



LA MALATTIA DI LYME: UNA ZONOSI EMERGENTE ANCHE IN TEMPO DI COVID-19

WEBINAR

Il sottoscritto Dott./Prof. Maurizio Ruscio

Il Dott./Prof. Maurizio Ruscio non si trova in una situazione di conflitto di interessi rispetto all'evento ai sensi e per gli effetti dell'Accordo Stato-Regioni del 5 /01/2009

20 e 21 Novembre 2020



**LA MALATTIA DI LYME: UNA ZONOSI EMERGENTE
ANCHE IN TEMPO DI COVID-19**

WEBINAR

Quando e Quali Test di Laboratorio Richiedere e come Interpretare i Risultati

Maurizio Ruscio

*Direttore del Dipartimento di Medicina di Laboratorio
Azienda Sanitaria Universitaria Giuliano Isontina*

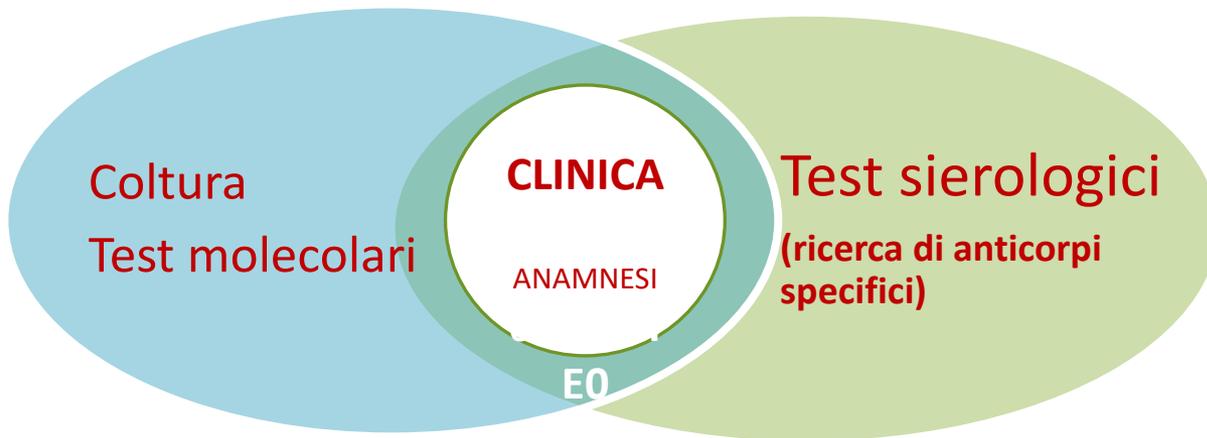
Serena Bonin

*Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche e della
Salute-Università di Trieste*

20 e 21 Novembre 2020

Quali

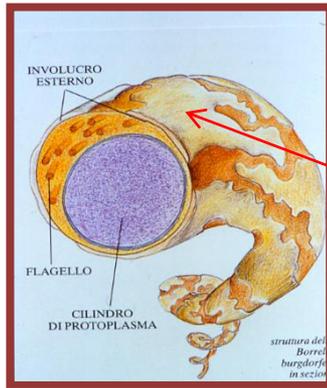
Gli strumenti diagnostici



I test sierologici per ML e la loro evoluzione

Immunofluorescenza (**IFAs**),
enzyme-linked immunosorbent assay (**ELISA**),
enzyme-immunoassay (**EIA**),
chemiluminescence immunoassay (**CLIA**),
luminex, fluoro-immunoassay (**FIA**), immuno-
fluorimetric assay (**IFMA**), immuno-
enzimometric assay (**IEMAI**) immuno-
chemiluminometric assay (CMA).

Borrelia burgdorferi sensu lato complex



The organism has few proteins with biosynthetic activity

The only known virulence factors of B.b. are surface proteins (OSP A-F) that allow the spirochete to attach to mammalian cells

La *Borrelia burgdorferi* s.l.

Borrelia burgdorferi ss
Borrelia spielmanii
Borrelia bissetti
americana
Borrelia andersoni
(Girard, Fedova e Lane,
2011- Clark 2013)

Borrelia miyamotoi
(Pitt, 2016)

Borrelia afzelii
Borrelia garinii
Borrelia burgdorferi ss
Borrelia bavariensis
Borrelia spielmanii



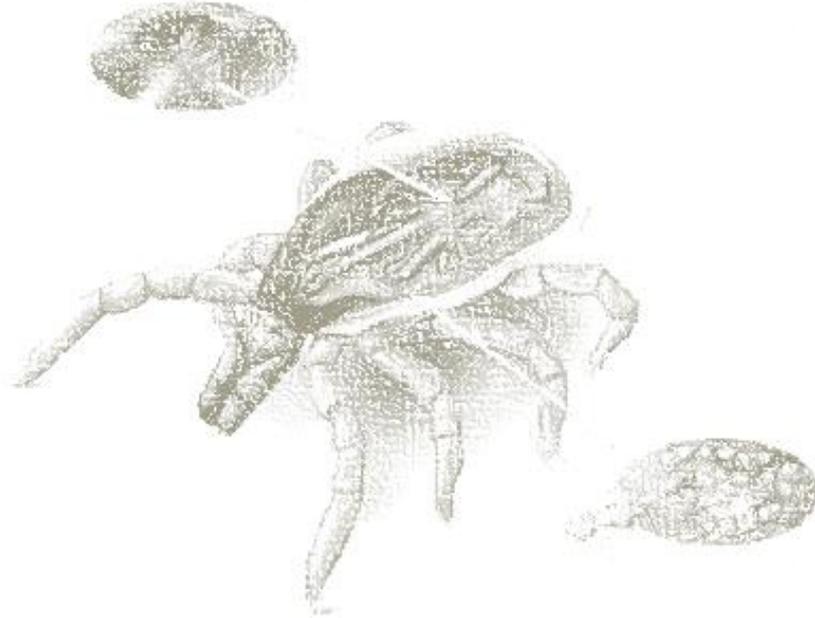
Borrelia japonica,
tanukii, *turdae*, *sinica*

Borrelia lonestari

Morso di zecca e trasmissione della Bb



Morso di zecca e trasmissione della Bb



Il pasto di sangue è lo stimolo per la Bb a regolare la produzione di **OspC, DbpA, DbpB** e **p66** e a ridurre la produzione di **OspA e B**.

Il **co-feeding** accresce le varianti di **Osp C** (*Rosa, 2005, Pérez, 2011*)

L'evoluzione dei test sierologici per LD

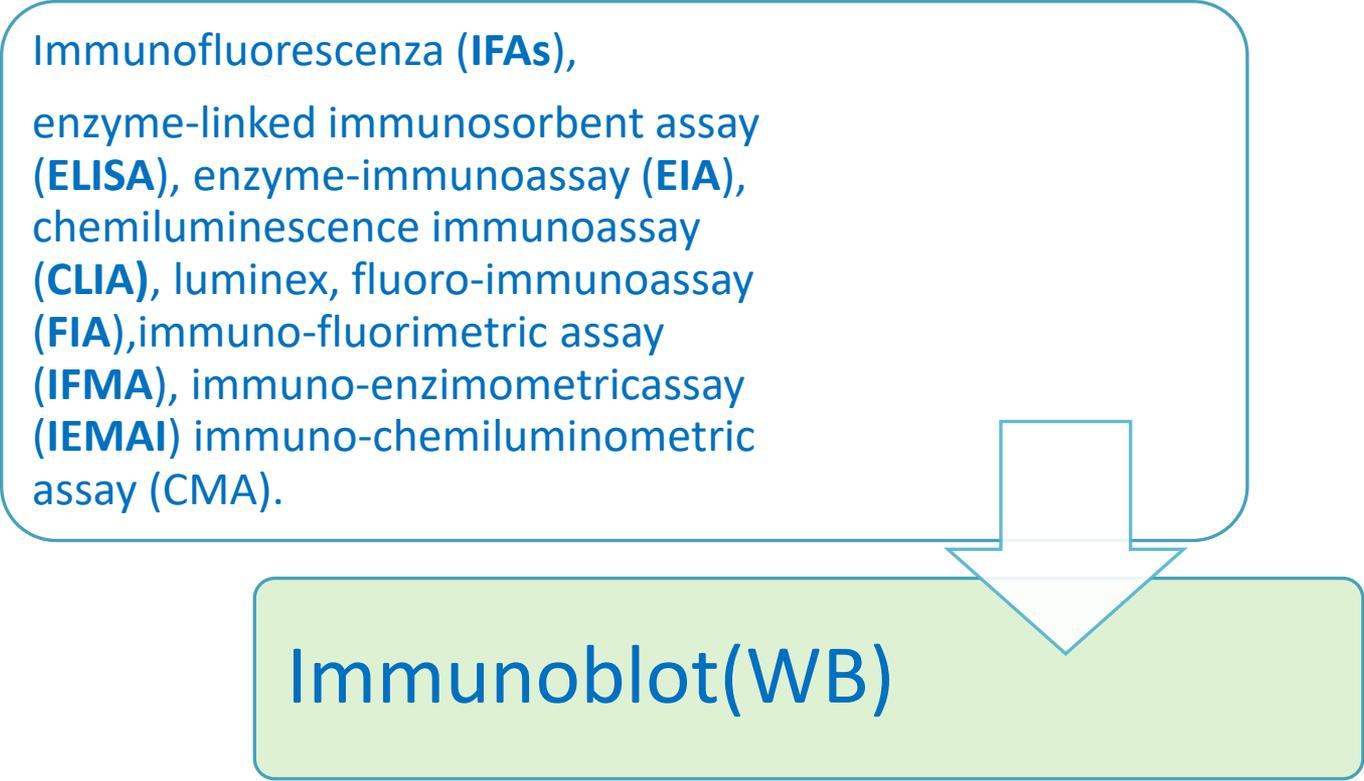
VLsE (Variable major protein – Vmp 35 kDa)

C6 (VLsE – IR6 epitopo immunodominante)
ricombinante 26 aminoacidi ELISA

OspC (Outer surface protein C 23 kDa)
pepC10 (kinetic ELISA)
(rVLsE/pepC10) e OspC1

I test sierologici per ML

Immunofluorescenza (**IFAs**),
enzyme-linked immunosorbent assay
(**ELISA**), enzyme-immunoassay (**EIA**),
chemiluminescence immunoassay
(**CLIA**), luminex, fluoro-immunoassay
(**FIA**), immuno-fluorimetric assay
(**IFMA**), immuno-enzimometric assay
(**IEMAI**) immuno-chemiluminometric
assay (CMA).



Immunoblot(WB)

Antigen (strain)

EM

NB

late LB

controls

p100 (PKo)

p58 (PBi)

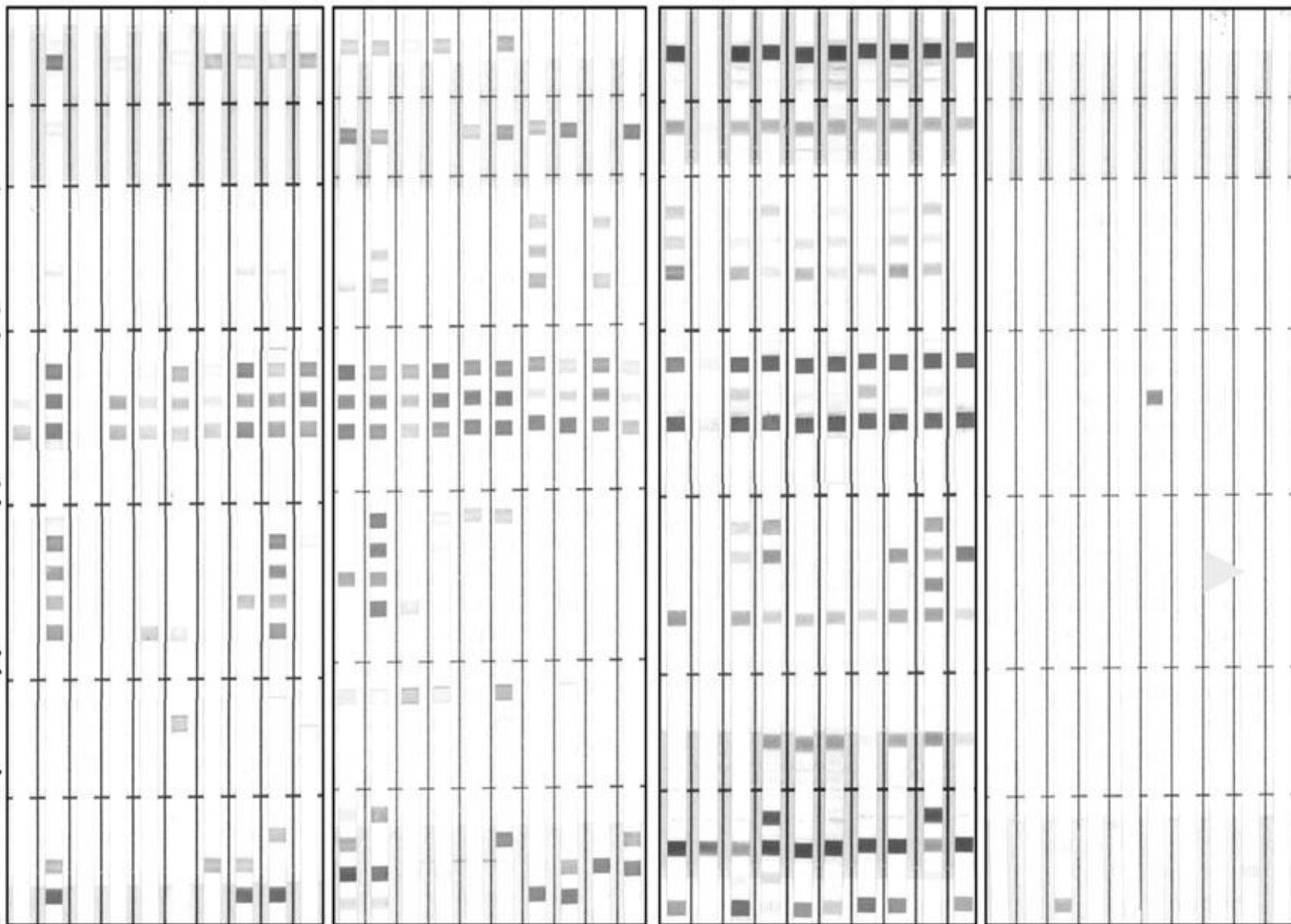
BmpA (PKo)
(PBi)

VlsE (PKa2)
(PKo)*
(PBi)*

OspC (B31)
(PKo)
(PBi)
(20047)

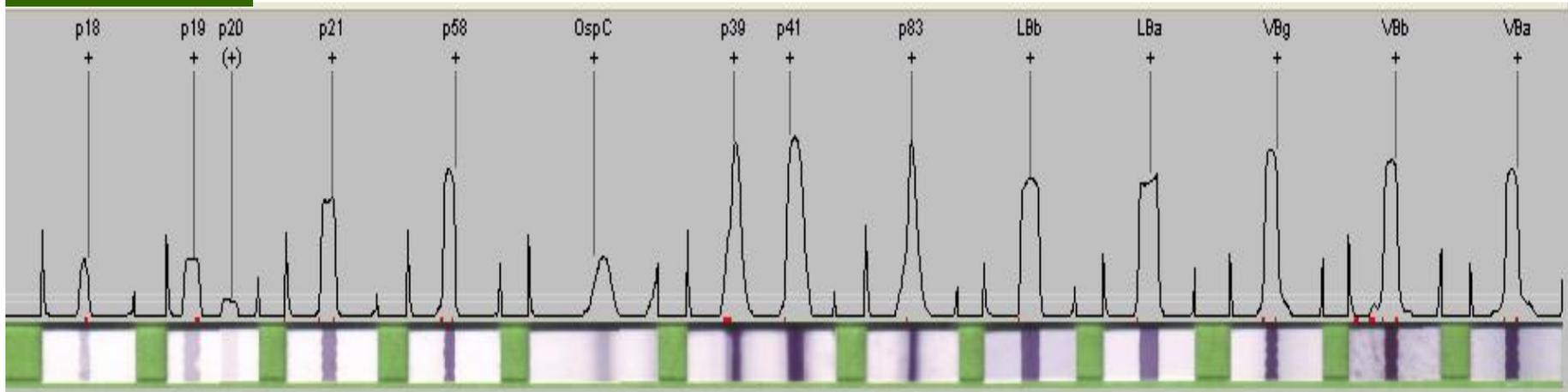
p41i (PKo)
(PBi)

DbpA (B31)*
(PKo)
(PBr)
(PBi)*

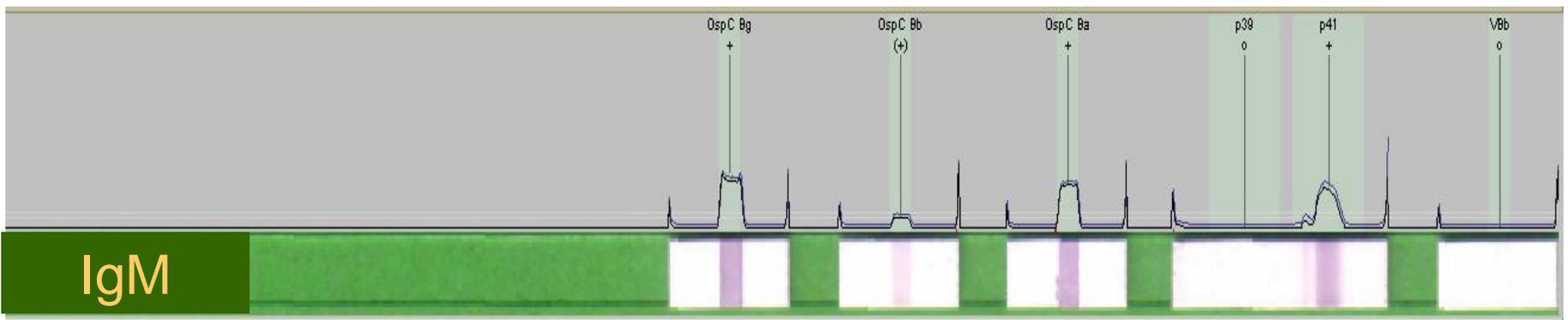


I test di conferma in Immunoblot (secondo livello)

IgG



IgM



I test di conferma in Immunoblot (secondo livello)

- **Immunoblot (western blot)** è in grado di rilevare la risposta immunitaria alle proteine caratteristiche della *B. burgdorferi* s.l.
- I criteri utilizzati per l'interpretazione dei risultati (bandeggio) dell'immunoblot si basano sulla presenza (e l'interpretazione) delle bande diagnostiche rilevate, molte delle quali sono state identificate nel lontano 1990s (Hauser, Lehnert e Wilske 1999; Wilske 1999, 2000).

Interpretation criteria

Ag

IgG: positive if ≥ 5 bands of the following are present:

p18,p23,p28,p30,p39,p41,p45,p58,p66, p93

IgM: positive if ≥ 2 bands of the following is/are present:

p23 OspC, p39 BmpA, p41

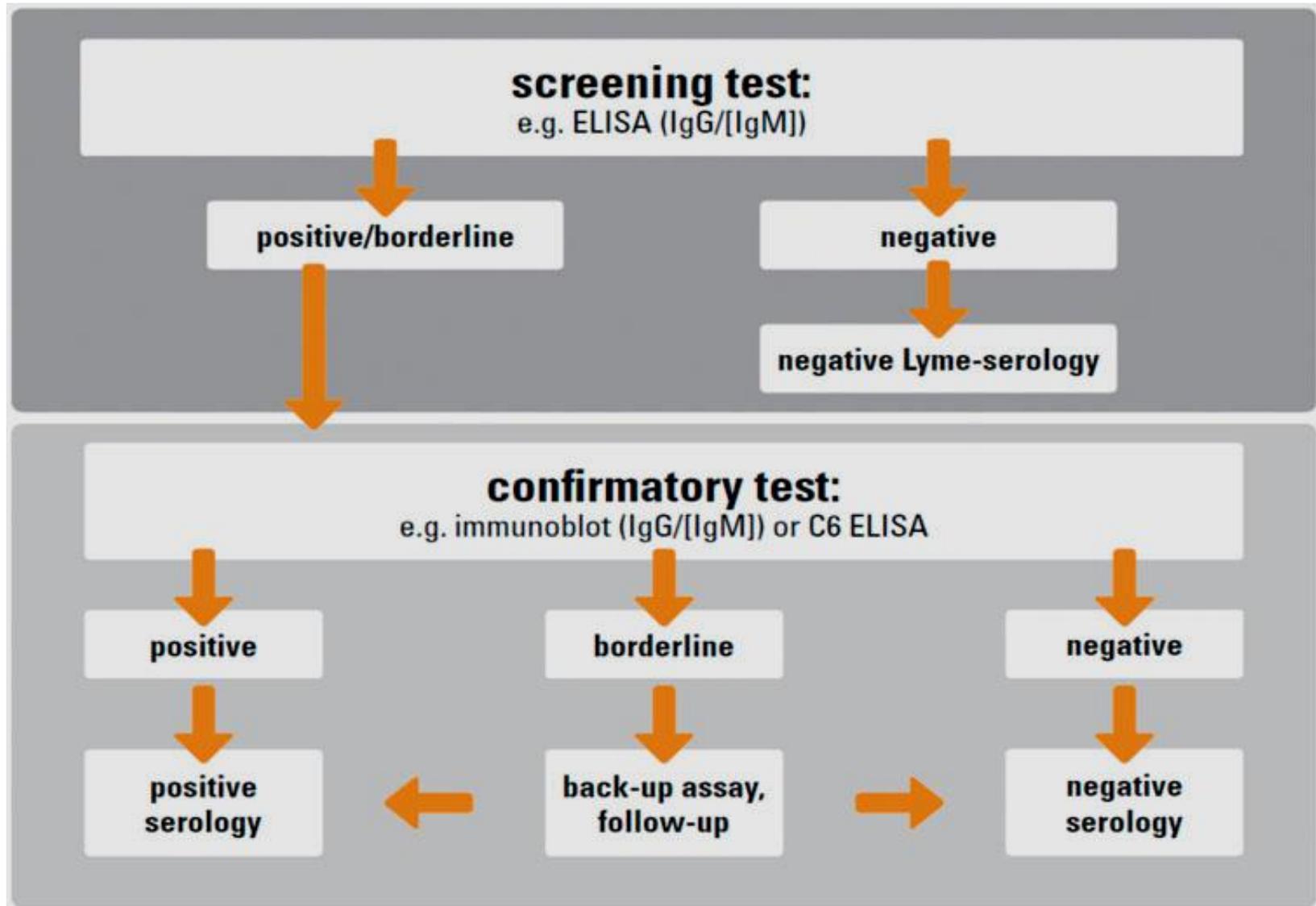
Dresler et al, Engstrom et al.

I test di conferma in Immunoblot (secondo livello)

- L' **EUCALB** (*European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis*) ha effettuato uno studio multicentrico a fine di individuare dei criteri interpretativi standard per l'immunoblot in EU.

Sebbene sia stato identificato un set di **8 bande significative**, dai laboratori partecipanti, non è stato possibile individuare uno schema unico per tutta l'EU (Robertson 2000).

Two-tiered laboratory testing strategy



Assay ^a	Sensitivity (%)		Specificity (%)		Reference
	Early (stage 1)	Late (stages 2, 3)	Healthy donors ^b	Patients with non-LD infections or conditions	
WCS ELISA	74.9	97.7, 98.4	96.4	89.3	<i>Wormser, 2012</i>
WCS ELISA + WB	35.2	77.3, 95.9	99.5	99.2	
C6 ELISA	66.5	88.6, 98.4	98.8	99.5	
C6 ELISA + WB	34.5	75, 95.1	99.5	99.5	
VlsE CIA ^c	69.8	100	99.5	93.7	<i>Ledue, 2008</i>
pepC10 kELISA	47.3	46.1, 10.3	100	98.0	
VlsE/pepC10 kELISA	67.2	88.5, 94.1	99.2	96.7	<i>Bacon, 2003</i>

^a WCS, whole-cell sonicate; VlsE, variable major protein (Vmp)-like sequence, expressed; WB, Western blot; ELISA, enzyme linked immunosorbent assay; CIA, chemiluminescent immunoassay; kELISA, kinetic ELISA.

^b Data from healthy donors from regions in which Lyme disease is endemic and from those in which it is not endemic were combined.

Un approccio alternativo

Two-Tiered Antibody Testing for Lyme Disease With Use of 2 Enzyme Immunoassays, a Whole-Cell Sonicate Enzyme Immunoassay Followed by a VlsE C6 Peptide Enzyme Immunoassay

John A. Branda,¹ Katy Linskey,¹ Yeowon A. Kim,¹ Allen C. Steere,² and Mary Jane Ferraro^{1,2}

¹Department of Pathology, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts; and ²Department of Medicine, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts

Background. Lyme disease (LD) antibody testing currently involves a 2-tiered algorithm with a whole-cell sonicate (WCS) enzyme immunoassay (EIA), followed by IgM/IgG Western immunoblots. A single EIA using the C6 peptide of the *Borrelia burgdorferi* variable-major protein-like sequence expressed lipoprotein provides similar or better sensitivity but less specificity, compared with standard 2-tiered testing. Here, we investigated an alternative 2-tiered strategy, in which the first step remained a WCS EIA, but immunoblotting was replaced by a C6 EIA.

Methods. We determined the sensitivity of the 3 testing strategies with use of 91 serum samples from research study patients with LD and 78 serum samples from patients with LD whose samples were submitted to our hospital's clinical laboratory. Specificity was measured using 54 patients with other illnesses and 1246 healthy subjects from areas where the infection is endemic and nonendemic.

Un approccio alternativo

TABLE 2 Comparison of the traditional TTTA to a 2-EIA TTTA and the C6 ELISA alone in sera from patients with well-characterized Lyme disease^a

Testing algorithm	Sensitivity (%)			Specificity (%)	
	Stage 1 (n = 114)	Stage 2 (n = 26)	Stage 3 (n = 29)	Healthy donors ^b (n = 1,246)	Patients with a non-LD infection or condition (n = 54)
Traditional ^c	42.1	73.1	100	99.4	100
C6 ELISA alone	56.1	100	100	98.4	98.1
2-ELISA ^d	52.6	100	100	99.4	100

^a Adapted from reference 17.

^b Data from healthy donors from regions in which Lyme disease is endemic and from those in which it is not endemic were combined.

^c Traditional TTTA, WCS ELISA followed by Western blot analysis.

^d 2-ELISA, WCS ELISA followed by C6-ELISA.

Bayes' Theorem: predictive values of the test

accuracy (sensitivity and specificity)

pretest likelihood (prior probability)

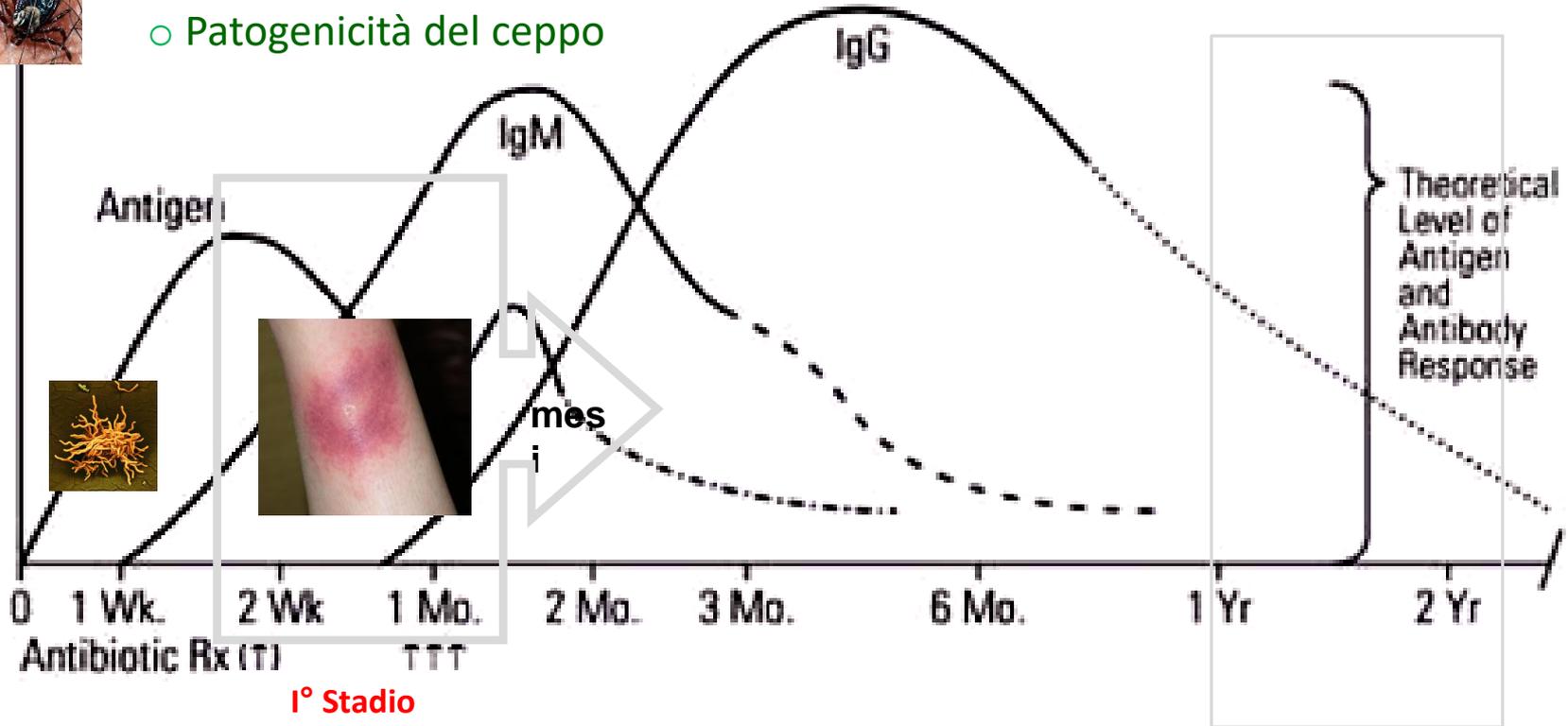
Pretest probability

- I. manifestazioni cliniche
- II. dato anamnestico (morso di zecca)
- III. attività svolte
- IV. tempistica dell'infezione
- V. prevalenza
- VI. stagionalità

Quando

La dinamica anticorpale

- Fattori proinfiammatori
- Dose di inoculo
- Patogenicità del ceppo



mes

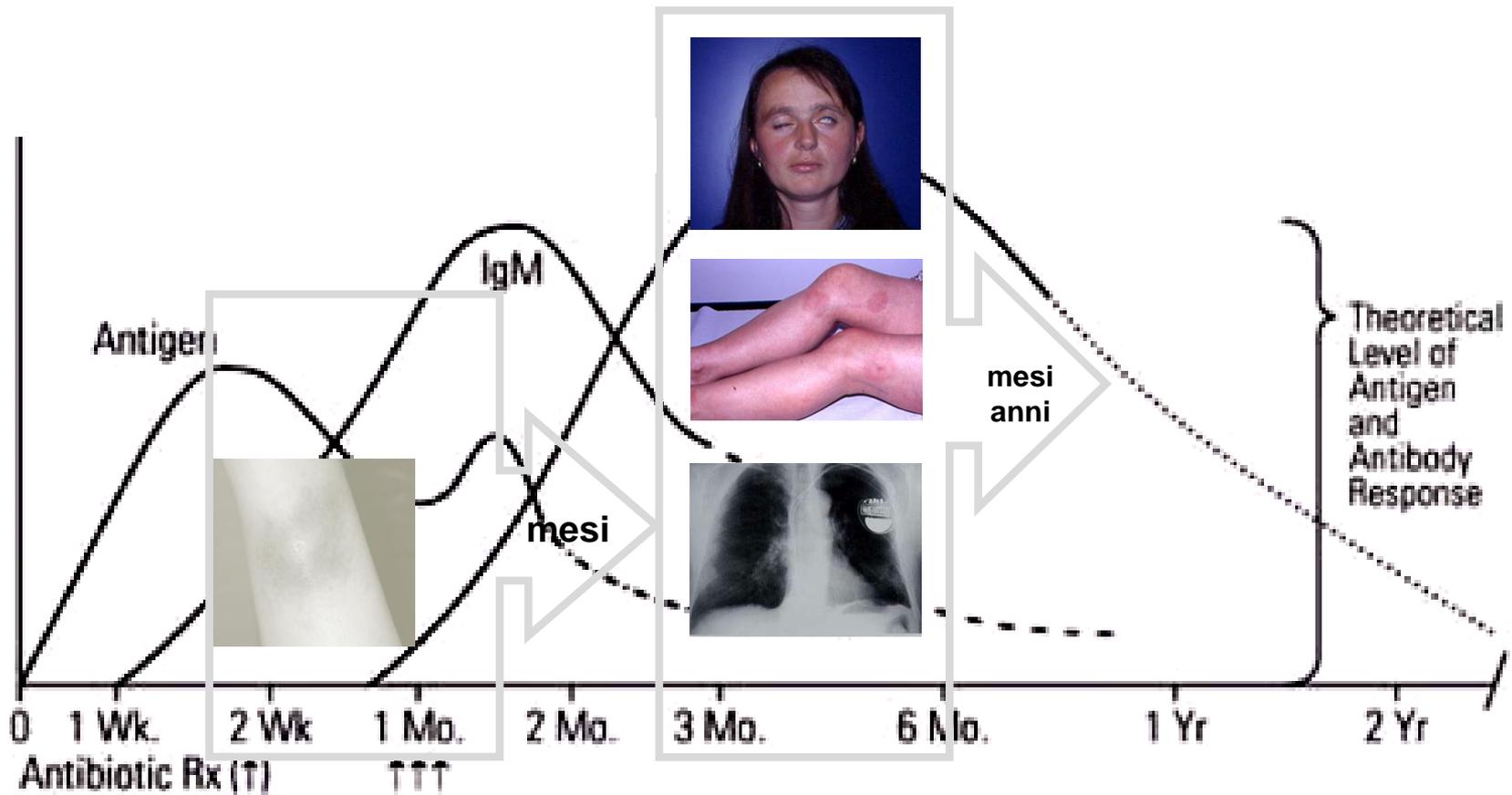
i

0 1 Wk. 2 Wk. 1 Mo. 2 Mo. 3 Mo. 6 Mo. 1 Yr. 2 Yr

Antibiotic Rx (T) TTT

1° Stadio
IgM+
nel 10-50%
Aguero, 2005

La tempistica



II° Stadio
IgG-IgM 70-90%

Come

Considerazione 1

La diagnosi di *erythema migrans* tipico non richiede l'esecuzione gli esami sierologici

Considerazione 2

Le altre manifestazioni della LD
richiedono la conferma sierologica

La presenza di sole IgM anti B. burgdorferi

Presenza di Fattore Reumatoide

Malattie autoimmunitarie

Attivazione policlonale aspecifico (EBV, CMV...)

Considerazione 1

La positività protratta di IgM
anti B burgdorferi non ha rilevanza
diagnostica e non necessita di reiterati
controlli

Considerazione 2

Per sintomi riferibili alla LD, iniziati da oltre 6 mesi, la presenza di IgG specifiche è (di regola) mandatoria

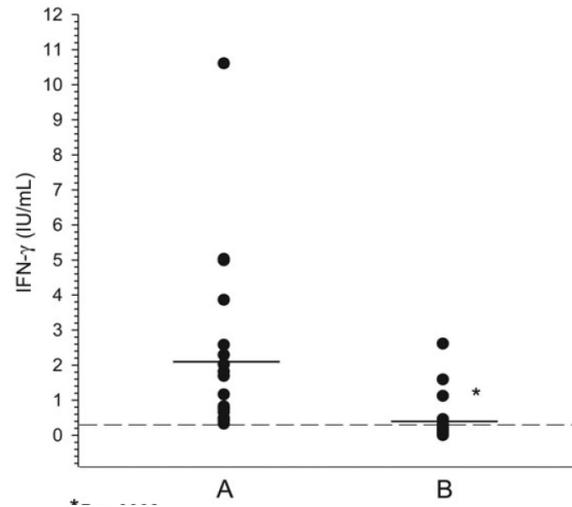
Considerazione 3

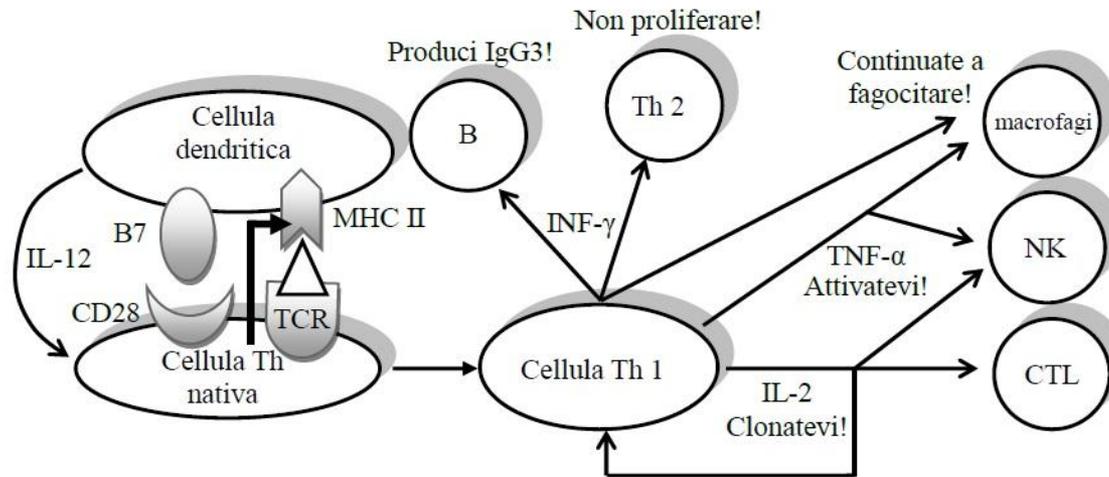
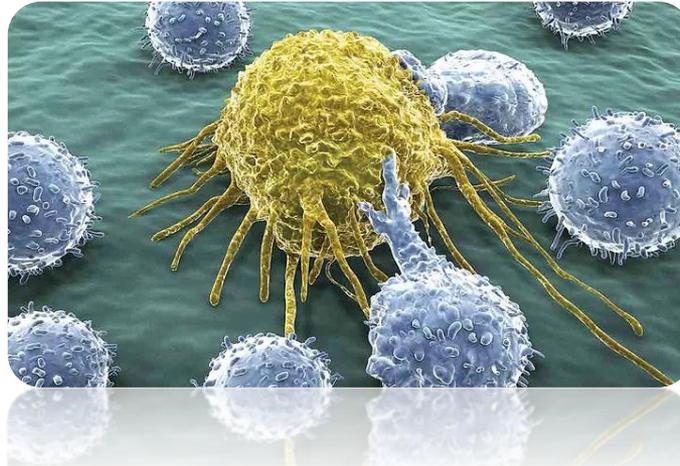
La positività dei test sierologici non discrimina tra infezione latente, attiva o uno stato post-infettivo

Detection of IFN- γ Secretion by T Cells Collected Before and After Successful Treatment of Early Lyme Disease

Steven M. Callister,¹ Dean A. Jobe,¹ Aleksandra Stuparic-Stancic,² Misato Miyamasu,³ Jeff Boyle,³ Raymond J. Dattwyler,^{4,5} and Paul M. Arnaboldi^{4,5}

¹Microbiology Research and Molecular Diagnostics Laboratory, and ²Department of Urgent Care, Gundersen Health System, La Crosse, Wisconsin; ³Qiagen, Inc, Germantown, Maryland; ⁴Biopeptides Corporation, East Setauket, and ⁵Department of Microbiology and Immunology, New York Medical College, Valhalla, New York





take-home message

Segni e sintomi specifici indirizzano
l'esecuzione dei test diagnostici:
la diagnosi di ML è clinica.

La sola positività del test sierologico
non significa ML

take-home message

Scorretta interpretazione dei sintomi può portare talora a non corretta interpretazione dei test di Laboratorio.

Talora pazienti con segni clinici tipici non vengono diagnosticati e non trattati



Grazie per l'attenzione

maurizio.ruscio@asugi.sanita.fvg.it

morsodizecca.it

