

La legionellosi: gli attori della gestione del rischio “Il percorso diagnostico di Laboratorio”

I. Bianco^a, A. Conti^b

^aPatologia Clinica, Ospedale di Lanciano (CH)

^bPatologia Clinica, Ospedale di Schio (VI)

Riassunto

Legionella *pneumophila* è da considerare uno dei più importanti patogeni delle vie respiratorie profonde, in causa sia in polmoniti nosocomiali che comunitarie che, largamente misdiagnosticate, spesso presentano un quadro clinico di gravità ingravescente con esiti anche infausti per il paziente.

L'iter diagnostico microbiologico si avvale di numerosi test molti dei quali non sono in grado da soli o negli stadi precoci d'infezione di confermarne l'etiologia. La coltura da campioni respiratori rappresenta il *gold standard* per la diagnosi di conferma e la procedura diagnostica più specifica da effettuare. La ricerca in EIA degli antigeni urinari, indagine alla portata di molti laboratori, offre buone performance analitiche, in termini di sensibilità e specificità; per la ricerca dei microrganismi direttamente nei materiali dell'apparato respiratorio è possibile il ricorso alla microscopia in immunofluorescenza sia diretta (DFA) che indiretta (IFAT). La ricerca di anticorpi specifici è utilizzata invece per la diagnosi indiretta di infezione e per la definizione epidemiologica. Le tecniche molecolari, infine, permettono di ottenere, in tempi brevi importanti informazioni diagnostiche, da utilizzare sempre in combinazione con gli altri test validati. La diagnostica di questa patologia ripropone l'importanza e la necessità della figura del *Consultant Medical Microbiologist* che possiede competenza e capacità per indirizzare l'intero processo diagnostico.

Summary

Laboratory diagnosis of Legionnaires' disease

Nowadays Legionella *pneumophila* can be ascribed among the most serious pathogens involved in deep airway infections, namely both community and hospital acquired pneumonias that, often misdiagnosed, can evolve into a serious and even deadly threat for the patient. Legionnaires' disease can be diagnosed by specific laboratory tests. Since none of them – as a single test – is able to detect the disease, especially in its early stage, several tests should be applied in combination for maximum sensitivity. The most sensitive and effective test for Legionella pneumophila detection is the culture of respiratory tract secretions. A urine antigen test using EIA is a practical, reliable and convenient approach. It is also useful to adopt fluorescent assays to look for the germ directly on clinical specimens. Serological testing is more useful to epidemiologists than it is to clinicians, because of cross-reactions with antibodies to unrelated organisms. Molecular amplification tests, such as polymerase chain reaction (PCR), are used in some research and public health laboratories and produce fast and reliable results, although there are also reports of unreliable or insensitive PCR tests. This case is a reminder of the importance of the Consultant Medical Microbiologist, whose skills and competences lead the entire diagnostic process.

Key-words: Legionellosis, community and hospital-acquired pneumonia, microbiological investigation, laboratory's method evaluation.

Introduzione

Le Legionelle, microrganismi intracellulari facoltativi ubiquitari, riconoscono nei laghi e nei fiumi il loro serbatoio naturale dai quali possono facilmente passare a coloniz-

zare riserve artificiali di acqua come impianti idrici, piscine e impianti di raffreddamento che soddisfano le condizioni per la crescita e la trasmissione della legionella: temperatura, stasi -con la presenza di biofilm- e aerosolizzazione.

La legionella si moltiplica all'interno di cellule ospiti, rappresentate essenzialmente dai macrofagi nelle infezioni polmonari e allo stato libero nelle riserve di acqua da molti generi di ameba che, con la condizione favorente di matrici organiche adese alle pareti degli impianti idrici, i biofilm, costituiscono un importante serbatoio all'interno del quale questo microrganismo può sopravvivere per lunghi periodi. La crescita della legionella è temperatura dipendente con un range che va dai 25 ai 45 °C e un optimum intorno ai 35 °C.

La famiglia delle Legionellacee è costituita da più di 50 specie, a loro volta suddivise in 70 sierogruppi in continua crescita, di cui 20 sono stati documentati come patogeni per l'uomo.

Legionella pneumophila, con 16 sierogruppi di cui 1, 4 e 6 responsabili di più dell'80% delle infezioni umane, è la specie più comunemente isolata nelle patologie polmonari, seguita da *L. micdadei*, *L. Bozemanii*, *L. dumoffii* e *L. longbeachae* alle quali è riconosciuto un ruolo come patogeni in particolare nelle infezioni nosocomiali.

La trasmissione dell'infezione riconosce due meccanismi fondamentali: per inalazione di aerosol contaminato e per aspirazione di acqua in cui sono contenute legionelle o amebe all'interno delle quali il microrganismo vive in stato simbiotico; non è stata a tutt'oggi documentata la trasmissione da persona a persona.

Legionella pneumophila è da considerare uno dei più importanti patogeni delle vie respiratorie profonde, in causa sia in polmoniti nosocomiali che comunitarie, da prendere sempre in considerazione nella diagnosi eziologica differenziale in ogni paziente che si ricoveri con un quadro di polmonite o che lo sviluppi in ambiente nosocomiale. La ricerca di Legionella andrebbe sempre eseguita nei quadri di polmonite severa, poiché i sintomi sono indistinguibili da quelli causate da altri agenti infettivi e in particolare nelle infezioni polmonari di pazienti con fattori di rischio quali età (>40), patologie croniche intercorrenti, fumo, terapie in corso o immunodepressione, con storie di viaggi recenti, che non rispondano a una terapia con beta-lattamici, che possano essere stati esposti a Legionella in caso di un episodio epidemico o che, ospedalizzati da più di 10 giorni, presentino segni e sintomi di polmonite^{1,3}.

Queste infezioni polmonari, largamente misdiagnosticate, spesso presentano un quadro clinico di severità ingravescente: l'European Working Group for Legionella Infections, (EWGLI) riporta l'8.6%, di decessi, espressi come Case Fatality Rate (CFR) e un 7.2 % di infezioni a partenza nosocomiale⁴.

Attualmente, l'EWGLI definisce come **“caso confermato”** di Legionellosi l'infezione acuta delle vie respiratorie profonde con segni clinici e/o radiologici di polmonite e una o più delle seguenti evidenze:

- Isolamento colturale di Legionella *spp.* da campioni clinici.
- Presenza di antigene urinario di Legionella *spp* utilizzando reagenti / kit validati.
- Sieroconversione (aumento di almeno 4 volte il titolo) usando la tecnica validata dell'immunofluorescenza indiretta con *L. pneumophila* sierogruppo 1.

e come **“caso presunto”** l'infezione acuta delle vie respiratorie profonde con segni clinici e/o radiologici di pol-

monite e una o più delle seguenti evidenze:

- Un aumento di 4 volte o più del titolo di anticorpi sierici anti- *L. pneumophila* sier.1 o altro sierogruppo o altra specie di Legionella.
- Singolo elevato titolo (almeno 1:256) di anticorpi sierici anti- *L. pneumophila* sier.1 o altro siero gruppo o altra specie di Legionella.
- Presenza di Antigeni di Legionella *spp* rilevati con DFA (utilizzando anticorpi monoclonali) nei campioni clinici.
- Rilevazione del DNA di Legionella *spp* in un campione clinico con la tecnica della PCR.

Il panorama diagnostico

Il grande potenziale diagnostico del laboratorio di Microbiologia è un crocevia ineludibile nel chiarire il sospetto clinico di legionellosi data la capacità di indagine su campioni sia clinici che ambientali. L'iter microbiologico per la diagnosi di esclusione o di conferma di legionellosi, si avvale di numerosi test molti dei quali non sono in grado da soli o negli stadi precoci di infezione di confermarne l'eziologia. Si rende, pertanto, necessario associare indagini tra loro complementari per una rapida e corretta definizione dell'agente responsabile^{1,2,5,6}.

L'esame colturale

Le Legionelle sono batteri esigenti ma la coltura da campioni respiratori, anche a terapia antibiotica già in corso, rappresenta il *gold standard* per la diagnosi di conferma e la procedura più specifica da effettuare in previsione anche dell'isolamento di specie diverse da *L. pneumophila*, pur con il difetto di richiedere tempi lunghi per la diagnosi di esclusione o conferma. L'isolamento da coltura è inoltre indispensabile per poter correlare il ceppo isolato dal campione clinico a quelli ambientali eventualmente identificati nelle ricerche della fonte, vista l'ubiquitarità della legionella.

Il campione respiratorio d'elezione deve essere ottenuto preferibilmente tramite prelievo protetto ed è rappresentato dal lavaggio broncoalveolare ma devono essere processate tutte le secrezioni bronchiali ottenute da prelievo non protetto (espettorato, espettorato indotto e aspirato tracheo-bronchiale) anche se non soddisfano i criteri di idoneità e per le quali è possibile prima della coltura ricorrere alla decontaminazione termica a 50 °C per 30 minuti. I campioni respiratori per l'esame colturale devono essere di prassi processati al più presto; è possibile, tuttavia, la conservazione del campione refrigerato fino a 48 ore. Legionella pneumophila non cresce sui normali terreni di coltura: richiede terreni selettivi con cisteina, carbone ed antibiotici per inibire la crescita di altri microrganismi; il terreno utilizzato è comunemente il *Buffered Charcoal Yeast Extract* (BCYE) reso selettivo dalla L-cisteina e, per contrastare ulteriormente la flora batterica o micotica ed aumentarne la capacità discriminante, anche dall'aggiunta di α BMPA (cefamandolo, polimixina B e anisomicina). Il terreno va tenuto in coltura fino a 14 giorni in ambiente umido a 36+/- 1 °C ed esaminato regolarmente ogni 2/3 giorni giacché la presenza anche di una sola colonia è sufficiente per la conferma del sospetto diagnostico.

L'identificazione presuntiva di Legionella si basa su una serie di criteri che comprendono la morfologia delle colonie, sub-colture su terreni selettivi e non selettivi, osserva-

zione microscopica previa colorazione di Gram dal terreno selettivo, che mostra cocco-bacilli Gram-negativi pleomorfi, di aspetto filamentoso nelle colture di vecchia data. Il ceppo deve essere successivamente sottoposto a test complementari: agglutinazione con antisieri o tecniche immunofluorescenti dirette ed indirette per l'identificazione di specie^{1,7-10}.

DFA e IFAT

Per la ricerca dei microrganismi direttamente nei materiali delle basse vie respiratorie, meglio se prelevati con tecniche protette, può essere utile il ricorso alla microscopia in immunofluorescenza sia con la tecnica diretta, *Direct Fluorescent Antibody* (metodo rapido che prevede l'utilizzo di anticorpi monoclonali anti-*Legionella pneumophila* marcati con composto fluorescente da cimentare con il materiale strisciato su vetrino), che con quella indiretta, *Indirect Fluorescent Antibody Test* che si differenzia per una fase di preincubazione dello striscio con anti-siero specifico e successivo contatto con immunoglobulina coniugata con fluoresceina-tiocianato¹⁰.

L'antigene urinario

Una metodica alla portata di molti laboratori, e largamente utilizzata in relazione a rapidità, semplicità e buone performance analitiche in termini di sensibilità e specificità, è rappresentata dalla ricerca con tecnica immunoenzimatica o immunocromatografica degli antigeni urinari soprattutto per *L.pneumophila* sierogruppo 1 ma anche per gli altri sierogruppi meno frequentemente coinvolti in episodi clinici. Compare nelle urine pochi giorni dopo l'inizio dei sintomi, rimane presente a lungo -anche settimane- e non è influenzato dalla terapia antibiotica, la concentrazione dei campioni di urine aumenta la sensibilità di entrambi i metodi senza diminuirne la specificità^{1,11}.

Le ricerche anticorpali

Per la diagnosi indiretta di infezione e per la definizione epidemiologica è possibile far ricorso a un gran numero di test in grado di rilevare anticorpi specifici sfruttando metodiche di immunofluorescenza indiretta (IFA) immunoenzimatica (EIA), fissazione del complemento (CFT), per la valutazione di un singolo titolo elevato in paziente con clinica significativa o dell'andamento della cinetica anticorpale su almeno due campioni effettuati a distanza di tempo^{1,11}.

La diagnostica molecolare

L'utilizzo di tecniche molecolari, con test di amplificazione degli acidi nucleici (NAAT) quali Polimerase Chain Reaction, (PCR) e Real-time PCR, per l'individuazione del DNA batterico sui campioni clinici, permette di ottenere, riducendo i tempi di esecuzione a poche ore, importanti indicazioni ai fini terapeutici e di identificazione di cluster che devono essere, però, sempre utilizzate in combinazione con test validati^{1,11}.

Metodiche a confronto

Metodi fenotipici¹²⁻¹⁵

La ricerca di Antigeni urinari, la titolazione di anticorpi

sierici specifici e l'esame colturale rappresentano indagini correntemente utilizzate nei laboratori clinici per la diagnosi di infezione da Legionella.

Gli Antigeni solubili di Legionella sono evidenziabili nella fase acuta della malattia (1-3 giorni dall'esordio dei sintomi) e la loro ricerca rappresenta il più utile test rapido per la diagnosi di infezione, utilizzabile anche in situazioni di diagnostica decentrata (Point of Care testing); lo stesso test può essere utilizzato su materiali alternativi alle urine come il lavaggio bronco-alveolare (BAL), il liquido pleurico, l'escreato ed il siero, sebbene l'affidabilità su tali campioni sia controversa. La maggiore limitazione di questi test è rappresentata dal fatto che la quasi totalità di essi è in grado di rilevare solo *L.pneumophila* sierogruppo 1, perdendo la capacità di discriminare infezioni causate da altri sierogruppi o altre specie di Legionella, sebbene siano documentate cross-reattività anche con altri microrganismi (*Pseudomonas spp*). I test rapidi sulle urine sono raccomandati per pazienti con polmonite ricoverati in reparti di Terapia intensiva, in presenza di sospetta epidemia o in caso di fallimento nella risposta alla terapia con Beta-lattamici, anche se la loro efficacia diagnostica sembra non essere ottimale nei casi di polmoniti nosocomiali, che rappresentano circa il 20% dei casi segnalati, dove probabilmente i microrganismi patogeni possono essere rappresentati anche da specie di Legionella diverse da *L.pneumophila*. L'industria biomedica ha proposto di volta in volta diversi format di kit EIA, che possono essere utilizzati con successo quando sia necessario processare numerosi campioni, con risultati disponibili in 2-3 ore, e monotest rapidi in immunocromatografia (ICT) con la possibilità di ottenere risultati in 15-20 minuti. La rapidità di questo tipo di test è particolarmente utile in quanto la coltura di Legionella *spp* è lenta e può richiedere dai 3 ai 14 giorni; il riscontro di antigeni urinari di Legionella spesso è il primo test di laboratorio positivo in caso di infezione. La sensibilità varia dal 55.5% al 66.6% in urine non concentrate e tra l'86.6% e il 91.6% in campioni sottoposti a concentrazione; analizzare un secondo campione dopo 3 giorni sembra aumentare la sensibilità di un altro 10%.

In pazienti infetti, il test può risultare negativo durante i primi 5 giorni di malattia o, altresì, rimanere positivo per 6-15 giorni. Nei casi di infezioni da Legionella, l'esito del test sulle urine permette una gestione precoce e migliore della terapia antibiotica, riducendo sia la mortalità che la necessità di cure intensive.

L'utilità della fluorescenza diretta (DFA) per la ricerca di Legionelle nell'escreato come metodo diagnostico rapido (TAT 2-4 h) è discutibile quando si disponga di test più sensibili come gli antigeni urinari o la PCR. Anche nei confronti dell'esame colturale, che rimane il *gold standard* quando sia necessario l'isolamento del patogeno, la DFA mostra una bassa sensibilità per *L.pneumophila* sier.1 (variabile in letteratura dal 10% all'80%) e ancora più scarsa per le altre Legionelle, mentre la specificità è stimata, in mani esperte, intorno al 90%.

Sono descritti, tuttavia, falsi positivi legati a cross-reattività con altri batteri quali *Pseudomonas spp*, *Stenotrophomonas spp*, *Flavobacterium spp* e *Bacteroides fragilis*, tanto che la sola positività del test DFA in assenza di altre evidenze è generalmente non accettata come sufficiente per la

diagnosi di infezione. L'efficacia di questa metodica è ulteriormente condizionata dalla frequente incapacità (>50%) dei pazienti ammalati di ottenere un campione di escreato di qualità diagnostica, mentre sembra migliorare, in termini di sensibilità, se il campione processato è rappresentato da campioni delle vie respiratorie profonde ottenuti con prelievo protetto o tessuto bioptico. In ultimo, il metodo presenta criticità procedurali legate sia alla soggettività dell'interpretazione del risultato che alla necessità di disporre di microscopio a fluorescenza e di personale esperto nell'allestimento del preparato.

L'esame colturale richiede terreni speciali, adeguato processo del campione, personale tecnico esperto e, soprattutto, tempo (3-14 giorni). Le Legionelle possono essere isolate a partire da un'ampia gamma di materiali, sebbene le secrezioni delle vie respiratorie profonde rappresentino i campioni migliori, tenendo presente che l'accurata identificazione di Legionelle diverse dalla specie *pneumophila* è difficoltosa, in ragione della loro inerzia biochimica, della cross-reattività sierologica fra sierogruppi/specie e della identità fenotipica tra specie.

Come detto, la maggiore limitazione dell'esame colturale è che molti pazienti non sono in grado di espettorare, ma è anche necessario processare il campione rapidamente a causa della lability della Legionella; in condizioni di saggio ottimali l'esame colturale delle secrezioni respiratorie mostra una sensibilità intorno al 50% (gli essudati bronchiali profondi sono da preferirsi) mentre l'emocoltura presenta performance analitiche inaccettabili (sensibilità <10%).

Visti i tempi necessari per l'isolamento e le problematiche procedurali legate alla fase preanalitica, la coltura influenza in maniera relativa l'inquadramento e la gestione clinica del paziente affetto da legionellosi; tuttavia, specialmente nel sospetto di infezione nosocomiale, è buona norma procedere all'esame, sia per l'importanza di definire la sorgente dell'epidemia che nel caso di infezioni da Legionelle diverse da *L. pneumophila* sierogruppo 1. In questi casi, come già detto, è consigliabile eseguire l'esame anche se il campione delle vie respiratorie è di scarsa qualità e/o se il paziente è già sottoposto a terapia antibiotica.

I test sierologici per la diagnosi di infezione da Legionella rappresentano un prezioso strumento epidemiologico ma impattano in maniera molto relativa sulle decisioni cliniche in ragione del tempo necessario per la disponibilità di risultati probanti (sieroconversione). Gli anticorpi prodotti in risposta all'infezione sono una miscela di IgA, IgG e IgM e, per un'ottimale sensibilità, i test sierologici dovrebbero evidenziare la presenza di tutte le classi anticorpali. Le IgM specifiche rappresentano un marker inattendibile di infezione acuta, poiché possono persistere per lungo tempo, tuttavia la loro positività, associata a quella degli antigeni urinari, sicuramente rafforza il sospetto di infezione in atto; in caso di dosaggio delle IgM, i test EIA si fanno preferire per la maggiore sensibilità, standardizzazione e per la possibilità di automazione rispetto ai test IFA. D'altro canto, la sieroconversione può richiedere alcune settimane e ciò rappresenta la maggiore limitazione dei test sierologici di screening. In molti casi l'aumento di almeno 4 volte del titolo anticorpale globale si evidenzia in 3-4 settimane, ma in alcuni casi possono esserne necessarie

più di 10. Campioni di siero prelevati troppo precocemente rispetto alla fase di convalescenza possono dare origine a molti risultati falsi negativi ma è dimostrato che almeno una parte di pazienti con diagnosi di infezione da Legionella non sieroconvertono. In pratica i clinici dovrebbero essere incoraggiati a prelevare un campione di siero in pazienti convalescenti almeno dopo 3 settimane dall'insorgenza dei sintomi al fine di analizzarlo in parallelo con uno ottenuto durante la fase acuta; se dopo questa procedura non si evidenzia ancora sieroconversione ma rimane il sospetto di legionellosi è necessario ottenere un ulteriore campione di una fase più tardiva di convalescenza.

Fra i vari metodi per la ricerca di anticorpi anti-Legionella (IFA-EIA-CFT), l'IFA rappresenta ancora lo standard di riferimento. In passato, un titolo anticorpale maggiore di 1:256 durante la fase acuta della malattia in presenza di polmonite veniva considerato sufficiente per una diagnosi presuntiva; oggi si impone grande prudenza nella valutazione del dato, a causa della alta prevalenza di anticorpi specifici per Legionella in pazienti senza evidenze cliniche di malattia; in definitiva non c'è alcun ruolo diagnostico per un singolo dosaggio sierico. Un altro svantaggio dei test sierologici è la loro incapacità nell'evidenziare accuratamente anticorpi contro tutte le specie e sierogruppi di Legionelle. Sebbene, come già detto, la sieroconversione nei confronti di *L. pneumophila* sier.1 sia altamente predittiva di malattia, la sensibilità e specificità della sieroconversione verso altre specie o siero gruppi non è mai stata rigorosamente confermata, mentre sono state descritte cross-reattività sia all'interno della famiglia delle Legionellacee che verso altre specie batteriche (*Campylobacter* spp, *Pseudomonas* spp, *Micobatteri* ecc.).

Metodi genotipici¹⁶⁻¹⁸

Le metodiche NAAT (Nucleic acid amplification test) rappresentano sicuramente la nuova frontiera della diagnostica infettivologica; applicate sui campioni biologici di pazienti con sospetto clinico di Legionellosi, queste tecniche analitiche hanno mostrato risultati molto incoraggianti in termini di sensibilità e specificità; la sensibilità aumenta quando i campioni sono ottenuti nella fase acuta della malattia e se vengono saggiati materiali diversi (escreato, BAL, secrezioni orofaringee, siero, leucociti). Molti test basati sulla PCR, gene probe ibridazione o Micro-Array utilizzano specifiche regioni target all'interno dei geni 16S rRNA, la regione spacer 23S-5S, 5S rRNA, o il gene mip (macrophage infectivity potentiator). Identificare precocemente i pazienti con polmonite da Legionella è essenziale, poiché un singolo caso può essere l'evento sentinella che conduce alla identificazione di altri casi e alla sorgente della contaminazione; in questo ambito le metodiche molecolari trovano un utile impiego.

Sui campioni delle vie respiratorie profonde (BAL), le NAATs hanno ripetutamente mostrato sensibilità maggiore nei confronti dell'esame colturale possono, inoltre, essere considerate i test ideali nei pazienti che sono già in trattamento antibiotico. Tuttavia, stante la bassa prevalenza della malattia, test con così elevata sensibilità (94-100% a seconda del metodo) comportano un alto numero di falsi positivi; questi rappresentano una criticità che può trovare soluzione nella contemporanea ricerca degli Ag urinari o de-

gli anticorpi IgM anti-Legionella.

Nell'impossibilità di eseguire queste ulteriori determinazioni, è mandatoria l'esecuzione di procedure di conferma tramite metodiche molecolari con target o primer diversi rispetto a quelli utilizzati nel primo test. Tale approccio, non è alla portata di tutti i laboratori clinici, con pesanti ricadute sui costi della diagnostica, sulla complessità tecnologica, sull'organizzazione del flusso di lavoro del laboratorio, sui tempi di risposta.

Considerazioni conclusive

Poichè la Malattia del Legionario non può essere clinicamente o radiologicamente distinta dalle altre cause di polmonite, la decisione di richiedere test diagnostici specifici per Legionella può non essere tempestiva. E' certamente possibile selezionare pazienti a rischio su cui chiedere tali test (anziani, fumatori, individui immunodepressi, lungodegenti, pazienti con malattie polmonari croniche, degenti in Terapia Intensiva, lavoratori professionalmente esposti) ed è necessario conoscere l'epidemiologia locale. Nelle regioni geografiche dove *L.pneumophila* sier.1 è la causa predominante di malattia la ricerca degli antigeni urinari rappresenta il test di prima scelta.

Se è disponibile la diagnostica molecolare, le NAATs combinate con gli antigeni urinari rappresentano verosimilmente la migliore strategia diagnostica iniziale, ottenendo risultati in un *frame time* che consente la migliore gestione clinica del paziente.

Se non sono disponibili metodiche molecolari, gli antigeni urinari combinati con l'esame colturale delle secrezioni delle vie aeree profonde rappresentano una buona alternativa.

Sebbene i test sierologici non abbiano alcun impatto nella gestione iniziale del paziente, possono risultare utili dal punto di vista epidemiologico se la diagnosi eziologica non è fatta durante la fase acuta di malattia, o quando è necessario un atteggiamento diagnostico aggressivo su un numero elevato di soggetti nel sospetto di epidemie (comunque in associazione con altri test).

In conclusione, le infezioni da Legionella sono indubbiamente sotto diagnosticate; sono necessari test specialistici, spesso in combinazione. Gli antigeni urinari, le NAATs e la coltura delle secrezioni delle vie aeree profonde rappresentano indagini clinicamente utili, con problematiche analitiche e performance diverse. *La strategia diagnostica deve tener conto della epidemiologia locale, del contesto clinico (CAP, HAP, urgenza ecc.), della tipologia del campione biologico da testare e dalla facilità di ottenerlo, dei tempi di risposta della tecnologia disponibile, e, infine, dell'esperienza e specializzazione degli operatori di Laboratorio.* Lo sviluppo di test per gli antigeni urinari che identifichino, all'interno del siero gruppo e della specie, un range più ampio di Legionelle patogene e metodiche molecolari più standardizzate e a basso costo sono gli obiettivi per il miglioramento del processo diagnostico.

La diagnostica di questa patologia ripropone la tematica dell'importanza e della necessità della figura del *Consultant Medical Microbiologist*, una realtà in molti paesi; questo professionista possiede competenza e capacità per indirizzare l'intero processo diagnostico, coniugando, a partire dall'appropriatezza della richiesta, esigenze diagnostiche, tecniche analitiche innovative, interpretazione e correlazione

dei risultati al quadro clinico, influenzando positivamente la decisione clinica e la scelta terapeutica.

Bibliografia

1. CDC Legionellosis Resource Site (Legionnaires' Disease and Pontiac Fever). <http://www.cdc.gov/legionella/index.htm> (data di consultazione: 28.8.2009).
2. Legionella and prevention of legionellosis World Health Organization 2007. http://www.who.int/water_sanitation_health/legionella/en/index.html (data di consultazione: 28.8.2009).
3. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis* 2007; 44 (Suppl 2):S27-72.
4. European Guidelines for Control and Prevention of Travel Associated Legionnaires' Disease. Produced by members of the European Surveillance Scheme for Travel Associated Legionnaires' Disease and the European Working Group for Legionella Infections EWGLINET. <http://www.ewgli.org> (data di consultazione: 28.8.2009).
5. Levin AS. Nosocomial Legionellosis: prevention and management. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; 7:57-68.
6. Den Boer JW, Yzerman EP. Diagnosis of Legionella infection in Legionnaires' disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004 Dec; 23:871-8.
7. BSOP 47 Investigation of specimens for Legionella Species Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory Specialist and Reference Microbiology Division Health Protection Agency. <http://www.hpa-standardmethods.org.uk> (data di consultazione: 28.8.2009).
8. Reimer LG, Carroll KC. Role of the microbiology laboratory in the diagnosis of lower respiratory tract infections. *Clin Infect Dis* 1998; 26:742-8.
9. MSOP 29 Legionella selective agar Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory Specialist and Reference Microbiology Division Health Protection Agency. <http://www.hpa-standardmethods.org.uk> (data di consultazione: 28.8.2009).
10. BSOP ID 18 Presumptive Identification Of Legionella Species Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory Specialist and Reference Microbiology Division. <http://www.hpa-standardmethods.org.uk> (data di consultazione: 28.8.2009).
11. QSOP 30 Laboratory diagnosis of Legionella Infections in the Hpa issued by Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory. <http://www.hpa-standardmethods.org.uk> (data di consultazione: 28.8.2009).
12. Murdoch DR. Diagnosis of Legionella Infection. *Clin Infect Dis* 2003; 36:64-9.
13. Helbig JH, Uldum SA, Bernander S, Lück PC, Wewalka G, Abraham B, et al. Clinical utility of urinary antigen detection for diagnosis of community-acquired, travel-associated, and nosocomial legionnaires's disease. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 838-40.
14. Lindsay DS, Abraham WH, Findlay W, Christie P, Johnston F, Edwards GF. Laboratory diagnosis of legionnaires' disease due to Legionella pneumophila serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods. *J Med Microbiol* 2004; 53:183-7.
15. Roias A, Navarro MD, Fornès FE, Serra E, Simarro E, Rojas J, et al. Value of serological testing for diagnosis of legionellosis in outbreak patients. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4022-5.
16. Diederer BM, Kluytmans JA, Vandenbroucke-Grauls CM,

- Peeters MF. Utility of real-time PCR for diagnosis of Legionnaires' disease in routine clinical practice. *J Clin Microbiol* 2008; 46:671-7.
17. Bencini MA, van den Brule AJ, Claas EC, Hermans MH, Melchers WJ, Noordhoek GT, et al. Multicenter comparison of molecular methods for detection of *Legionella* spp. in sputum samples. *J Clin Microbiol* 2007; 45:3390-2.
18. Su HP, Tung SK, Tseng LR, Tsai WC, Chung TC, Chang TC. Identification of legionella species by use of an oligonucleotide array. *J Clin Microbiol* 2009; 47:1386-92.