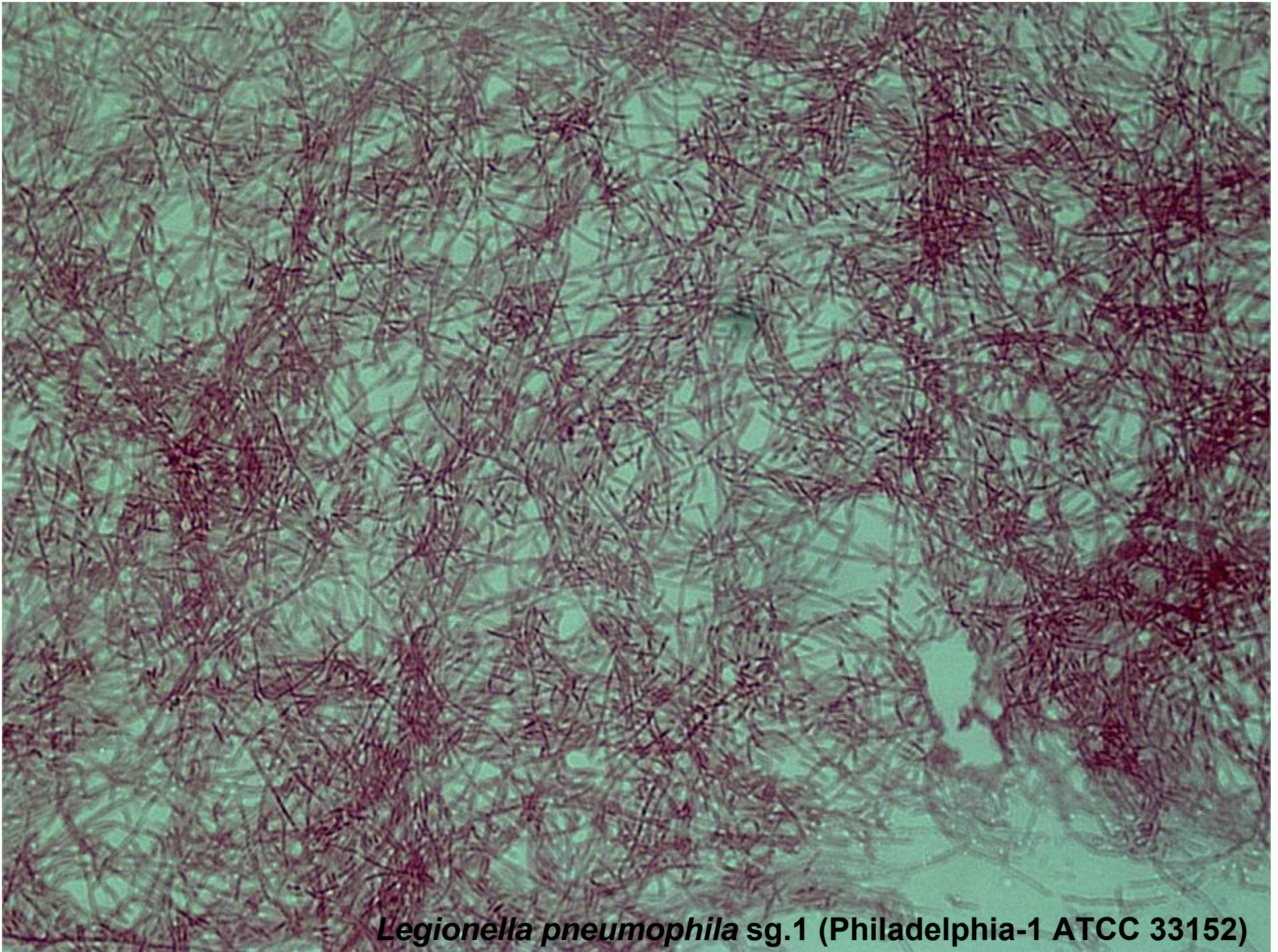
- Binax EIA**
- Biotest EIA**

**Positivi 94% dei campioni da pazienti dopo una villeggiatura**

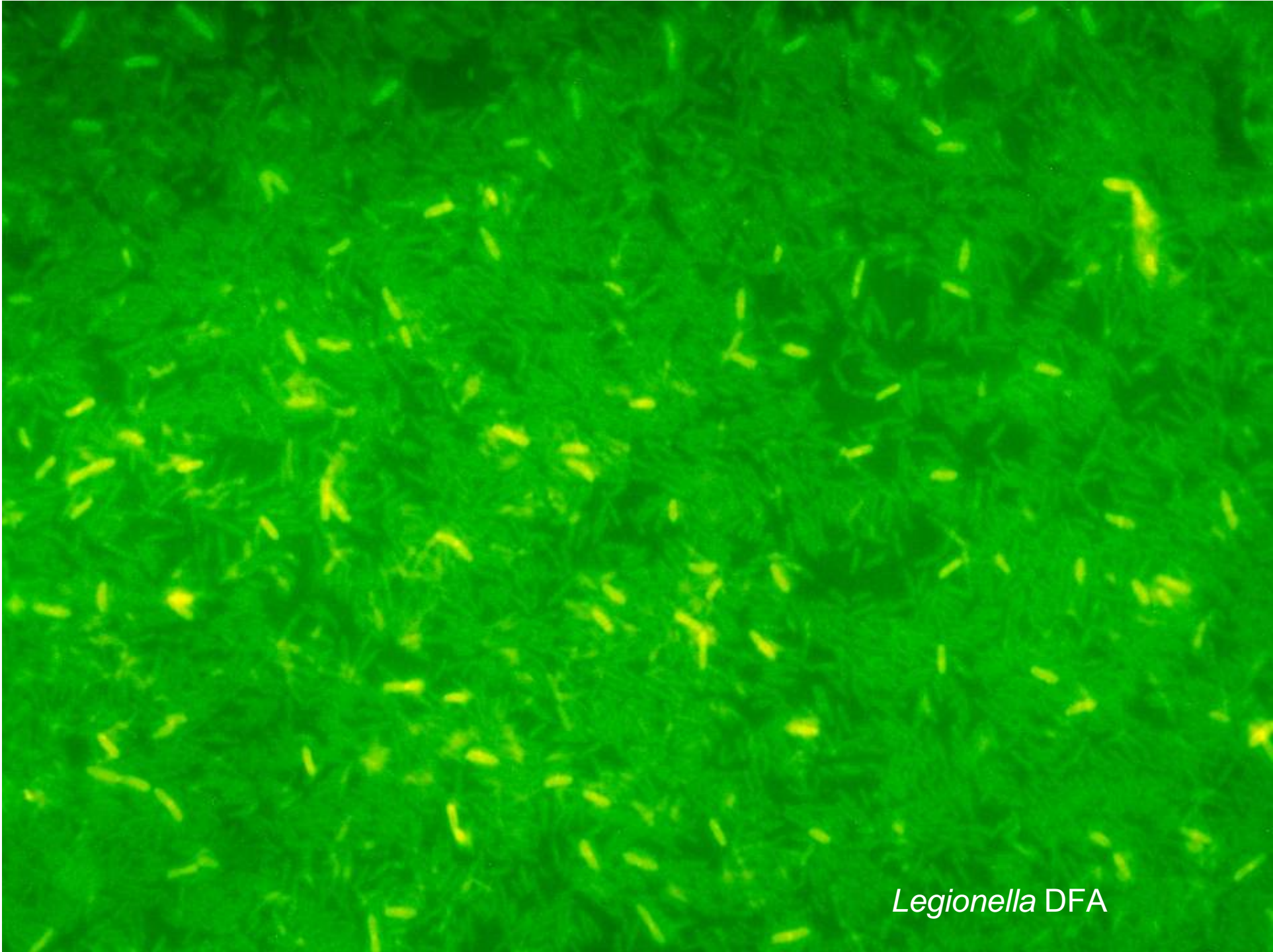
**Positivi 87-76% dei campioni da pazienti con CAP**

**Positivi 44-46% dei campioni da pazienti con HAP**

**Specie diverse di legionelle sono in causa**



***Legionella pneumophila* sg.1 (Philadelphia-1 ATCC 33152)**



*Legionella* DFA

# Limited Applicability of Direct Fluorescent-Antibody Testing for *Bordetella* sp. and *Legionella* sp. Specimens for the Clinical Microbiology Laboratory<sup>▽</sup>

Rosemary C. She,<sup>1\*</sup> Erick Billetdeaux,<sup>2</sup> Amit R. Phansalkar,<sup>2</sup> and Cathy A. Petti<sup>1,2,3</sup>

*Department of Pathology, University of Utah, 30 North 1900 East, Salt Lake City, Utah 84132<sup>1</sup>;  
Associated Regional University Pathologists Institute for Research and Development,  
500 Chipeta Way, Salt Lake City, Utah 84108<sup>2</sup>; and Department of Medicine,  
University of Utah, Salt Lake City, Utah<sup>3</sup>*

Received 12 March 2007/Accepted 11 May 2007

TABLE 1. Comparison of results from DFA testing, culture, and PCR testing for *Bordetella* sp. and *Legionella* sp. specimens (2002 to 2005)

Species	Test method	No. of positive samples (%)	Total no. tested	Sensitivity <sup>a</sup>	Specificity <sup>a</sup>	PPV <sup>a</sup>	NPV <sup>a</sup>
<i>Bordetella</i> sp.	DFA	184 (3.0)	6,195	73 (18)	98 (99)	26 (88)	99.7 (81)
	Culture	150 (2.4)	6,251				
	PCR	2,557 (9.5)	26,929				
<i>Legionella</i> sp.	DFA	31 (0.2)	12,597	11	100	67	99.5
	Culture	85 (0.6)	13,574				
	PCR	27 (3.8)	716				

<sup>a</sup> Values are percentages. Numbers in parentheses are those calculated using PCR as the gold standard; others were calculated using culture as the gold standard.



# *La diagnosi indiretta*

# Diagnosi immunosierologica

- IFA

- ELISA (metodo consigliato)

(automazione/standardizzazione/ interpretazione non soggettiva)

- MICROAGGLUTINAZIONE

24-40% paziente con LD ha sieroconversione nella 1° settimana di malattia

Utilità della ricerca delle IgM

La sieroconversione può richiedere diverse settimane (da 3-4 a >10 valutata con metodo IF)

Titoli  $\geq 256$  in IF anche in presenza di polmonite non consente da solo di effettuare diagnosi di Legionellosi

Segnalate reazioni crociate con anticorpi diretti verso *P.aeruginosa*, *Campylobacter* spp., ecc...

Un aumento di  $\geq 4$  volte il titolo ha valore retrospettivo e raramente condiziona la scelta terapeutica

## Value of Serological Testing for Diagnosis of Legionellosis in Outbreak Patients

Almudena Rojas,<sup>1</sup> M. Dolores Navarro,<sup>2</sup> Francisca E. Fornés,<sup>2</sup> Estefanía Serra,<sup>2</sup>  
Encarnación Simarro,<sup>2</sup> José Rojas,<sup>1\*</sup> and Joaquín Ruiz<sup>2</sup>

*Vircell S. L., Pza. Domínguez Ortiz 1, 18320 Santa Fé, Granada, Spain,<sup>1</sup> and Laboratorio de Microbiología, Hospital Virgen de la Arrixaca, 30120 El Palmar, Murcia, Spain<sup>2</sup>*

Received 4 November 2004/Returned for modification 20 December 2004/Accepted 20 May 2005

TABLE 3. Results for legionellosis diagnosis in first samples from 95 patients

Result	No. of patients						
	Antigenuria detection	ELISA for IgM	ELISA for IgG plus IgM	IFA for IgM	IFA for IgG	IFA for IgA	IFA for polyimmunoglobulin
Positive	49	22	6	3	1	1	0
Negative	42	52	69	73	75	74	76
Uncertain		1				1	
Not done	4	20	20	19	19	19	19
Positive proportion (%)	53.8	29.7	7.9	3.9	1.3	1.3	0

## Sensitivity of three serum antibody tests in a large outbreak of Legionnaires' disease in the Netherlands

Ed P. F. Yzerman,<sup>1,2</sup> Jeroen W. den Boer,<sup>3</sup> Kamilla D. Lettinga,<sup>2</sup>  
Arnoud J. Schel,<sup>2</sup> Joop Schellekens<sup>4</sup> and Marcel Peeters<sup>5</sup>

**Table 2.** Timing of convalescent serum sample(s) and presence of antibodies to *L. pneumophila*, as demonstrated by any of three assays, for 45 LD patients for whom two or more properly timed sera were available

Time	No. of patients with available sera	Standing titre*	Fourfold rise in titre or seroconversion
2–6 weeks	37	6/37	22/37
6–12 weeks	12	0/12	4/12
More than 12 weeks	20	1/20	4/20

\*Acute-phase serum was positive.

## DIAGNOSI MOLECOLARE

**Limitata a pochi centri diagnostici**  
**Metodi commerciali e “in house”**  
**Riferiti casi di false positività**

**Diederer BMW Journal of Infection 2008, 56(1): 1-12**

**46 laboratori partecipanti ad due QC nel 2004 e  
nel 2005**

**93% impiegava metodi “in house”**

**Falsi positivi**

**4% nel 2004**

**8,2% nel 2006**

# CONCLUSIONI

## Eeguire

- sempre l'esame colturale
- Ricerca antigene urinario
- Indagini immunosierologiche su due campioni prelevati a distanza di 2-3 settimane (ricerca IgM)
- Nei pazienti ospedalizzati e immunocompromessi con polmonite di origine nosocomiale eseguire sempre l'esame colturale per *Legionella* spp.