

# BORRELIOSI DI LYME

Breve cenno ai metodi diretti nella rilevazione di Borrelia nei campioni clinici.

A cura di:

Serena Bonin

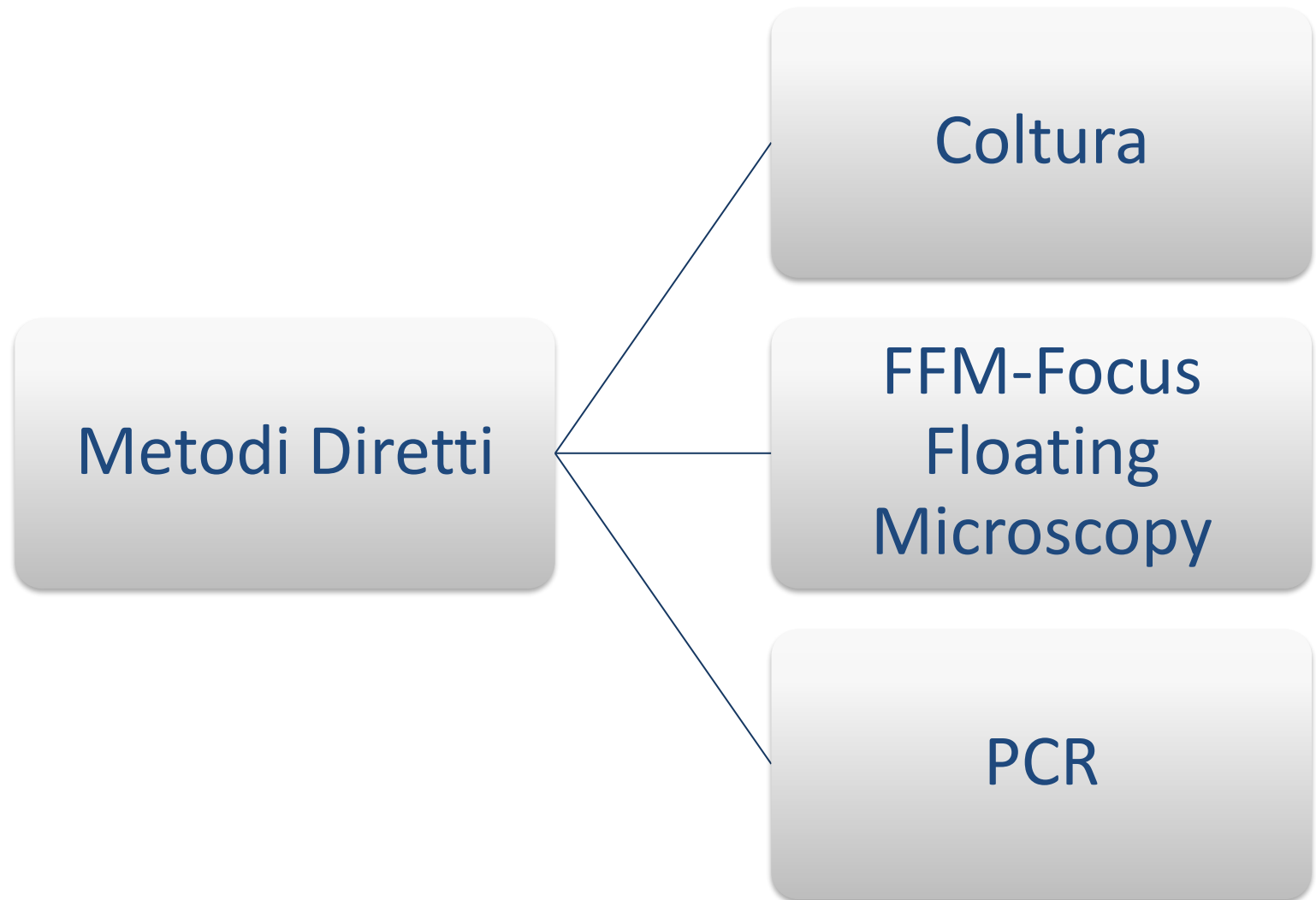
Ricercatrice presso l'Università degli Studi di Trieste

# Diagnosi della malattia di Lyme

Metodi  
diretti

Metodi  
Indiretti

- ✓ **La sierologia è l'unico metodo diagnostico approvato dalla FDA** (Food and Drug Administration) per la diagnosi della malattia di Lyme
- ✓ La rilevazione di *Borrelia* con altri metodi, anche se diretti è confinata a **situazioni specifiche** per chiarire situazione cliniche o sierologiche ambigue
- ✓ Recentemente in Europa sono stati approvati con il **marchio CE-IVD** (European Community marked –in vitro Diagnostic Medical Devices) test PCR per la rilevazione di *Borrelia* in campioni clinici
- ✓ Nessuno è stato approvato dalla FDA



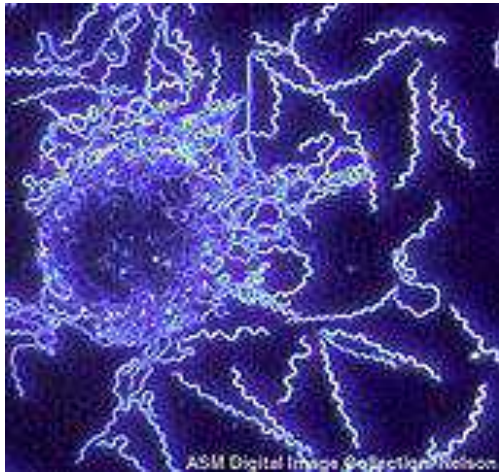
Metodi Diretti

Coltura

FFM-Focus  
Floating  
Microscopy

PCR

## COLTURA



- Campioni clinici in terreno BSK (Barbour-Stoenner-Kelly) o MKP (modified Melly) + 13 ingredienti e siero di coniglio. T= 32° C
- **difficile da coltivare**
- la **prova inconfutabile** dell'agente eziologico della malattia
- **positiva solo per il 25-40% dei casi**
- **lenta ( ~3 settimane)**

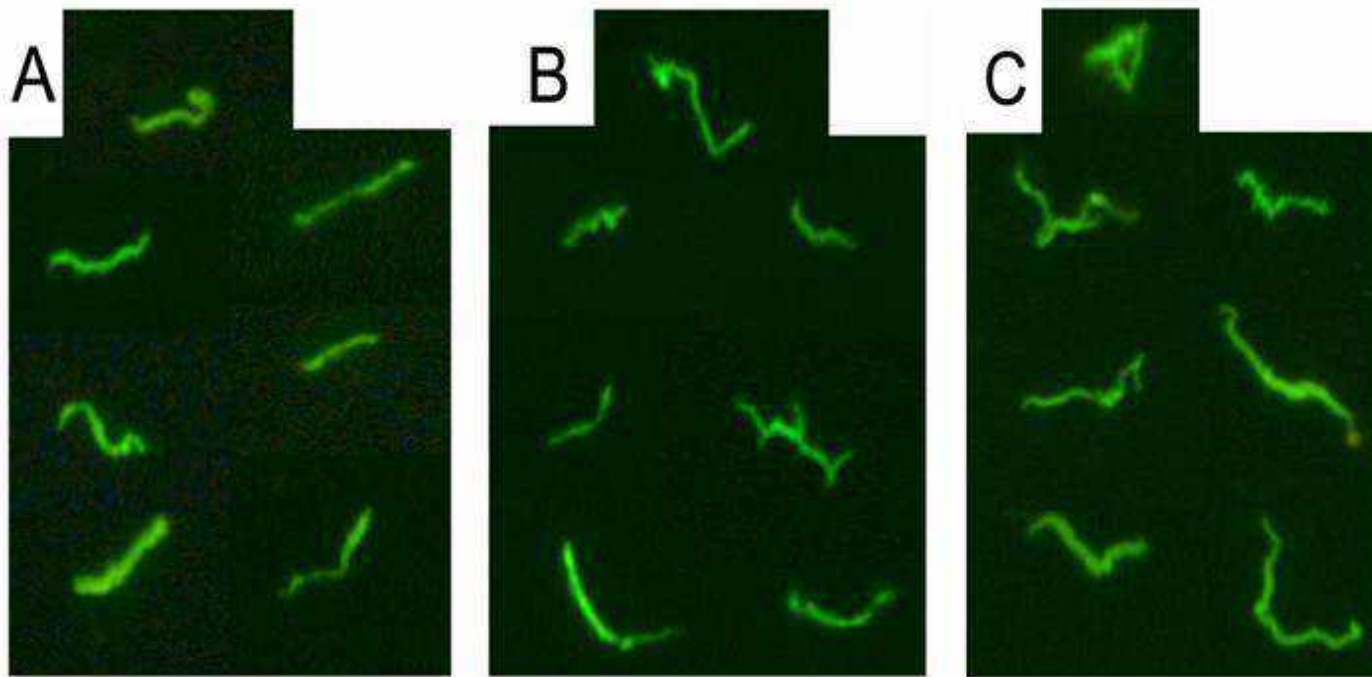
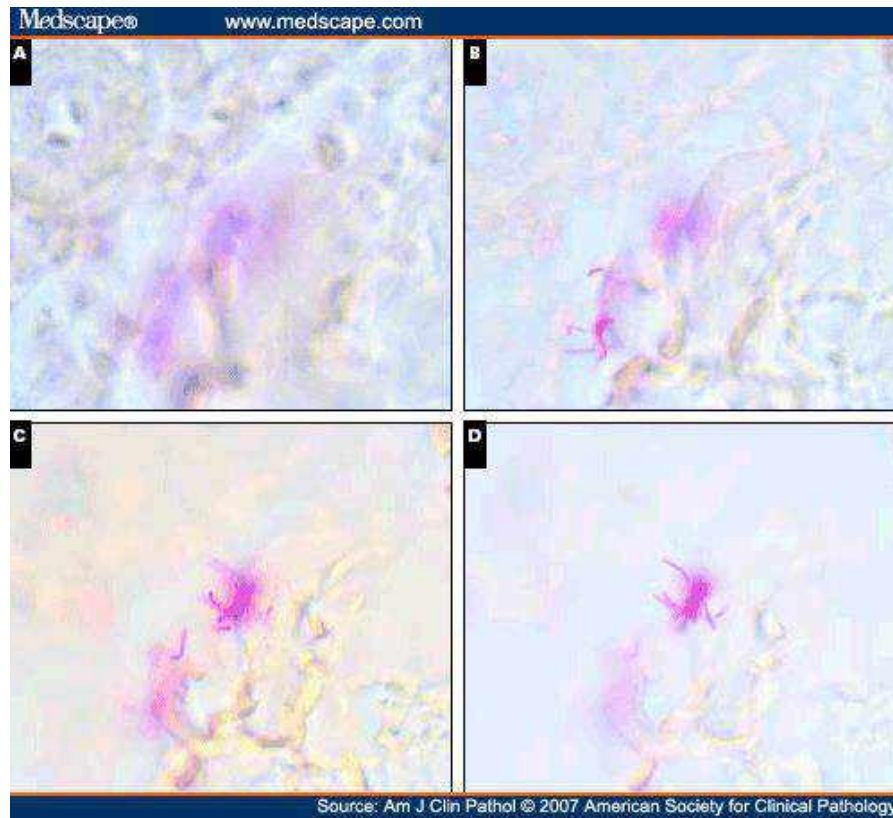


Immagine da: Sapi E et al. Int J Med Sci. 2013; 10(4): 362–376.

### Alternativa:

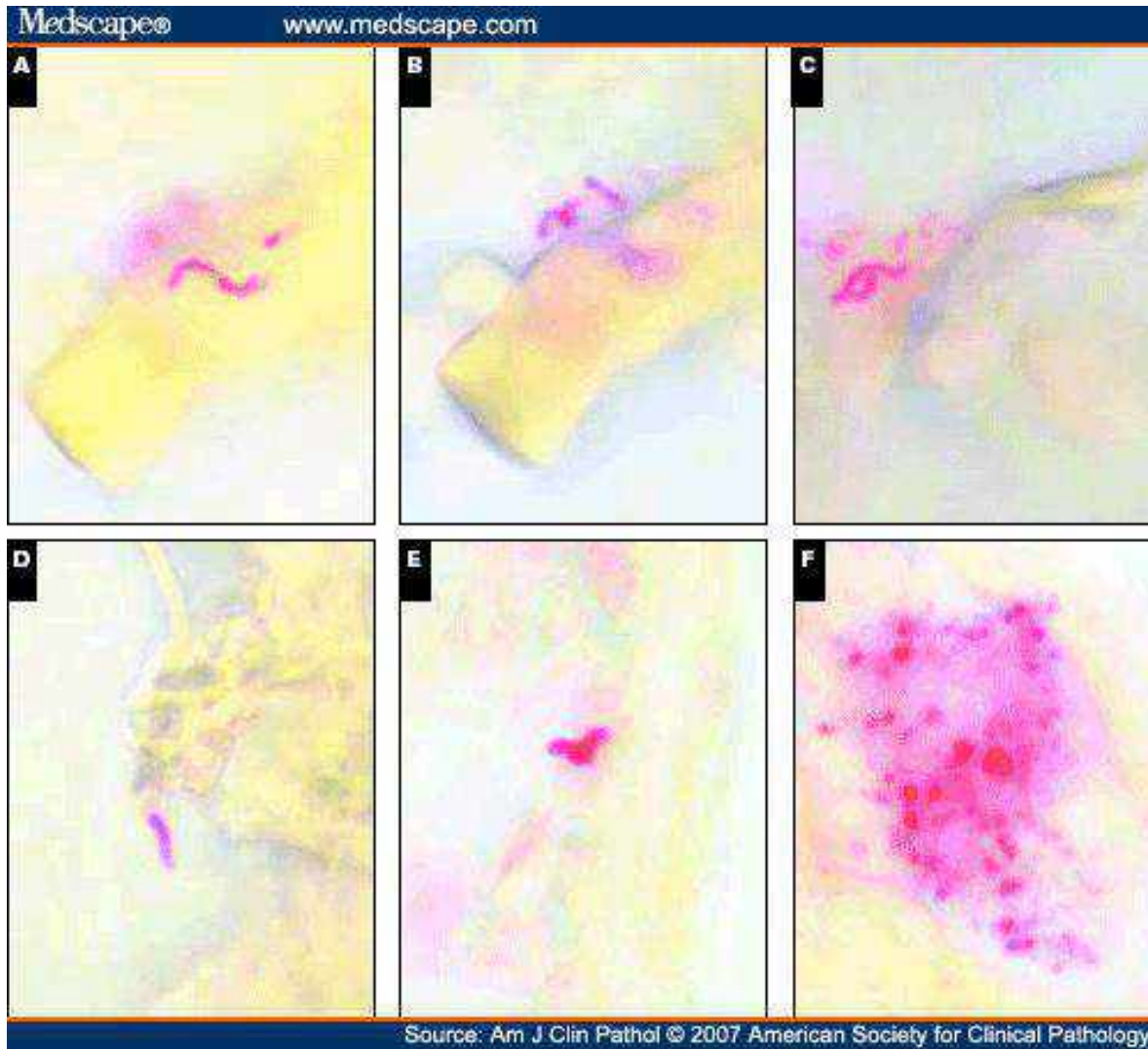
- Campioni clinici pre-arricchiti in coltura
- Rilevazione mediante immunofluorescenza o PCR

# FFM-Focus Floating Microscopy



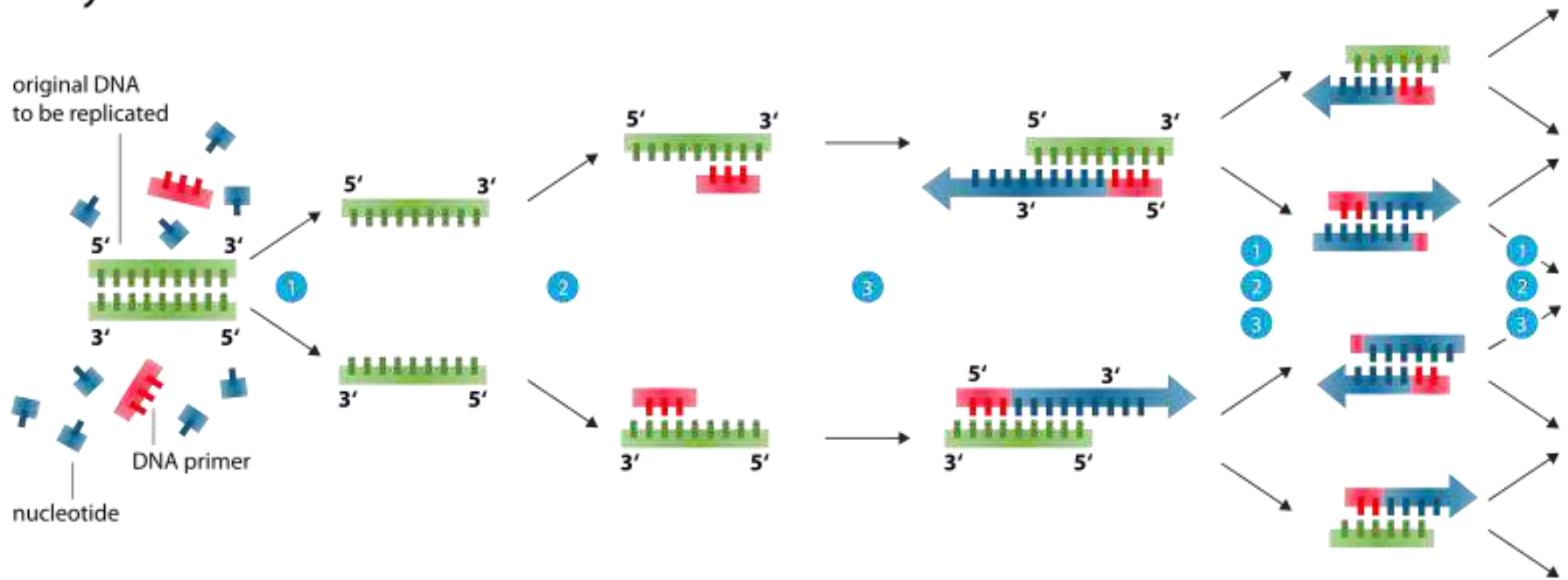
- Ab policlonale contro Borrelia
- Cromogeno intenso
- Omissione della contro-colorazione
- Estrema pazienza

# FFM-Focus Floating Microscopy





# Polymerase chain reaction - PCR



- 1 Denaturation** at 94-96°C
- 2 Annealing** at ~68°C
- 3 Elongation** at ca. 72 °C

Image downloaded from <http://www.socmucimm.org/pcr-polymerase-chain-reaction/>

## PCR

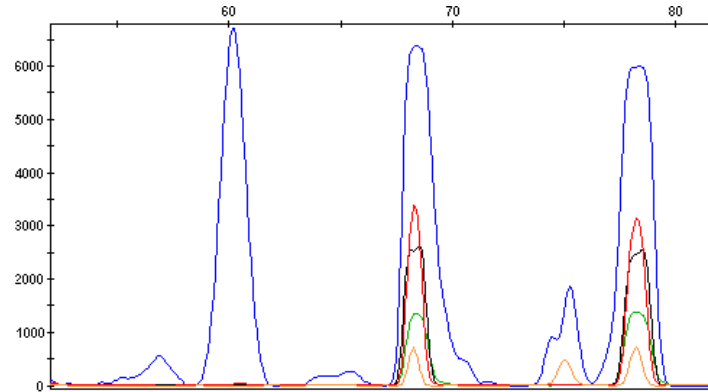
- Molteplicità di materiali di partenza
- Alta sensibilità
- Elevata Specificità
- Veloce in confronto alla coltura
- Versatilità del metodo
  - ↪ Tessuti criopreservati
  - ↪ Tessuti freschi
  - ↪ Tessuti d'archivio
  - ↪ Urine
  - ↪ Sangue periferico
  - ↪ Liquido cefalorachidiano
  - ↪ Liquido sinoviale
  - ↪ Lacrime



- ✓ Sensibilità bassa per piccoli volumi esaminati e paucità di Borrelia  
Saggi di PCR per rilevare Borrelia in CSF, fluido sinoviale e urine richiederebbero maggiori volumi di campione per aumentare la sensibilità del metodo.
- ✓ *La spirochetemia bassa e transiente + tropismo di borrelia per tessuti possono essere una delle cause della PCR negativa nei liquidi*

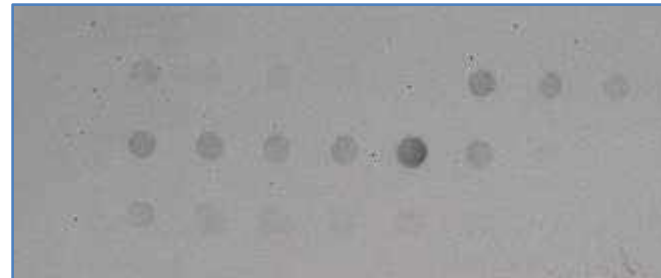
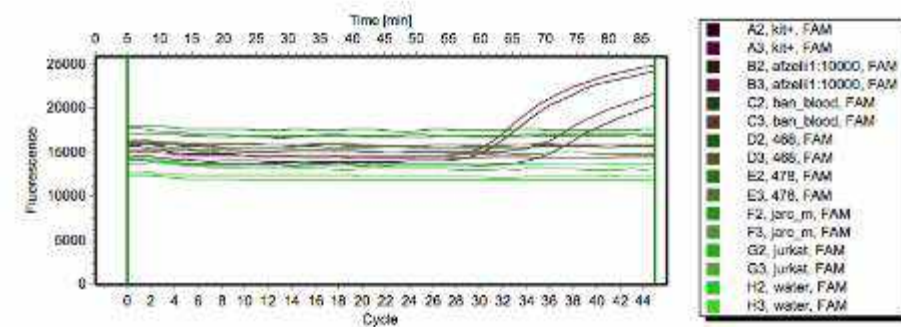
Nonostante l'elevata sensibilità del metodo, una **PCR negativa non esclude la malattia**. Nel sangue infatti la spirochetemia è transiente ed in altri fluidi biologici le spirochete possono non esser presenti in numero sufficiente al momento del prelievo.

## PCR:



- ✓ Variabilità analitica : diversi target, diversi primers, diverse tecniche di rilevazioni, diversi protocolli, diversi campioni di partenza
- ✓ Bassa riproducibilità dei risultati
- ✓ **MANCANZA DI STANDARDIZZAZIONE**

Fluorescence Profile



## PCR:

- Rileva **sequenze** di DNA di Borrelia
- Non distingue fra **organismi vivi e morti**
- **Falsi Positivi** ⇒ Precauzioni operative
- I test di PCR devono esser interpretati considerando sempre il contesto clinico.

## RT-PCR:

- ✓ L'analisi quantitativa dell'mRNA (Flagellina B e 16S rRNA), sembrano essere in relazione alla carica batterica
- ✓ Surrogato per la determinare infezioni attive
- ✓ **Laborioso** e non adatto alle analisi routinarie.

## PCR in house e kit commerciali

- ✓ L'uso di test commerciali è **un'armonizzazione** nella preparazione dei reagenti
- ✓ Necessita confrontare la performance di tali saggi con studi di **validazione dedicati**
- ✓ La PCR in generale nella diagnosi della malattia di Lyme necessita un processo di **standardizzazione** a partire dalle fasi pre-analitiche di isolamento degli acidi nucleici