Il caso dell'infettivologia

M. Ruscio [a,b], P. Martelli [c]

[a]*Laboratorio Analisi e Microbiologia, Centro di Riferimento per la Malattia di Lyme, ASS 4 Medio Friuli, San Daniele del Friuli (UD)*
[b]*Gruppo di Studio Malattie Infettive SIMeL*
[c]*Immunologia Clinica e Virologia, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, A.O. "Santa Maria degli Angeli", Pordenone*

Riassunto

La Borreliosi di Lyme è una patologia infettiva trasmessa dalle zecche che in Europa determina mediamente 60.000 nuovi casi l'anno. Interessa principalmente la cute, le articolazioni, il sistema nervoso e il cuore. Ha uno sviluppo a stadi successivi e nel 60-80% dei casi esordisce con una lesione cutanea a carattere espansivo (eritema migrante), che rappresenta il marker clinico dell'infezione. L'agente etiologico è una spirocheta appartenente al genere Borrelia, specie Borrelia burdorferi. La diagnosi di laboratorio si basa sugli accertamenti sierologici, ma i test disponibili attualmente non hanno un valore predittivo assoluto e richiedono di essere correlati all'osservazione clinica e al dato anamnestico ed epidemiologico. A questo fine il migliore *outcome* per il paziente si raggiunge attraverso la sinergia tra gli specialisti di laboratorio ed i clinici, mediante la condivisione di indirizzi e linee guida per il governo clinico/diagnostico della malattia.

Summary

The infective case

Lyme Borreliosis is an infection disease transmitted by ticks, which in Europe is the cause of approximately 60.000 new cases yearly.

It mainly involves skin, joints, nervous system and heart. It develops in consecutive stages and for the 60-80% of the cases it starts with a spreading damage to the skin (*eritema migrans*), which represents the clinical marker of the disease. The etiologic agent is a spirochete belonging to the Borrelia genre, Borrelia burgdorferi species.

The laboratory diagnosis is based on the search for specific antibodies, produced in case of infections. However, the currently available serologic tests do not have an absolute predicting value and they need to be combined with the clinical observation as well as with the anamnestic and epidemiologic data/evidence. Considering the above, the best outcome for the patient is obtained by a sinergic cooperation between laboratory specialists and clinicians by sharing the targets and the guidelines for the clinical/diagnostic governance/management of the disease

Introduzione

Caratteristica della patologia infettiva è di essere mutevole nel tempo, con la conseguenza che mentre alcune forme morbose diventano infrequenti o scompaiono altre assumono un'evidenza crescente.

Nel novero delle malattie emergenti si colloca la Borreliosi di Lyme (BL), un'infezione multisistemica ad andamento progressivo, che negli Stati Uniti[1] ed in Europa (dove si registrano mediamente 60.000 nuovi casi l'anno)[2] rappresenta la più frequente zoonosi trasmessa da vettori.

Ne è responsabile una spirocheta appartenente al genere Borrelia, specie *Borrelia burgdorferi* sensu latu (sl), veicolata dalle zecche dure del genere *Ixodes* (specie: *ricinus/scapularis/persulcatus*).

Anche se lo sviluppo completo della BL si descrive in tre stadi clinici successivi, la malattia può evolvere in modo anomalo, autolimitando la progressione degli stadi o esordendo con manifestazioni caratteristiche degli stadi avanzati. La descrizione dei diversi quadri clinici viene usualmente raffigurata in due fasi: la *fase acuta* (I° e II° stadio corrispondente rispettivamente all'infezione localizzata o disseminata) e la *fase cronica* (Tab. I).

Nel 60-80% dei casi l'esordio della BL è costituito da una lesione eritematosa anulare, a carattere espansivo centrifugo (*eritema migrante*), che costituisce il tipico marker clinico dell'infezione e che compare a distanza di 7-14 giorni (range 3-30) dal morso di zecca. Tuttavia una quota non insignificante di persone infettate dalla Borrelia (18%) presenta *solo* sintomi generali aspecifici (malessere generale, astenia)[3] e, nelle aree endemiche, esiste un'elevata percentuale di residenti (oltre 20%) con sieropositività asintomatica[3].

Inoltre, il 10% circa dei pazienti affetti da BL rivela una concomitante infezione sostenuta da uno o più patogeni cotrasmessi dal morso di zecca (TBE virus, l'Anaplasma phagocytophilum, vari tipi di Rickettsiae, e protozoi come

Ricevuto: 21-08-2006 Pubblicato on-line: 21-09-2006

Corrispondenza a: Dott. Maurizio Ruscio, Laboratorio Ricerche Cliniche e Microbiologia, Dipartimento Diagnostico e Strumentale, ASS 4 Medio Friuli, Ospedale Civile, viale Trento e Trieste n. 38, 33038 San Daniele del Friuli (UD).
Tel. 0432-949350, fax 0432-949263, e-mail:mauriziorusciо@hotmail.com

Tabella I. Gli stadi evolutivi della BL.

Sviluppo della BL	*I° stadioacutalocalizzata*	*II° stadioacutadisseminata*	*III° stadiocronica*
Cute	eritema migrante	eritemi multipli	acrodermatitiscronicaatrophicans; lymphocitoma
Sistema Nervoso		meningite subacuta neuriti craniche radicolo - neuriti	encealopatia; leucoencefalite; polineuropatia
Muscoli e Articolazioni		atromialgie migranti; episodi artritici	artriti prolungate e ricorrenti; artriti croniche
Cuore		blocco A-V; mio-peri-pancardite	
Sintomi Generali	simil-influenzali	astenia, malessere generale	astenia

la Babesia microti)[4]. La presenza di più infezioni concomitanti induce quadri clinici a maggiore complessità.

L'agente eziologico

L'agente patogeno della malattia di Lyme è una spirocheta appartenente all'ordine *Spirochetacee*, genere *Borrelia*, specie *Borrelia burgdorferi* sl, di cui si conoscono tre ceppi patogeni: la *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (ss), la *Borrelia afzelii* e la *Borrelia garini,* con tropismo diverso per i tessuti umani. All'esistenza di ceppi differenti sono state associate talune variazioni cliniche nella presentazione della malattia osservate nelle diverse aree geografiche[5].

La Borrelia burgdorferi è un microrganismo spiraliforme, la cui struttura cellulare, simile a tutte le altre spirochete, è composta da un cilindro protoplasmatico (circondato dalla membrana citoplasmatica), uno spazio periplasmatico contenente un numero variabile di endoflagelli (da 7 a 11) e una membrana esterna pluristratificata. Il suo genoma è organizzato in unico cromosoma lineare e in porzioni di DNA suddivise in plasmidi lineari e circolari che codificano la produzione di almeno 30 differenti proteine. Si comportano come immunodominanti le Osp *(Outer surface protein*) A-F, espresse in modo variabile sulla membrana, indicative della capacità d'adattamento della Borrelia burgdorferi ai vari contesti (artropodi, mammiferi) e la p41 o flagellina (antigene comune a tutte le spirochete).

Durante le infezioni acute disseminate la Borrelia burgdorferi espone sulla superficie una proteina denominata VLsE, soggetta a rilevanti variazioni antigeniche.

I test diagnostici

Nella diagnosi strumentale della BL le indagini sierologiche costituiscono la strategia maggiormente seguita, anche se pongono non pochi problemi di sensibilità, specificità e standardizzazione.

Infatti, nonostante la loro ampia diffusione (vengono comunemente eseguite in ogni laboratorio), possono determinare esiti molto diversi, con conseguenti difficoltà di interpretazione dei risultati. Ciò è in parte dovuto al tipo di metodica utilizzata (IFI, EIA,CLIA, Western immunoblots), ai valori soglia adottati, alla diversa modalità di espressione dei risultati (qualitativi, quantitativi), ma è determinato principalmente dalla qualità degli antigeni utilizzati (naturali o ricombinanti) e dalla loro tipologia (selezione e combinazione).

La scarsa sensibilità dei test sierologici è correlata all'utilizzo di composizioni antigeniche incomplete e/o all'esecuzione precoce dei test (prime settimane di infezione, quando la reazione immunitaria non si è ancora sviluppata o è stata inibita dalla terapia antibiotica assunta a scopo di profilassi dopo il morso di zecca).

L'insufficiente specificità è data dall'uso di componenti antigeniche comuni ad altre spirochete che possono portare a reazioni falsamente positive (cross-reattività), al pari di quelle indotte dalla presenza del fattore reumatoide e da infezioni acute da Epstein-Barr virus.

Per quanto attiene ai test di Western immunoblot l'interpretazione del bandeggio da parte del laboratorio presenta obiettivi elementi di complessità. Per una corretta decodifica del pattern anticorpale, infatti, è necessaria una familiarità con il significato diagnostico assunto dalle bande in relazione ai diversi ceppi e allo stadio evolutivo della malattia. A tale riguardo non sono applicabili i criteri interpretativi proposti negli Stati Uniti[6], frutto di una diversa ecologia della Borrelia (presenza della sola Bb ss), anche se riproposti *tout court* dai produttori di kit diagnostici. Ad esempio, anche un pattern incompleto può essere considerato positivo se si tratta di malattia in fase precoce; di converso, può risultare determinante ai fini diagnostici non tanto la presenza, quanto l'intensità di alcune bande (p41, Osp C). Per questa ragione va sottolineata la necessità di fornire un commento interpretativo all'esame, oltre che l'elenco delle bande rilevate.

Nel tentativo di migliorare le performances analitiche e la standardizzazione sono state indicate nuove strategie diagnostiche; una delle più utilizzate è la strategia a *due step,* avanzata dal Centrers for Disease Control and Preventon nel 1994: il primo step prevede l'utilizzo di un test immunoenzimatico e il secondo step la Western immunoblots per la conferma la positività ottenuta con i test di primo livello.

L'interpretazione dei risultati

Uno dei motivi di errata interpretazione dei test sierologici dipende dalla corretta valutazione degli altri fattori che conducono alla diagnosi di BL.

In accordo con il *teorema di Bayes* il valore predittivo (positivo o negativo) di un test dipende dalla sua accuratezza (sensibilità e specificità) e dalla probabilità che la malattia per la quale viene richiesto sia la causa dei disturbi *(pretest probability*) (Tab. II). Questo secondo fattore, stante il livello di accuratezza dei test sierologici attualmente disponibili, assume un rilievo notevole. Un paziente infatti con un manifesto eritema migrante, che provenga (o risieda) in

Tabella II. Pretest probability per BL e richiesta dei test sierologici.

endemia BL	*clinica BL*	*pretestprobability*	*sierologiaBL*
-	assente	< 5%	nonrichiesta
-	compatibile	bassa	richiesta
-	sintomi generali	bassa	da valutare
+ -	compatibile	20 -80%	richiesta
+	assente	bassa	non richiesta
+	sintomi generali	5-20%	richiesta
++	eritema migrante(patoniomonica)	> 80%	non richiesta diagnosi solo clinica

un'area endemica, ha un'alta probabilità di essere affetto da BL anche se l'esame sierologico dà esito negativo. Per contro un paziente con sintomatologia vaga e aspecifica, ha poche probabilità che la BL sia la causa dei disturbi anche se il test sierologico risulta positivo. E' documentata infatti una elevata sieropositività asintomatica nelle popolazioni residenti in zone endemiche o tra categorie esposte a fattori di rischio. Queste persone possono presentare nel corso della vita sintomi aspecifici ed essere erroneamente considerate affette da BL a causa di un risultato sierologico positivo.

Le indagini di laboratorio quindi non hanno un valore predittivo assoluto, ma costituiscono un utile supporto diagnostico ai riscontri clinici[7].

Il flusso della richiesta di test diagnostici

Il paziente che si sottopone ad accertamenti sierologici per la diagnosi di BL si trova essenzialmente in tre situazioni:

1. ha subito un morso di zecca con successivo sviluppo di manifestazioni cliniche caratteristiche per la BL (eritema migrante);
2. presenta un quadro clinico compatibile con la BL, con o senza ricordo di morso di zecca;
3. ha subito (o è stato esposto al rischio di subire) un morso di zecca senza esitare segni e sintomi clinici.

Nel primo caso il percorso diagnostico è guidato dalla tipologia della manifestazione clinica e dal dato anamnestico (esordio della/e lesione/i nell'arco di 3-30 gg dalla rimozione della zecca; ricordo del morso) che costituiscono condizione sufficiente per porre diagnosi di malattia. La ricerca degli anticorpi anti Borrelia oltre che inutile (la sieroconversione è infatti lenta) genera un inevitabile rischio per il paziente, rappresentato dal ritardo nella prescrizione della terapia per necessità di attendere l'esito degli esami.

Nel secondo caso, invece, il sospetto diagnostico spesso indotto da manifestazioni articolari, neurologiche, cutanee o cardiache, legittima e rende necessario il ricorso alle indagini di laboratorio. L'osservazione clinica supportata dall'eventuale dato anamnestico e dal contesto epidemiologico costituisce quindi il paradigma per il ricorso agli accertamenti di laboratorio, dal cui esito dipenderanno la diagnosi di BL e la conseguente terapia.

Nel terzo caso, infine, l'accertamento sierologico non sempre è corretto e utile al paziente. La probabilità infatti di ammalarsi dopo un eventuale morso di zecca è modesta[8] e l'esecuzione indiscriminata di esami sierologici (con una bassa *pretest probability*) può produrre risultati positivi difficili da gestire inducendo, quasi inevitabilmente, trattamenti terapeutici non indispensabili e controlli successivi. Tale eventualità è particolarmente elevata nei pazienti che abitualmente risiedono o frequentano zone a rischio (o endemiche) e che possiedono una sieropositività asintomatica.

I possibili rischi di errore nell'iter diagnostico della BL

Il modello della *Nexus vision* suddivide l'iter diagnostico in cinque fasi: la fase pre-preanalitica, la fase preanalitica, la fase analitica, la fase postanalitica e la fase post-postanalitica.

Declinando detto modello nella diagnosi di BL emergono le seguenti possibilità di errore, e quindi di rischio per il paziente:

- in fase pre-preanalitica: inappropriatezza della richiesta, frutto di un'incompleta o erronea analisi del *contesto* da parte del clinico. L'esecuzione dei test è superflua in presenza di sintomi patognomonici per la BL, in pazienti asintomatici e, banalmente nei giorni immediatamente successivi al morso di zecca;
- in fase preanalitica: richiesta del test a laboratori con carenza/assenza delle *caratteristiche di praticabilità*[9] (tipo di strumentazione, competenze necessarie all'esecuzione dell'indagine, TAT inadeguato);
- in fase analitica: impiego di kit con scarsa sensibilità/specificità, mancata definizione di una strategia diagnostica (es. modello a due step);
- in fase postanalitica: errata interpretazione dei risultati per missinterpretazione del bandeggio della Western immunoblot (*overdiagnosis)*; scarsa standardizzazione nell'espressione dei risultati (qualitativi o quantitativi);
- in fase post-postanalitica: under/overdiagnosis con ricadute sul comportamento terapeutico.

Conclusioni

La diagnosi di BL, diversamente da altre malattie infettive, non può essere affidata solo al laboratorio e richiede di dover rapportare l'interpretazione dei test sierologici al contesto clinico.

Il migliore *outcome* per il paziente si raggiunge, quindi, affidando agli specialisti di laboratorio il ruolo di consulenti nell'elaborazione di linee guida e di percorsi diagnostici condivisi con i clinici.

La nuova frontiera, in accordo con quanto affermato da Cappelletti è di informare sul significato interpretativo, e non assoluto, dei risultati degli esami e di indirizzare correttamente ad un appropriato iter terapeutico quanti si rivolgono direttamente al laboratorio[10].

La sfida di oggi e dei prossimi anni sarà quella di riuscire a declinare questo compito con i nuovi scenari prefigurati dalla politica sanitaria, sempre più orientata alla concentrazione/fusione dei laboratori e sempre più sensibile al fascino *ragionieristico* degli esamifici, che mal si coniuga con gli obiettivi - anche economici - della salute.

Bibliografia

1. Center for Disease Control and Prevention. Summary of notifiable diseases-United States, 2000. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2002; 49(53):1-100.
2. Parola P, Raoult D. Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe. Clin Microbiol Infect 2001; 7:80-3.
3. Steere AC, Sikand VK. The presenting manifestations of Lyme disease and the outcomes of treatment. N Eng J Med 2003; 348:2472-4.
4. Magnarelli LA, Kolbert CP, Mitchel PD. Coexistence of antibodies to tick-borne patogens of babesiosis, ehrlichiosis, and Lyme borreliosis in human sera. J Clin Microbiol 1995; 33: 3054-7.
5. Steere AC. Lyme disease. N Engl J Med 2001; 345:115-25.
6. Agueo-rosenfeld ME, Nowakowski J, McKena DF. Sierodiagnosis in early Lyme disease. J Clin Microbiol 1993; 31:3090-5.
7. Ruscio M. Il Controllo della malattia di Lyme. Feletto Umberto (UD): Arti Grafiche; 1995.
8. Sigal LH. Laboratory confirmation of the diagnosis of Lyme disease. Uptodate 2002; 11:1.
9. Plebani M. Towards quality specifications in extra-analitical phases of laboratory activity. Clin Chem Lab Med 2004; 42:576-7.
10. Cappelletti P. La risposta della Medicina di Laboratorio al quesito clinico. RIMeL/IJLaM 2005; 1(Suppl.):15-23.