

## Borreliosi di Lyme - TEST immunoDOT

La borreliosi di Lyme deve il nome all'omonima cittadina americana in cui fu descritto il primo caso nel 1975. La malattia di Lyme è oggi la più diffusa e rilevante patologia trasmessa da vettore con diffusione nelle zone geografiche temperate ed è seconda, per numero di casi, solo alla malaria fra le malattie che richiedono un vettore artropode per la diffusione. L'infezione, di origine batterica, colpisce prevalentemente la pelle, le articolazioni, il sistema nervoso e gli organi interni. Può manifestarsi con sintomi gravi, persistenti e, se non viene curata, assume un decorso cronico. L'agente patogeno, la *Borrelia*, è un genere di batterio.

Il batterio *Borrelia burgdorferi sensu striato* è presente in Europa ed è l'unico agente di infezione nel Nord America, il *Borrelia afzelii* e il *Borrelia garinii* sono invece presenti in Europa, Asia e Africa. Questi germi vengono trasmessi all'uomo attraverso la puntura di zecche dure del genere *Ixodes* e forse anche dalle *Amblyomma* e *Dermacentor* (le zecche del cane). I principali serbatoi dell'infezione sono rappresentati da animali selvatici (roditori, caprioli, cervi, volpi, lepri).

Clinicamente i primi sintomi della malattia sono intermittenti e mutevoli. La malattia inizia tipicamente in estate e all'inizio si manifesta con una macchia rossa che si espande lentamente. Entro qualche settimana (che in qualche caso possono diventare mesi), si possono sviluppare disturbi neurologici precoci caratterizzati da artralgie migranti, mialgie, meningiti, polineuriti, linfocitoma cutaneo, miocardite e disturbi della conduzione atrio-ventricolare. I sintomi sono fluttuanti e possono durare per mesi e cronicizzare.

L'ultima fase della malattia a distanza di mesi o anni dall'infezione, è caratterizzata da alterazioni a carico dell'apparato muscolo-scheletrico (artrite cronica), del sistema nervoso centrale e periferico (meningite, encefalomielite, atassia cerebellare, polineuropatie sensitivo-motorie, disturbi del sonno e comportamentali), della cute (acrodermatite cronica atrofica) e dell'apparato cardiovascolare (miopericardite, cardiomegalia).

Dal momento che gli esami di laboratorio non sono sempre in grado di confermare o escludere in modo definitivo la malattia, la decisione di iniziare il trattamento antibiotico dovrebbe essere presa sulla base della diagnosi clinica e dei dati anamnestici ed epidemiologici. La malattia non porta a sviluppare immunità, per cui l'infezione può essere contratta più volte nel corso della vita.

**Nel 1992, GenBio ha introdotto una nuova generazione di saggi per la malattia di Lyme che soddisfano le linee guida per il test borrelia. Le recenti linee guida statunitensi richiedono che le affermazioni sulla specificità vengano valutate utilizzando sieri di comprovati pazienti con Lyme negativi che mostrano sintomi simili alla malattia di Lyme. Queste linee guida sono state istituite a seguito di uno studio condotto dai Centri statunitensi per il controllo delle malattie (CDC), che mostra che tutti i precedenti test commerciali e di ricerca hanno dato falsi positivi a molti pazienti negativi alla malattia di Lyme.**

**I ricercatori hanno notato reazioni crociate tra altre spirochete e borrelia correlata. I problemi più frequenti e più difficili nella diagnosi sono correlati a reazioni crociate con anticorpi contro batteri gram-negativi. I saggi di nuova generazione di GenBio utilizzano un assorbente E. coli (bloccante) per ridurre al minimo queste reazioni crociate e fornire test molto sensibili e specifici che soddisfino le rigorose linee guida FDA.**

**Il test ImmunoDOT Borrelia, inteso come test di screening per la malattia di Lyme, combina proteine di borrelia purificate arricchite con P39 ricombinante (una specifica proteina B. burgdorferi) e una fase di assorbimento per ridurre al minimo la reattività crociata senza compromettere la sensibilità.**

## PROCEDIMENTO

Le incubazioni devono essere eseguite ad una temperatura compresa tra 44 e i 47°C. Portare il Termoblock o la stufa o il termostato a 45/46°C.

Prelevare dalla confezione 4 cuvette di reazione e dispensare :

2 mL R1	Diluyente	
2 mL R2	Attivatore	Enhancer
2 mL R3	Coniugato	
2 mL R4	Substrato	Developer

Dispensare:

10 µL di siero nella cuvetta di reazione contenente il DILUENTE R1 e incubare per 30-60 minuti a 45/46°C.

**Prelevare una STRIP dalla confezione ed immergerla in una provetta contenente acqua distillata per 30/60 secondi.**

**Immergerla nella cuvetta contenente il siero diluito. Agitare la STRIP per 5/10 volte miscelando bene il diluyente con il campione. Lasciare la strip immersa per 5 minuti.**

**Rimuovere la STRIP e lavare con acqua distillata utilizzando sempre una provetta con acqua distillata pulita, agitare su e giù la STRIP per 5/10 secondi, quindi immergere la STRIP nella cuvetta contenente l'attivatore (Enhancer), agitare per 5/10 secondi ed incubare per 5 minuti a 45/46°C.**

**Rimuovere la STRIP e lavare con acqua distillata utilizzando sempre una provetta con acqua distillata pulita, agitare su e giù la STRIP per 5/10 secondi, quindi immergere la STRIP nella cuvetta contenente il coniugato, agitare per 5/10 secondi ed incubare per 15 minuti a 45/46°C.**

**Rimuovere la STRIP e lavare con acqua distillata utilizzando sempre una provetta con acqua distillata pulita, agitare su e giù la STRIP per 5/10 secondi e lasciarla immersa per 5 minuti. Rimuovere la STRIP dalla provetta contenente acqua distillata ed immergerla nella cuvetta contenente il substrato (DEVELOPER), agitare per 5/10 secondi ed incubare per 5 minuti a 45/46°C.**

**Rimuovere la STRIP e lavare con acqua distillata utilizzando sempre una provetta con acqua distillata pulita, agitare su e giù la STRIP per 5/10 secondi. Rimuovere la STRIP dalla provetta contenente acqua distillata, asciugarla su carta assorbente ed interpretare i risultati. I risultati già visibili immediatamente, saranno sempre più netti man mano che la STRIP si asciuga.**

## INTERPRETAZIONE BORRELIA immunoDOT

Il primo punto, più vicino all'etichetta è il controllo positivo.

Il secondo punto è il controllo negativo.

Il terzo punto è positivo sia per anti-P39 anticorpo specifico sia per tutto l'organismo (Borrelia).

Il quarto punto è positivo per tutto l'organismo ( vari ceppi )

Il quinto punto misura la positività per l'anti-P39.

Il sesto punto è positivo per l'anti-flagellina.

A causa dei complessi anticorpo cross-reattività segnalati tra antigeni B. burgdorferi e di altri agenti, si raccomanda la seguente linea guida di riferimento:

Ogni volta che sia il P39 sia l'intero organismo (punti 3,4, e 5) sono reattivi, il risultato viene riportato come:

### "rilevazione di Borrelia Burgdorferi "

Ogni volta che tutti i punti di Borrelia sono non reattivi, il risultato viene segnalato come non reattivo per gli anticorpi borrelia. Dot 3 (organismo intero e P39 ) possono presentare una reazione debole, mentre gli altri punti di Borrelia sono non reattivi. Questo risultato è anche riportato come:

### "Anticorpi Borrelia non rilevati"

Risultati negativi con sospetta malattia di Lyme precoce devono essere ripetuti dopo 4-6 settimane.

Tutti gli altri risultati sono specificati come reattivi contro l'antigene specifico (ad esempio, reattivi contro tutto l'organismo e non reattivo contro P39, reattivo contro flagellina, ecc) o possono semplicemente essere riportate come:

### "Anticorpi Borrelia rilevati"

L'Infezione da Borrelia è di origine batterica e non virale. Ciò significa che non è così facile classificare la fase acuta, presente o passata basandosi esclusivamente sulla risposta immunitaria. È quindi necessario conoscere i sintomi del paziente per classificare lo stadio della malattia.

In Europa i sintomi che possono indurre a classificare un'infezione da Borrelia sono almeno tre o quattro:

1. Sintomi da raffreddore, di natura prevalentemente "out-doors", cioè persone che sono esposti alle zecche. Ciò è causato da un ceppo di Borrelia non presente negli Stati Uniti (Nota: Il nostro test o qualsiasi altro test di Borrelia cross-reagisce con tutti i ceppi di Borrelia ). Questo ceppo è più associato alla regione Slovenia o altre zone boschive Italia compresa. In presenza di un risultato positivo il medico tratta i pazienti con antibiotico che solitamente guarisce sia la Borrelia che altre infezioni simili.

2. Sintomi di artrite si manifestano quando l'infezione è vecchia di mesi o di anni. In questo caso si avrà un segnale molto forte di IgG.

3. La fase acuta dell'infezione della Borrelia burgdorferi viene diagnosticata quando appaiono caratteristiche lesioni associate alla "Malattia di Lyme". Sia le IgM che le IgG compaiono rapidamente. La diagnosi e il trattamento migliori vengono elaborati osservando la caratteristica lesione cutanea. Se non c'è lesione, non vi è ragione di credere che vi sia una borreliosi, anche se il paziente manifesta febbre alta e

altri sintomi. Anche se la malattia non è borreliosi, il trattamento antibiotico è di solito necessario. (ad esempio, infezioni da rickettsie).

4. Infezione cronica o neuroborellisi: gli esami sierologici di solito sono inutili. Anche se si verificano le condizioni per cui si potrebbe pensare ad una borreliosi, nella maggior parte dei casi le cause sono da ricercare altrove. Non esiste nessun test di laboratorio per una possibile diagnosi definitiva.

#### **L'interpretazione del test ImmunoDOT è la seguente:**

1 Se l'anti-P39 è presente l'infezione da *Borrelia* è confermato. Non è possibile distinguere la fase di malattia senza conoscere i sintomi del paziente.

2 Se solo anti-flagellina è presente, si è in presenza di fase acuta dell'infezione.

3 Se l'antibiotico è somministrato immediatamente (entro prima settimana), non ci sarà risposta anticorpale ciò presuppone che il paziente non avrà più i sintomi dell'infezione.

**Si noti che l'uso più importante del test è la rilevazione dell'artrite "curabile". Se l'anti-p39 è fortemente positivo, l'artrite è causata da *Borrelia*.**

Il test è utile per le prime tre presentazioni della malattia, ma devono essere sempre valutati con attenzione i sintomi del paziente per una corretta diagnosi.

Risultati positivi per l'organismo intero o la flagellina vanno interpretati con cautela. I sieri di pazienti con altre malattie da spirochete (sifilide, framboesia, Pinta, leptospirosi, febbre ricorrente, ecc) possono anche dare falsi risultati positivi. Se si sospetta una sifilide, è consigliabile un test un non-treponemico (ad esempio, RPR) per escludere questa causa.

Il genere *Borrelia* possiede almeno 37 specie note; di queste, 12 sono correlate con la malattia di Lyme o con altre borreliosi. Esso possiede un buon numero, tuttora ignoto, di ceppi (in inglese *strains*). Il nome spesso si riferisce alle varie specie di *Borrelia* che sono noti agenti della malattia di Lyme (ed affini) con il termine *Borrelia burgdorferi sensu lato*, e da qualche tempo si è scoperto che possiedono una maggiore variabilità genetica rispetto a quel che si pensava in precedenza.

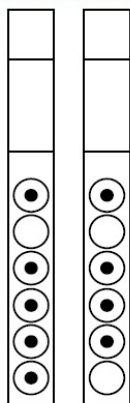
## ESTRATTO DALLA IFU ORIGINALE

### INTERPRETATION

The first dot, nearest the label is the positive reagent control. The second dot is the negative reagent control. The third dot measures both anti-P39 and anti-whole organism (*Borrelia*) responses. The fourth dot measures anti-whole organism. The fifth dot measures anti-P39. The bottom, or sixth dot, measures anti-flagellin. Because of the complex antibody cross-reactivities reported between *B. burgdorferi* antigens and other agents, the following reporting guideline is recommended:

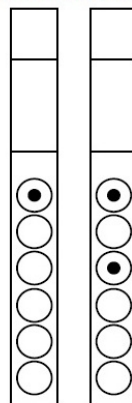
- Whenever both P39 and whole organism (dots 3,4, and 5) are reactive, the result is reported as:  
**“Specific *B. burgdorferi* detected”**
- Whenever all *Borrelia* dots are nonreactive, the result is reported as nonreactive for *borrelia* antibodies. Dot 3 (whole organism and P39) may exhibit a weak reaction while the other *Borrelia* dots are nonreactive. This result is also reported as:  
**“*Borrelia* antibody not detected”**
- All other outcomes are initially specified as reactive against the specific antigen (e.g., reactive against whole organism and nonreactive against P39, reactive against flagellin, etc.) or may simply be reported as:

#### (Anti-P39 Present)



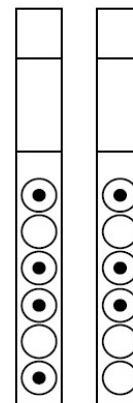
Positive Control  
 Negative Control  
 Whole Organism + P39  
 Whole Organism  
 P39  
 Flagellin

#### NONREACTIVE



Positive Control  
 Negative Control  
 Whole Organism + P39  
 Whole Organism  
 P39  
 Flagellin

#### “*Borrelia* antibody detected”



Negative results in suspected early Lyme disease should be repeated in 4-6 weeks.

Whole organism or flagellin positive results should be interpreted with caution. Sera from patients with other spirochetal diseases may also give positive results.

**Sensibilità: 98%**

**Specificità: 100%**