

Informatii despre diagnosticul de laborator al bolii Lyme

Boala Lyme este in emisfera nordica una dintre cele mai frecvente boli infectioase transmise de capusa.

Agentul patogen: *Borrelia burgdorferi sensu lato (sl)* – un complex de geno-specii dintre care cele mai frecvent intalnite in Europa sunt 3: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii*.

Vectorii sunt capuse din genul *Ixodes*. Date despre aceste capuse si importanta lor in transmiterea la om a bacteriilor din genul *Borrelia* sunt prezentate in materialul “Capusele *Ixodes ricinus* vectori pentru Borrelioza Lyme in Romania” - elaborat in cadrul Laboratorului Entomologie Medicala (vezi mai jos).

Diagnosticul in Boala Lyme este complex si dificil, deoarece necesita coroborarea unor date clinice, epidemiologice si de laborator. Examinarea serologica (serodiagnosticul) este indicat in toate cazurile suspecte de Boala Lyme.

Diagnosticul de laborator se bazeaza in principal pe teste serologice (determinare de anticorpi de tip Ig M si IgG anti *Borrelia*) si se recomanda a fi realizat in doua etape :

- in prima etapa - un test screening cu sensibilitate mare si cu un minimum de specificitate ($\geq 90\%$), de obicei **ELISA**

- in etapa a doua - un test de confirmare, **imunobloting (western blot)** cu un minimum de specificitate de 95%, pentru rezultatele pozitive sau neconcludente la testul ELISA.

Interpretarea rezultatelor testelor serologice trebuie sa se faca intotdeauna in contextul clinic: un rezultat negativ nu exclude existenta infectiei cu *Borrelia burgdorferi*, iar rezultatele pozitive ale unor teste pot pune probleme de diagnostic diferential cu boli infectioase de alte etiologii sau cu boli autoimune.

In complicatiile din stadiile avansate ale bolii (neuroborelioza, cardita, artrita, acrodermatita cronica atrofica - ACA) prezenta IgG este obligatorie, iar in neuroborelioza, demonstrarea producerii intratecale de anticorpi prin determinarea indexului de anticorpi (LCR/ser) este esentiala pentru diagnosticul de laborator .

Utilizarea tehnicilor de biologie moleculara (PCR) si izolarea microorganismului prin cultura se recomanda a fi restransa doar la diagnosticul unor afectiuni cum sunt eritemul migrator, acrodermatita cronica atrofica, artrita Lyme, deoarece rezultatele sunt pozitive pe probe din tesuturi si lichid sinovial in proportie mai mare (50-70%). Detalii vezi mai jos.

In Romania, **activitatea de supraveghere a bolii Lyme este coordonata de CNSCBT din INSP Bucuresti** si se desfasoara conform unei **metodologii de supraveghere**, boala Lyme fiind o boala transmisibila cuprinsa in HG 589/2007, cu raportare pe “fisa unica de raportare in caz de boala transmisibila” in 5 zile de la depistarea cazului suspect/confirmat.

Date clinice

Evolutia bolii este multistadiala:

- **stadiul I** (borrelioza localizata cu manifestari precoce) cu debut la 3-4 zile pana la 6 saptamani: eritemul migrator (EM) si limfocitomu borreliozic (rar, mai ales la copii)

- **stadiul II** (borrelioza diseminata cu manifestari precoce) cu debut de la 6-12 saptamani pana la cateva luni:

- neuroborrelioza acuta- complicatia majora (~10% cazuri), care evolueaza cu : paralizie de nerv facial, meningita limfocitara sau radiculonevrita

- eritem migrator multiplu

- artrita recurenta

- cardita recurenta (tulburari de conducere - bloc AV)

- **stadiul III** (borrelioza diseminata cu manifestari tardive la cei netratati) debut de la cateva luni pana la cativa ani;

- neuroborrelioza cronica (encefalomielita)

- acrodermatita cronica atrofica (ACA)

- artrita Lyme

Diagnostic

Diagnosticul este complex:

In **EM**: diagnosticul este clinic si epidemiologic si presupune existenta m uscaturii de capusa in antecedentele recente, preferabil certificata de un medic si provenienta dintr-o zona endemica pentru boala Lyme

In EM testele de laborator nu sunt necesare. Se pot efectua :

- testare serologica: o prima testare la prima vizita la medic (IgM poate fi pozitiv sau negativ), urmata de o a doua la 3-6 saptamani ;

- cultura din biopsii de tegument pe medii speciale pentru *Borrelia* (nu se recomanda pentru diagnosticul curent)

In **limfocitomu borreliozic**: diagnosticul este clinic in principal, coroborat cu teste de laborator (obligatorii pentru confirmare).

Testele de laborator recomandate sunt:

- teste serologice efectuate pe probe duble de ser la un interval de 3-6 saptamani (IgM trebuie sa fie pozitiv la un titru mare sau sa se observe o crestere in dinamica a titrului IgG sau IgM)

- frotiuri din tesut pentru examen histologic

- cultura din biopsii tegumentare sau PCR (nu se recomanda pentru diagnosticul curent)

In **neuroborrelioza acuta**: diagnosticul este clinic si de laborator (obligatoriu pentru confirmare)

Testele recomandate sunt:

- detectia de anticorpi in probe de ser si lichid cefalorahidian (in lcr anticorpii pot aparea inaintea celor din ser), probe recoltate simultan cu evidentierea producerii intratecale de anticorpi IgM si IgG (cu index de anticorpi)

- detectia de benzi oligoclonale in lcr cu detectie de anticorpi in probe duble de ser, cu modificarea semnificativa in dinamica a titrului de anticorpi

- cultura din lcr (nu se recomanda pentru diagnosticul curent)

In **cardita** : diagnosticul este clinic si de laborator (testele de laborator sunt obligatorii pentru confirmare)

Testele recomandate sunt:

- detectia de anticorpi IgM sau IgG (care sa aiba valori crescute) sau detectia de IgG pe probe duble de ser (cu modificarea semnificativa in dinamica a titrului de anticorpi specifici IgG).

- cultura din biopsii endomiocardice cu vizualizare spirochetelor la microscopul cu camp intunecat sau cu evidentierea lor prin teste de biologie moleculara (PCR)(nu se recomanda in mod curent pentru diagnostic)

In **artrita**: diagnosticul este clinic si de laborator (testele de laborator sunt obligatorii pentru confirmarea diagnosticului)

Testele recomandate sunt:

- teste serologice (anticorpii de tip IgG trebuie sa fie prezenti +++); prezenta numai a IgM nu are valoare diagnostica;

- cultura din lichidul sinovial sau/si tesut cu vizualizarea spirochetelor la microscopul cu camp intunecat, cu evidentierea prezentei lor prin IF sau PCR (nu se recomanda in mod curent pentru diagnostic)

In **ACA**: diagnosticul este clinic si de laborator (testele sunt obligatorii pentru confirmare)

Testele recomandate sunt:

- teste serologice (anticorpii de tip IgG trebuie sa fie prezenti in titru mare)

- examen histologic

- cultura din biopsie tegumentara cu vizualizarea spirochetelor la microscop (foarte rar)

In **neuroborrelioza cronica**: diagnosticul este clinic si de laborator (testele de laborator sunt obligatorii pentru confirmare)

Se urmareste evidentierea:

- pleiocitozei limfocitare in lcr (test non microbiologic)

- demonstrarea productiei intratecale de anticorpi specifici (IgM si IgG prezenti in probe de ser si lcr recoltate simultan)

- IgG specifici in titru crescut in ser

Nivelul seric al anticorpilor poate creste ca urmare a evolutiei bolii sau a instituirii tratamentului antibiotic si poate descreste in cursul procesului de vindecare, de aceea recoltarea probelor biologice trebuie facuta la un interval de minimum 3 luni pentru a observa descresterea nivelului IgG.

Metode de diagnostic de laborator in boala Lyme

I. Metode directe

a) Microscopia in camp intunecat

- fara valoare diagnostica mare datorita numarului mic de spirochete din probele clinice; nu se recomanda pentru diagnosticul curent;
- se utilizeaza in corelatie cu cultura

b) Cultura – este un test de confirmare;

- se utilizeaza in localizarile cutanate ale bolii EM, ACA pe *biopsii de tegument* ;
- are sensibilitate crescuta, in absenta tratamentului; rata pozitivitate ~ 80%; pe probe de sange rata pozitivitate este de 10 -40%
- in localizari extracutanate ale bolii , pe *probe de sange, lcr, lichid sinovial* sensibilitatea este scazuta

Dezavantaje:

- durata mare in timp (1-12 saptamani)
- cresterea lenta
- costurile ridicate
- sensibilitatea scazuta

c) Testele de biologie moleculara (PCR)

- in EM si ACA sensibilitate mai crescuta (aprox 50-60%) pe probe de tegument
- in boala Lyme sensibilitatea este scazuta pe probe de sange (10-18%)
- in neuroborrelioza, pe probe de l.c.r. sensibilitatea este mai buna in forma precoce acuta decat in cea tardiva
- in artrita Lyme, pe lichid sinovial/membrana sinoviala, sensibilitate de aprox. 80%-90%, mai ales la cei netratati
- per ansamblu sensibilitate scazuta

II. Metode indirecte

Detectie de anticorpi in ser si lcr

Teste imunoenzimaticice (ELISA si western blot) → cele mai utilizate

Diagnosticul serologic este utilizat in mod curent in boala Lyme.

In stadiul initial al bolii: predomina IgM, care se poate secreta in toate etapele bolii in absenta tratamentului; tinte antigenice: flagelina (p41), OspC, VlsE, p39

In stadiul II: IgM + IgG predominant; tinte antigenice : p39, p58, p83, VlsE, etc.

In stadiul III: IgG titruri mari; IgM foarte rar detectabil; tinte antigenice: p83/100, p30, p39, p21, p58, p43, Osp17, etc

Dificultatile diagnosticului serologic sunt legate in principal de :

- a) raspunsul imun particular al gazdei in cadrul bolii Lyme
- b) dificultatea dezvoltarii de teste fata de multiplele antigene care se exprima diferentiat in cursul bolii
- c) existenta unor reactii incrucisate ale anticorpilor din boala Lyme cu cei din sifilis, boli autoimune, infectii cu CMV, EBV, etc.
- d) prezenta unui rezultat fals pozitiv pentru IgM in cazul unui factor reumatoid crescut

Atentie !

IgM pot persista luni de zile.

IgG pot persista si dupa remisiunea clinica a bolii.

Exista reactii incrucisate cu alte microorganisme, ceea ce impune un diagnostic diferential cu afectiunile provocate de acestea.

Este foarte importanta interpretarea testelor de laborator in context clinic si epidemiologic!

Algoritmul de diagnostic in boala Lyme recomandat de ECDC, CDC, EUCALB (European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis) precum si de alte organizatii si institutii europene de sanatate publica este un algoritm de diagnostic serologic in “doi pasi” (doua etape): Un test ELISA cu sensibilitate crescuta urmat de un test WB cu specificitate mare pentru IgM si IgG.

Laboratorul Infectii Transmise prin Vectori (ITV) din INCDMI Cantacuzino isi desfasoara activitatea de testare serologica pentru cazurile cu suspiciune de boala Lyme conform recomandarilor ghidurilor IDSA si EUCALB, efectuand o prima testare ELISA (IgM si/ sau IgG) urmata de o a doua testare western blot, in cazul unui rezultat pozitiv sau echivoc la testul ELISA.

Materialul a fost alcatuit de Dr. Daniela Badescu, Sef laborator Infectii cu Transmitere prin Vectori, pe baza recomandarilor ECDC - EUCALB si CDC (Ghidul IDSA „The Clinical Assessment, Treatment, and Prevention of Lyme Disease, Human Granulocytic Anaplasmosis, and Babesiosis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America”), precum si articolului (review) “The epidemiology, prevention, investigation and treatment of Lyme borreliosis in United Kingdom patients: A position statement by the British Infection Association” (accesibil online 21 Martie 2011)

Capusele *Ixodes ricinus* vectori pentru Borrelioza Lyme in Romania

Capusele (Ixodidele) reprezinta acarieni si nu insecte. In Romania sunt prezente aproximativ 25 de specii de capuse din genul *Ixodes*. **Vectorul incriminat in transmiterea Borreliozei Lyme este capusa *Ixodes ricinus***. Aceasta capusa are un areal de raspandire extins in toata Romania (Fig.1)

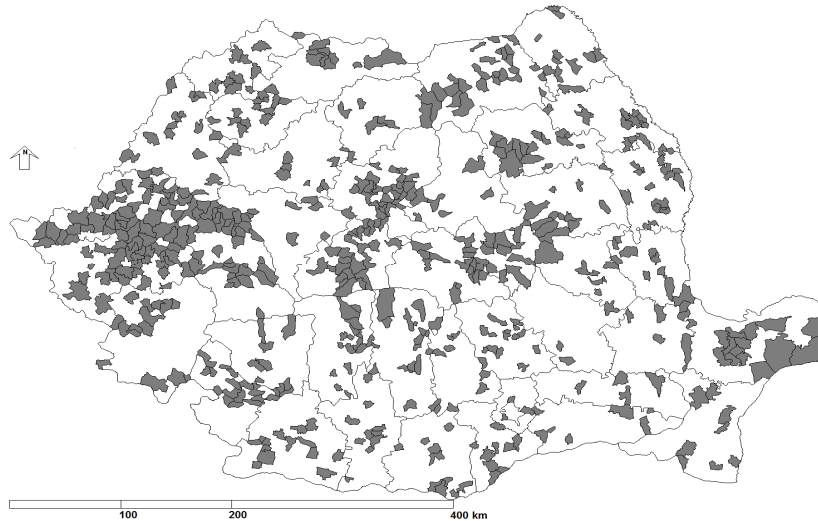


Fig. 1 Harta distributiei speciei *Ixodes ricinus* in Romania
(dupa Coipan EC, Vladimirescu AF, Ciolpan O, Teodorescu I., 2011)

cu predilectie in zona padurilor de foioase si liziera padurilor. Durata de viata a capusei in conditii bazale este de 3 pana la maximum 5 ani. Ciclul de viata cuprinde stadiile: ou (ponta poate fi alcatuita din 15000 oua), larva (de foarte mici dimensiuni), nimfa si adult. Adultii prezinta dimorfism sexual (Fig. 2) si un sex ratio de 8,88 femele : 11,11 masculi.

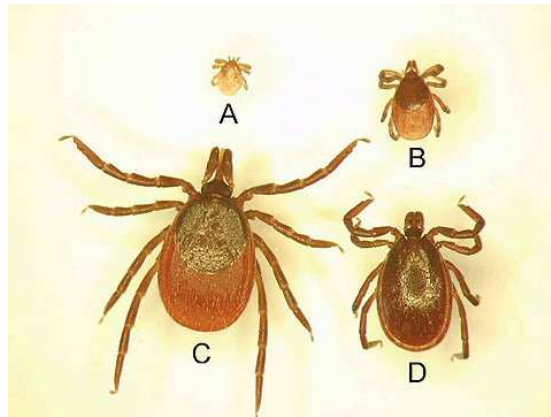


Fig.2 Stadiile de viata ale capusei *Ixodes ricinus* : A = larva, B= nimfa, C= Adult-Femela si D= Adult-Mascul (sursa : internet)

Datorita aspectului general (Fig. 2) *Ixodes ricinus* se poate deosebi destul de usor de alte specii comune: *Dermacentor reticulatus* si *Rhipicephalus sanguineus*, specii care conform datelor de specialitate existente nu transmit bacteria *Borrelia burgdorferi sl.* dar o pot mentine (prima in Europa si ultima in America de Nord).

Stadiile incriminate in transmiterea Borreliozei Lyme sunt: nimfele si adultii. **Nu toate capusele din specia *Ixodes ricinus* contin (sau sunt infectate) cu *Borrelia burgdorferi*** . Din studiile efectuate de noi (Coipan EC & Vladimirescu AF 2011; Exp.Appl Acarol 54:293-300-2011) cca 18,04% din capusele analizate prin metode moleculare (Reverse Line Blotting) au prezentat *B. burgdorferi* sl. O capusa din specia *Ixodes ricinus* infectata poate prezenta concomitent mai multe tulpini (mai precis genospecii de *B.burgdorferi* sl). Genospeciile de *Borrelia burgdorferi* circulante in Romania si puse in evidenta de studiile efectuate de noi (Coipan EC & Vladimirescu AF, 2011; Exp.Appl Acarol 54:293-300-2011) sunt: *Borrelia burgdorferi* ss., *B. afzelii* si *B.garinii*.

In cazul „muscatarii” de capusa este bine ca extragerea ei sa se faca de personal medical, altfel exista riscul ca rostrul acarianului sa ramana infipt in piele si acesta sa cauzeze infectii locale. Este bine ca ixodidul (capusa) extrasa sa fie conservata in alcool (minim 75%) pentru investigatii ulterioare: stabilire specie, grad hranire, continut de *Borrelia*, etc) si sa se noteze in calendar data cand a fost semnalata prezenta acesteia.

Metodele individuale de protectie sunt folosirea de repelenti pe baza de DEET (Diethyl Toluamida), eventual insecticide administrate pe exterioriul hainelor, purtarea unor haine si incaltaminte corespunzatoare activitatii desfasurate in aer liber respectiv activitati recreative in padure.

Capusele *Ixodes ricinus* inregistreaza in Romania doua varfuri de activitate si anume: un maxim numeric **primavara (Martie-Mai)** si un al doilea de mai mica intensitate **toamna (Septembrie –Noiembrie)**.

Rasandirea capusei *Ixodes ricinus* depinde de factori precum temperatura si umiditatea, factori care coroborati cu permanenta supraveghere a populatiilor de *Ixodes ricinus* conduc la elaborarea unor harti de risc. O astfel de harta este cea generata de noi (Coipan E, Teza Doctorat Universitatea Bucuresti 2010) pentru Romania pe baza gradului de acoperire cu habitate preferentiale pentru ixodide si pe baza ponderii populatiei cu risc ocupational (vanatori, muncitori forestieri, soldati, agricultori, ghizi turistici, etc. (Fig. 3)

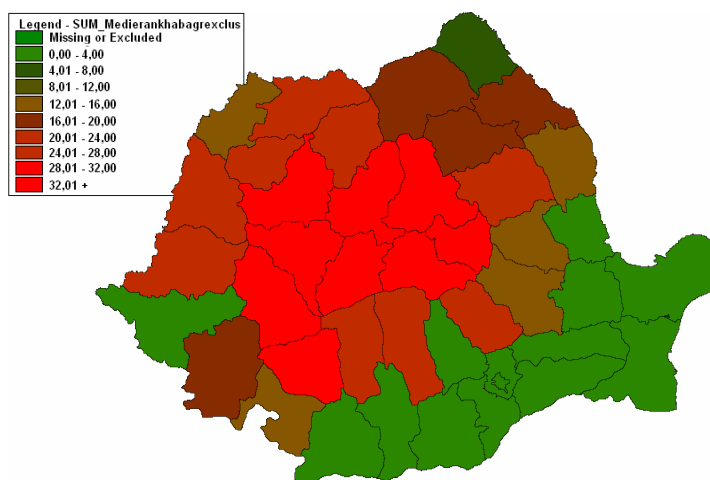


Fig. 3 Harta de risc pentru contactul om-ixodide pe baza gradului de acoperire cu habitate adecvate ixodidelor și a ponderii populației cu risc ocupațional : cu rosu deschis sunt marcate zonele de risc maxim iar cele cu verde reprezinta zonele cu risc minim (dupa Coipan E 2010 - Teza de Doctorat)

Materialul a fost alcatuit de Dr. Biol. Al. Vladimirescu, Sef colectiv Entomologie Medicala