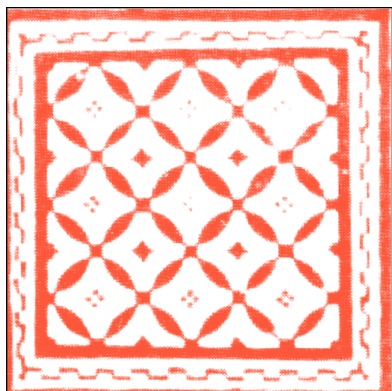


Caleidoscopio

Italiano



Serie Mosaici Romani

Marina Cinco

La Borreliosi di Lyme

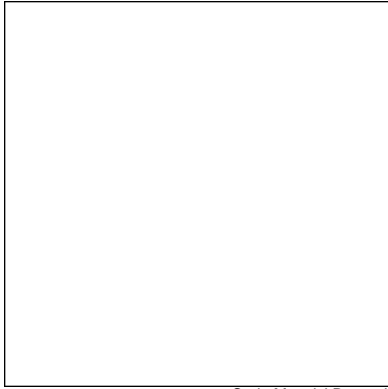
Direttore Responsabile
Sergio Rassu



Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1998

Caleidoscopio

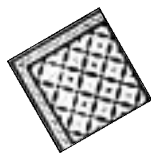
Italiano



Serie Mosaici Romani

Marina Cinco

*Dipartimento di Scienze Biomediche,
Sez. Microbiologia
Università Trieste*



La Borreliosi di Lyme



Direttore Responsabile
Sergio Rassa



Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1998

ISTRUZIONI PER GLI AUTORI

INFORMAZIONI GENERALI. *Caleidoscopio* pubblica lavori di carattere monografico a scopo didattico su temi di Medicina. La rivista segue i requisiti consigliati dall'*International Committee of Medical Journal Editors*. Gli Autori vengono invitati dal Direttore Responsabile. La rivista pubblica anche monografie libere, proposte direttamente dagli Autori, redatte secondo le regole della Collana.

TESTO. La monografia deve essere articolata in paragrafi snelli, di rapida consultazione, completi e chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati. E' opportuno evitare di riportare proprie opinioni dando un quadro limitato delle problematiche. La lunghezza del testo può variare dalle 60 alle 70 cartelle dattiloscritte. Si prega di dattilografare su una sola facciata del foglio formato A4 con margini di almeno 25 mm. Usare dovunque doppi spazi e numerare consecutivamente. Ogni sezione dovrebbe iniziare con una nuova pagina.

FRONTESPIZIO. Deve riportare il nome e cognome dell'Autore(i) -non più di cinque- il titolo del volume, conciso ma informativo, la Clinica o Istituto cui dovrebbe essere attribuito il lavoro, l'indirizzo, il nome e l'indirizzo dell'Autore (compreso telefono, fax ed indirizzo di E-mail) responsabile della corrispondenza.

BIBLIOGRAFIA. Deve essere scritta su fogli a parte secondo ordine alfabetico seguendo le abbreviazioni per le Riviste dell'Index Medicus e lo stile illustrato negli esempi:

1) Björklund B., Björklund V.: Proliferation marker concept with TPS as a model. A preliminary report. *J. Nucl. Med. Allied. Sci* 1990 Oct-Dec, VOL: 34 (4 Suppl), P: 203.

2 Jeffcoate S.L. e Hutchinson J.S.M. (Eds): *The Endocrine Hypothalamus*. London. Academic Press, 1978.

Le citazioni bibliografiche vanno individuate nel testo, nelle tabelle e nelle legende con numeri arabi tra parentesi. La Redazione è collegata on-line con le più importanti Banche Dati (Medline, Cancerlit, AIDS etc) e fornisce ogni eventuale assistenza agli Autori.

TABELLE E FIGURE. Si consiglia una ricca documentazione iconografica (in bianco e nero eccetto casi particolare da concordare). Figure e tabelle devono essere numerate consecutivamente (secondo l'ordine di citazione nel testo) e separatamente; sul retro delle figure deve essere indicato l'orientamento, il nome dell'Autore ed il numero. Le figure realizzate professionalmente; è inaccettabile la riproduzione di caratteri scritti a mano libera. Lettere, numeri e simboli dovrebbero essere chiari ovunque e di dimensioni tali che, se ridotti, risultino ancora leggibili. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro e dell'autorizzazione alla pubblicazione di figure o altro. Titoli e spiegazioni dettagliate appartengono alle legende, non alle figure stesse.

Su fogli a parte devono essere riportate le legende per le figure e le tabelle.

UNITÀ DI MISURA. Per le unità di misura utilizzare il sistema metrico decimale o loro multipli e nei termini dell'International system of units (SI).

ABBREVIAZIONI. Utilizzare solo abbreviazioni standard. Il termine completo dovrebbe precedere nel testo la sua abbreviazione, a meno che non sia un'unità di misura standard.

PRESENTAZIONE DELLA MONOGRAFIA. Riporre le fotografie in busta separata, una copia del testo e dei grafici archiviati su un dischetto da 3.5 pollici preferibilmente Macintosh.

Il dattiloscritto originale, le figure, le tabelle, il dischetto, posti in busta di carta pesante, devono essere spediti al Direttore Responsabile con lettera di accompagnamento. L'autore dovrebbe conservare una copia a proprio uso. Dopo la valutazione espressa dal Direttore Responsabile, la decisione sulla eventuale accettazione del lavoro sarà tempestivamente comunicata all'Autore. Il Direttore responsabile deciderà sul tempo della pubblicazione e conserverà il diritto usuale di modificare lo stile del contributo; più importanti modifiche verranno eventualmente fatte in accordo con l'Autore. I manoscritti e le fotografie se non pubblicati non si restituiscono.

L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituirle al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cinquanta copie della monografia. Inoltre l'Autore avrà l'opportunità di presentare la monografia nella propria città o in altra sede nel corso di una serata speciale.

L'Autore della monografia cede i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera alla Rivista *Caleidoscopio* con diritto di stampare, pubblicare, dare licenza a tradurre in altre lingue in Nazioni diverse rinunciando ai diritti d'Autore.

Tutta la corrispondenza deve essere indirizzata al Direttore Responsabile al seguente indirizzo:

**Dott. Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari**

Editoriale

La malattia di Lyme è stata riconosciuta per la prima volta negli Stati Uniti nel 1975 dopo la misteriosa diffusione di artrite vicino a Lyme nello Stato del Connecticut. In realtà la malattia è stata descritta da oltre cento anni nella letteratura Europea.

Comunque, solo dopo il 1975 le segnalazioni di malattia di Lyme sono aumentate drammaticamente, soprattutto in alcune aree degli Stati Uniti, tanto da diventare un importante problema sanitario.

La malattia è causata da una spirocheta, quindi da un batterio, a forma di cavaturacciolo, che viene trasmesso all'uomo da un acaro del genere degli Ixodi mentre si alimenta dopo aver inserito la parte buccale nella cute dell'uomo, nell'arco di diversi giorni.

La trasmissione all'uomo di questi acari avviene direttamente dall'erba o attraverso gli animali. Una volta che compaiono i sintomi la diagnosi è difficile, perché i segni ed i sintomi sono comuni a molte altre malattie (infezioni virali, artrite reumatoide, sclerosi multipla), ma estremamente importante perché l'impostazione di una corretta terapia antibiotica porta ad una rapida guarigione.

Conoscere la è quindi fondamentale per poterla sospettare e per scrivere su questo argomento abbiamo invitato una esperta che, tra l'altro nel 1986 ha raggiunto l'isolamento del primo ceppo italiano da *I. ricinus*, nell'area triestina. La Prof. Marina Cinco dopo la

Laurea in Scienze Biologiche, conseguita presso l'Università di Trieste ha svolto una intensa attività di ricerca, svolta nell'arco di un trentennio e descritta in più di 150 pubblicazioni articolate e più di 1500 comunicazioni e poster presentati a congressi sia come partecipante che come "invited speaker", è stata dedicata principalmente allo studio delle Spirochete: Leptospire e, più recentemente, *Borrelia burgdorferi*. In questo settore, notevole spazio, è stato dedicato anche alla messa a punto di tests serologici, soprattutto il Western Blot, adeguati alla complessa serologia di questa infezione, collaborando, in tal senso, con i principali reparti Ospedalieri della regione, quali la Clinica Dermatologica dell'Università di Trieste ed il laboratorio di Analisi Cliniche dell'Ospedale di Gemona del Friuli. È stata, tra l'altro, tra i soci fondatori del Gruppo Italiano di Studio sulla Malattia di Lyme, nel 1989. Attualmente è Professore associato docente di Microbiologia e del Corso di Microbiologia Applicata in Facoltà di Farmacia.

La Prof. Cinco è Member of The International Taxonomical Committee, Subcommittee on Leptospira (IUMS member), qualifica che viene conferita ad esperti che, oltre ad aver lavorato attivamente nel settore, hanno un Laboratorio Internazionale di Riferimento (nel caso specifico, Leptospira Reference Laboratory).

È inoltre Consulente WHO (World Health Organization) per problemi inerenti alla Leptosirosi, Consulente della CEE per la valutazione di proposte di ricerca facenti capo al programma "Science and Technology for Development", Consulente del Ministero della Sanità per problemi inerenti alla leptosirosi e borreliosi di Lyme e Consulente per la Regione Friuli-Venezia Giulia, sullo Stato della malattia di Lyme.

Prefazione

La scoperta dell'agente della cosiddetta "artrite di Lyme" e sindromi correlate, avvenuta all'inizio degli anni 80', costituisce un esempio molto significativo di quanto veloce possa essere l'accumulo di dati e di scoperte nel campo della Microbiologia, per cui prima ancora di caratterizzare *Borrelia burgdorferi* dal punto di vista fenotipico, essa è stata "radiografata" su base genetica.

E' per questo che ho esitato a lungo nello scrivere qualsiasi documento monografico in proposito temendo che, finito un capitolo questo, nel giro di pochi mesi risultasse superato.

Ora che la fisionomia di questa interessante spirocheta si sta delineando e che disponiamo di sufficienti strumenti per localizzarla, ho accettato l'invito dell'Editore a scrivere sulla borreliosi di Lyme; ho dedicato anche un capitolo ai primi risultati che, faticosamente, si stanno raccogliendo sulla diffusione di questa malattia in Italia.

Trieste, Dicembre, 1997

Capitolo 1 - Cenni storici

La storia della borreliosi di Lyme (BL) inizia nel 1975, nell'omonima cittadina di Old Lyme, sulla sponda del fiume Connecticut, in seguito alla segnalazione, da parte di due madri, di una epidemia di artrite giovanile, che aveva colpito i loro figli, e numerosi altri bambini di Lyme, Old Lyme ed East Haddam, con un'insolita frequenza (Steere A., 1977). L'agente eziologico, un batterio, fu appena individuato nel 1982, per caso. Infatti una spedizione di parassitologi, inviata nel New England dal Rocky Mountains Laboratory, per raccogliere zecche del genere *Dermacentor*, a causa di una epidemia di Febbre delle Montagne Rocciose, non avendo trovato alcun esemplare di *Dermacentor*, raccolse zecche del genere *Ixodes*, specie *Ixodes scapularis*. Dall'intestino di questi esemplari Willy Burgdorfer presso il Rocky Mountains Laboratory, isolò una spirocheta (Burgdorfer W., 1982); tale spirocheta venne successivamente identificata come appartenente al genere *Borrelia*, cui, dal nome del suo scopritore, venne dato il nome di *Borrelia burgdorferi*.

In realtà casi di malattia di Lyme, nelle sue multiformi espressioni cliniche di eritema circolare, meningite linfocitaria ed acrodermatite cronica atrofica, era già conosciuta in Europa fin dalla fine del 1800 ed all'inizio del 1900, come pure era stata segnalata la presenza di elementi spirocheta simili nell'eritema cronico migrante (Afzelius A., 1910; Buchwald A., 1883; Bannwarth A., 1941).

L'agente della Malattia di Lyme: *Borrelia burgdorferi*

L'agente infettante della BL, è una spirocheta appartenente all'ordine *Spirochaetales*,* genere *Borrelia*, superspecie *Borrelia burgdorferi* (B.b.).

Morfologicamente tale batterio è molto simile ai Treponemi, dai quali si distingue per l'assenza dei tubuli intracitoplasmatici e guaina periflagellare.

*L'ordine Spirochaetales è uno degli 11 phyla batterici: esso è stato distinto in due famiglie rispettivamente le Leptospiraceae e le Spirochaetaceae. Le leptospiraceae comprendono i tre generi *Leptospira*, *Leptonema* e *Turneria*, le Spirochaetaceae i generi saprofiti *Spirochaeta* e *Cristispira*, il genere *Treponema* composto sia da ceppi saprofiti che patogeni ed infine i generi comprendenti esclusivamente microorganismi patogeni *Serpulina* e *Borrelia*. Quest'ultimo veniva in origine classificato in base all'artropode vettore, ora su base esclusivamente genetica.

Al microscopio elettronico presenta la tipica forma a spirale (Fig. 1), avente tutte le caratteristiche delle spirochete, quali l'esigua dimensione dello spessore, la morfologia spiralata, la presenza di endoflagelli e l'estrema labilità ai fattori ambientali, si distingue dalle altre spirochete per le caratteristiche descritte in tabella 1.

Per quanto concerne il **metabolismo**, *B.burgdorferi* è un batterio microaerofilo, con un doubling time di circa 16 ore, superossidodismutasi positivo, catalasi e perossidasi negativo. La **coltivazione** di *B.b.* si è resa possibile in vitro (prima veniva impiegato il topino), a partire dal 1981, in seguito alla preparazione del terreno BSK, un medium molto ricco, contenente tutti gli aminoacidi, vitamine, N-acetilglucosamina, siero di coniglio, etc.

Il **genoma** di *B.b.* presenta un'organizzazione peculiare, che appare unica nell'ambito dei procarioti. Esso infatti si articola in un cromosoma di circa 1000 kilobasi, lineare anzichè circolare (Baril C., 1989) ed in un microcosmo di plasmidi, alcuni dei quali sono lineari, altri circolari (Fig. 2). Uno di questi,

Lunghezza del corpo batterico	7-24 mm
Larghezza	0.20-0.50 mm
Passo dell'elica	1.7-3.3 mm
N° flagelli	7-12
Tubuli citoplasmatici	assenti

Tabella 1. Caratteristiche del batterio della BL.



Figura 1. Borrelia burgdorferi, ceppo Nancy, isolato a Trieste. Microscopia elettronica a scansione ed B. burgdorferi colorata con l'impregnazione argentica (Metodo di Fontana Tribondeau).

il plasmide lineare a 49 Kd, codifica per proteine di superficie immunodominanti, le OspA e le OspB; altri plasmidi più piccoli, di tipo circolare, di 8 Kd, sembrano correlati con la virulenza di *B.burgdorferi*, e vengono perduti nel corso della coltivazione in vitro.

Il **genoma** di *B.burgdorferi* è stato recentemente sequenziato (Fraser, C.M. 1997). Esso contiene 853 geni codificanti per un set di proteine di base per la replica del DNA, trascrizione, translazione, trasporto dei soluti e metabolismo energetico, ma similmente a *Mycoplasma genitalium* non contiene geni per le reazioni biosintetiche. Ciò spiegherebbe le enormi richieste di nutrienti preformati di queste spirochete.

Pochi geni, tra quelli conosciuti, sarebbero connessi con la virulenza, e le interazioni con l'ospite, situazione alquanto rara rispetto agli altri Eubatteri. Un ruolo importante in tal senso avrebbero tuttavia i 17 plasmidi reperiti, che sarebbero responsabili delle variazioni antigeniche e quindi dell'evasione rispetto al sistema immunitario.

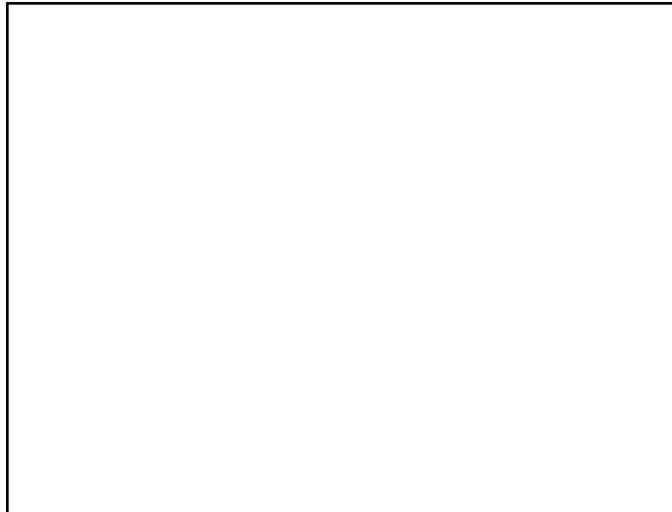


Figura 2. Genoma di *Borrelia burgdorferi*. Cromosoma lineare e plasmidi.

Classificazione di *B. burgdorferi*

La specie *B.b.*, considerata inizialmente monospecifica, a seguito dell'isolamento di innumerevoli ceppi, sia dall'uomo, che dai vettori, che dagli animali riserva in quattro continenti (emisfero australe), si è rivelata notevolmente eterogenea. La tassonomia di questo microorganismo è basata sul

genotipo. Mediante l'impiego di innumerevoli metodiche impiegate nella genetica dei batteri, quali analisi comparata dei profili di restrizione del genoma, ribotyping, PCR di sequenze altamente specie specifiche, etc., all'interno delle superspecie *Borrelia burgdorferi* sensu lato, sono state descritte almeno 9 **genospecie** (Barbour A., 1996; Le Fleche A., 1997). Queste, riportate in Tab.2, si distinguono, oltre che per caratteristiche genetiche, anche per l'assetto antigenico di superficie, la distribuzione geografica ed il vettore, la coltivabilità: la nuova specie *B. lonestari* infatti non è affatto coltivabile. Esiste inoltre una diversa potenzialità patogenetica: soltanto *B.burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* e *B. afzelii* si sono rivelate responsabili di patologie per l'uomo e, probabilmente con un diverso tropismo, come indicato in Tabella 2.

Come si può vedere *Borrelia burgdorferi* è un batterio estremamente eterogeneo, e probabilmente altre specie verranno ad aggiungersi a queste finora identificate. In Tabella 2 vengono riportate le sequenze marker "signature" per ogni genospecie, identificate dopo sequenziamento del gene *rrs* (Le Fleche, 1997). E' particolarmente evidente la diversa potenzialità di

Specie	Vettore	Distribuzione	Sintomatologia prevalente
B.b. sensu stricto	<i>I. scapularis</i>	USA	artrite, forme disseminate
B. andersoni gruppo DN 127	<i>I. ricinus</i>	EURASIA	
	<i>I. dentatus</i>	USA	
	<i>I. neotomae</i>	USA	
B. lonestari	<i>Amblyoma americanum</i>	USA	
B. garinii	<i>I. ricinus</i>	EURASIA	
	<i>I. persulcatus</i>	ASIA	neuroborreliosi
B. afzelii	<i>I. ricinus</i>	EURASIA	forme localizzate, ACA,
	<i>I. persulcatus</i>	ASIA	neuroborreliosi
B.lusitaniae (ex gruppo POTIB2)	<i>I. ricinus</i>	EUROPA	
B.valaisiana (ex gruppo VS116)	<i>I. ricinus</i>	EUROPA	ACA ?*
B. japonica	<i>I. ovatus</i>	GIAPPONE	
* Evidenziata mediante PCR.			

Tabella 2. Principali specie di *Borrelia burgdorferi*, distribuzione, vettore e sintomatologia clinica prevalente nell'uomo.

diffusione geografica, delle varie specie: mentre negli Stati Uniti infatti *B.b. sensu stricto* appare l'unica responsabile dell'infezione nell'uomo, ben tre specie *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. b. sensu stricto* e forse *B. valaisiana* sono risultate responsabili della BL in Europa ed Asia. E' stato ipotizzato, in seguito a studi filogenetici (tabella 3) basati sulla percentuale di similarità di sequenze di DNA per l'rRNA subunità 16S nelle diverse specie, che l'infezione da *B.burgdorferi* sia comparsa dapprima in Europa, evolvendosi nelle diverse specie e successivamente, e soltanto la specie *B.b. sensu stricto*, si sia trasmessa nel continente americano.*

Nell'ambito delle genospecie più note (*B.burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* e *B. afzelii*), sono inoltre stati identificati **serotipi**, sulla base della diversa distribuzione delle proteine immunodominanti di superficie *OspA*, *OspB* e *OspC* (Wilske B. et al.,1993). E' stato osservato che, alcuni serotipi erano prevalenti in una determinata specie: ad esempio il serotipo *OspA 1* è tipico della specie *B. b. sensu stricto*, il serotipo *OspA 2* è tipico di *B.afzelii*; ancora più interessante notare che ad un dato serotipo corrisponde, con maggiore frequenza, un determinato ospite in natura. Così ad esempio il serotipo *OspA 6* di *B. garinii* si trova quasi esclusivamente nell'ospite *Ixodes ricinus*.

Antigeni immunodominanti di *Borrelia burgdorferi*

A differenza delle altre specie di *Borrelia*, altamente instabili dal punto di vista antigenico, *Borrelia burgdorferi* presenta un assetto antigenico relativamente stabile, dotato tuttavia di una certa eterogeneità che si esprime a livello di genospecie ed anche intragenospecie. La conoscenza di tali antigeni viene utilizzata sia nell'identificazione fenotipica della specie, che nella diagnosi indiretta. Mediante separazione su gel di poliacrilamide sono stati individuati i seguenti antigeni in *B.b.*

- ° **P14:** L'antigene p14 è una proteina di superficie del peso molecolare di 14 Kda il cui ruolo immunogenico è dubbio.

- ° **p17-p18:** queste proteine, considerate antigeni immunodominanti vengono espresse dal batterio in bassa quantità (Zoller L., 1993). Alcuni autori considerano l'antigene p17 come un frammento antigenico della lipoproteina *OspB*, infatti entrambi gli antigeni, a seguito di clonazione ed espressione, appaiono derivare da uno stesso gene.

- ° **Osp C:** Le *OspC* sono un complesso di lipoproteine di superficie associate alla membrana esterna, il cui peso molecolare è compreso tra i 21 Kda e i 24 Kda. Il gene codificante per le proteine è su un plasmide circolare di 27 Kda. Tale gene è stato clonato e sequenziato e la sua analisi molecolare ha evidenziato una considerevole eterogeneità (Canica M., et al. 1993). L'espressione delle *OspC* è risultata essere molto instabile, ad esempio possono non essere espresse in cultura e nel passaggio vivo/vitro. Alcuni

* Tale evoluzione sembra, secondo recenti dati, essersi svolta al contrario, ossia dall'America all'Europa.

Borrelia species (strain)	% sequence similarity																
	DK7	LIPITZ	PBi	DK27	DK1	DK21	HO14	DN127	21038	PotiB1	PotiB2	PotiB3	Ir345	BR41	VSI116	UK	Am501
B. burgdorferi ss																	
(DK7)	100	99,8	99	99,2	98,6	98,7	95,8	96,8	97,7	99	99,1	99	99,2	99,2	98,8	98,7	98,9
(Lipitz)		100	99,2	99,4	98,8	98,9	96	97	98	99,2	99,3	99,2	99,4	99	98,9	99	
B. garinii			100														
(PBi)				99,6	98,7	98,8	95,7	96,6	97,4	99,2	99,3	99,2	99,4	99,4	99	98,9	99,1
(DK27)				100	98,8	98,9	95,9	96,9	97,7	99,5	99,6	99,5	99,7	99,7	99,1	99	99,2
B. afzelii																	
(DK1)					100	99,8	95,7	96,1	97,8	98,9	98,8	98,9	98,9	98,9	98,2	99,1	99,3
(DK21)					100	100	95,7	96,2	97,8	99	98,9	99	99	99	99,2	99,2	99,4
B. japonica																	
(HO14)							100	97,6	95,3	95,8	95,9	95,8	96	96	95,5	95,4	95,4
Geno DN127								100	95,4	96,6	96,7	96,6	96,8	96,8	96,2	96,1	96,4
(DN127)																	
B. anderssonii																	
(21308)									100	97,8	97,7	97,7	97,8	97,8	97,6	97,5	97,8
B. lusitanae																	
(PotiB1)										100	99,9	100	99,9	99,9	99,1	99	99,3
(PotiB2)											100	99,9	99,9	99,9	99	99	99,2
(PotiB3)												100	99,9	99,9	99,1	99	99,3
(Ir345)													100	100	99,1	99	99,3
(BR41)														100	99,1	99	99,3
B. valaisiana																	
(VSI116)															100	99,7	99,8
(UK)																100	99,7
(Am501)																	100

Tabella 3. Valori percentuali di similarità genetica tra le specie di *B. burgdorferi* (Le Fleche et al, 1997).

esperimenti eseguiti in vitro hanno evidenziato che l'espressione delle *OspC* è indotta da un incremento di temperatura in quanto esse compaiono passando dai 24°C ai 35°C. Tale induzione si manifesta in vivo, infatti è stato dimostrato che nella zecca infetta, la proteina viene sintetizzata al termine del pasto quando è avvenuto il contatto con il sangue del mammifero ospite.

Le *OspC* evocano una risposta precoce (IgM), specie nel caso di ECM (eritema cronico migrante) e meningite. La risposta umorale contro tali antigeni è altamente specifica, il che li qualifica come markers dell'infezione.

- **Osp E ed Osp F:** Queste sono delle lipoproteine esposte alla superficie di *B.b.* di rispettivamente 19 e 26.1 Kd, codificate da un operone policistronico localizzato su un plasmide di 45 Kb. I geni di *OspE* ed *OspF* sono arrangiati in tandem sotto forma di un'unica unità trascrizionale, sotto il controllo di un comune promotore.

- **Osp D:** E' una lipoproteina di superficie. Il gene per *OspD* è localizzato su un plasmide lineare di 38 Kb e codifica per una proteina la cui massa è di 28 Kda essa viene espressa in vitro in genere dopo circa 7-9 passaggi in coltura.

- **Osp A ed Osp B:** Sono delle lipoproteine integrali della membrana esterna di *B.b.*, il cui peso molecolare apparente è: 30-33 Kda per l' *OspA* e 34 Kda per l' *Osp B*. I geni codificanti ciascuna di esse sono localizzati su un singolo plasmide lineare di 49 Kb in un'unica unità trascrizionale, il quale sembra mantenere un'elevata stabilità anche durante la coltivazione in vitro. Nell'espressione dell' *OspA* e dell' *OspB* vi è una certa variabilità di peso molecolare a seconda del ceppo e della specie. Quest'ultima caratteristica viene utilizzata nell'individuazione fenotipica della genospecie (vedi oltre). Nonostante siano entrambi presenti fin dalle prime fasi dell'infezione l' *OspA* e l' *OspB* sono scarsamente immunogeniche nello stadio iniziale, mentre suscitano la formazione di anticorpi in fase tardiva.

L'*OspA* è uno dei maggiori candidati per lo sviluppo di un vaccino contro *B.b.* sia come proteina nativa che come ricombinante.

- **p 39:** L'antigene p 39 è una proteina immunodominante specie specifica del peso molecolare di 39 Kda. A causa della somiglianza di peso molecolare tra p 39 e flagellina (41 Kda), i due antigeni presentano una cattiva risoluzione elettroforetica.

- **Flagellina o p 41:** La flagellina è una proteina del peso molecolare apparente di 41 Kda, associata al flagello e localizzata nello spazio periplasmatico. E' costituita da due frazioni: 41 a con punto isoelettrico 6.5 e 41 b con punto isoelettrico 6.6. Il gene codificante per la flagellina è localizzato sul cromosoma batterico; esso è costituito da una porzione centrale variabile, specifica per *B.b.*, e da sequenze laterali altamente conservate che presentano omologia con quelle di altre Spirochete (*Borrelia hermsii*, *Treponema phagedenis*, *Salmonella thiphimurium*).

- **p60 e p70.** Note anche come "Heat shock proteins" HSP60 e HSP70,

sono due famiglie di proteine immunodominanti presenti in tutto il genere *Borrelia*, ma anche in altre specie batteriche, quali *Legionella*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Salmonella* etc.. Si tratta di proteine a sequenza altamente conservata, riscontrabili nei mitocondri degli eucarioti, correlate all'insorgenza di fenomeni di autoimmunità. Tali antigeni non sono quindi specifici per *B.burgdorferi* (Luft B.J., et al. 1991)

◦ **p100-81** (anche nota come **p93**) è un antigene altamente specifico per *B.b.*, ritenuto "marker" dell'infezione tardiva. Si tratta di una proteina strutturale, associata al flagello (Jauris-Heipke S., 1993).

L'utilizzo degli antigeni ai fini del riconoscimento della specie di *B.b.*, risulta non sempre attendibile a causa della loro variabilità di espressione di suddette proteine sia durante il passaggio vivo-vitro, che durante la sottocoltivazione. Infatti l'espressione di *OspA* e *OspC* varia nel passaggio vivo-vitro ed anche in rapporto all'ospite (Tabella 4).

Fenotipo antigenico e genospecie

Le *OspA* e le *OspB* possono presentare pesi molecolari diversi a seconda della specie di appartenenza (Tabella 5).

Sono stati preparati degli anticorpi monoclonali, associati alle tre specie.

Borrelia burgdorferi sensu stricto è riconosciuta specificatamente dal Mab H3TS diretto contro *OspA*. *B. garinii* è riconosciuta dal Mab D6, una IgM reattiva con una proteina di 12 Kda. *B.afzelii* viene riconosciuta da due anticorpi specifici quali: I17.3 che riconosce una proteina di 35 Kda e J8.3 che riconosce una banda corrispondente a 32 Kda (Canica 1995).

	in vitro	in vivo	ospite	
			zecca	uomo/topo
OspA	+	-	+	-
OspC	++	+++	-	+

Tabella 4. Variabilità di espressione degli antigeni Osp di B.b.

Genospecie	Antigene riconosciuto	Monoclonale
B.b sensu stricto	<i>OspA</i> di 30-31 Kda <i>OspB</i> di 34 Kda	H3TS H6831
B. garinii	<i>OspA</i> di 32 Kda <i>OspB</i> assente p 12	D6
B.afzelii	<i>OspA</i> di 32 Kda <i>OspB</i> di 35 Kda	J8.3 I 17.3

Tabella 5.

Capitolo 2 - Sintomatologia Clinica

La borreliosi di Lyme è una sindrome multisistemica, che interessa la cute, le articolazioni, il sistema nervoso centrale e periferico e diversi organi interni; può evolvere, se non curata, in manifestazioni più gravi e croniche, a carico degli apparati interessati nella fase iniziale. La LB pertanto si suole distinguere in tre fasi, come riportato in Tabella 6 (Steere, A.C. 1989).

Stadio precoce della LB. (Stadio I°)

Dopo l'inoculazione da parte della zecca, la *B.b.* si diffonde localmente nella cute e si manifesta nel giro di 4-25 giorni con l'ECM (**eritema cronico migrante**) (Fig. 3 Appendice), lesione eritematopapulosa che circonda la sede del morso, con tendenza ad espansione centrifuga. L'ECM può raggiungere un diametro di 50 cm e può essere accompagnato da una adenopatia regionale, da febbre e da sintomi generali minori come cefalea, artralgia, mialgie, inappetenza, nausea e vomito, faringodinia. Le lesioni dell'ECM tendono a risoluzione in 3-4 settimane; esse possono tuttavia recidivare e soprattutto possono rappresentare la prima fase, anche se non obbligata, di una borreliosi sistemica. La comparsa dell'ECM rappresenta il "**marker**" dell'**infezione** cui dovrebbe al più presto seguire l'intervento terapeutico. Va tenuto tuttavia presente che l'ECM in un 20% circa di casi non si manifesta e la borreliosi evolve negli stadi successivi. Inoltre, in questa fase, la serologia può essere negativa. Entro pochi giorni dall'inoculazione la *Borrelia* può diffondere in molte sedi (stadio disseminato). Nonostante la lista delle possibili manifestazioni della BL sia lunga, in questa fase le sintomatologie sono per lo più contraddistinte da interessamento cutaneo, nervoso e dell'apparato locomotore (Tabella 7).

Stadio precoce, infezione disseminata, (Stadio II°)

Possono verificarsi manifestazioni eritematose secondarie della cute, che possono essere osservate in circa metà dei pazienti, simili all'ECM; una manifestazione cutanea caratteristica è la **lymphadenosis benigna cutis** o

Localizzazione	I° Stadio (Localizzato)	II° Stadio (Disseminato)	III° Stadio (Persistente)
Sistema Muscolo-scheletrico	---	Dolori alle articolazioni, tendini, muscoli, ossa: brevi attacchi di artrite: miositi, osteomieliti	Attacchi di artrite prolungata, artrite cronica, periostite o sublussazione dell'articolazione sottostante l'acrodermatite
Sistema nervoso	---	Meningiti, neuriti cranica, paralisi di Bell	Encefalomielite cronica, parapsi spastica, tassa, disordini mentali, poliradiculopatia cronica
Sistema linfatico	Linfoadenopatia regionale	Sindrome di Bannwarth, encefalite, motoneurite multipla, mielite, linfoadenopatia regionale o generalizzata splenomegalia	---
Cuore	---	Blocco atrio-ventricolare, miopericardite, pancardite	---
Occhio	---	Congiuntivite, irite, choroidite, emorragia o distacco della retina, panoftalmite	Cheratite
Fegato	---	Epatite lieve o ricorrente	---
Sistema respiratorio	---	Mal di gola non essudativo, tosse secca	---
Reni	---	Ematuria microscopica o proteinuria	---
Sistema genito-urinario	-	Orchite	---
Sintomatologia Costituzionale	di lieve entità	Grave malessere e spossatezza	Spossatezza

Tabella 6. Sintomatologia della malattia di Lyme.

linfocitoma cutaneo (LBC) (Fig. 4 Appendice). Tale manifestazione consiste in lesioni nodulari indolori (vedi foto nelle tavole a colori) che appaiono più frequentemente al lobo dell'orecchio o intorno al capezzolo, riscontrabili più

Sintomo	Frequenza(%)
Eritema cronico migrante	95
Linfadenopatia regionale	41
Linfadenopatia generalizzata	20
Rigidità nucale	17
Rash malare	13
Angina	12
Congiuntivite	11
Dolorabilità ipocondrio destro	8
Artrite	6
Splenomegalia	6
Epatomegalia	5
Dolore muscolare	4
Edema periorbitale	3
Dolore addominale diffuso	2

Tabella 7. Sintomi precoci della malattia di Lyme e loro frequenza (da Steere et al., 1989).

comunemente nei bambini. Si tratta di infiltrati da linfociti B, di aspetto pseudo-linfomatoso, che, nonostante la loro apparenza inquietante, tendono a regredire: in assenza di terapia l'infezione può persistere ed evolvere in altre sequele. La LBC è particolarmente evidente nella BL europea (Cinco & Trevisan, 1989).

La **sintomatologia neurologica** è caratterizzata dalla triade meningite, nevrite dei nervi cranici e radicolonevrite, isolate o associate a costituire le classiche sindromi di Bannwarth e di Garin-Bujadoux. I segni della compromissione del S.N.C., quando presenti, sono sfumati e caratterizzati dalla presenza di sonnolenza, riduzione della memoria, e cambiamenti del tono dell'umore. Di solito le turbe neurologiche durano alcune settimane o mesi; tuttavia ne è possibile la cronicizzazione e la recidiva. Di riscontro relativamente frequente, soprattutto nell'Italia Nord-Orientale sono le neuriti craniche ed in particolare la **paralisi del faciale**, mono o bilaterale, soprattutto nei bambini (Glasscock M.E., 1985).

Dopo alcune settimane di decorso della malattia, nel 4-8% dei pazienti può essere messo in evidenza un **interessamento cardiaco**, in genere dimostrabile strumentalmente sottoforma di blocchi **atrio-ventricolari** di diverso grado, che può arrivare al blocco completo. Mio-, endo- e pericardite gravi sono più rare. Sono stati messi in evidenza episodi di miocardite in fase iniziale di malattia, come unico sintomo della BL (Cinco et al., 1993);

condizioni di cardite cronica quali ad esempio la cardiomiopatia dilatativa sono state associate all'infezione da *Borrelia*. Non comune nelle BL europee, l'interessamento cardiaco è particolarmente presente nelle BL del Nord-America.

La sintomatologia **artromialgica** dello stadio secondario (disseminato) è caratterizzata da numerosi episodi di dolore ed impaccio articolare che, in genere, migrano da una parte all'altra. Maggiormente interessata è l'articolazione del ginocchio. In media sei mesi dopo l'inizio della malattia, con ampia variabilità da due mesi a due anni, i pazienti iniziano ad avere brevi attacchi di mono ed oligo-artrite. Non è infrequente un aspetto entesitico che richiama le artriti reattive. Il conteggio delle cellule bianche nel liquido sinoviale va da 500-110.000/ml, si tratta soprattutto di leucociti polimorfonucleati.

Profonda astenia e malessere accompagnano costantemente i sintomi specifici delle localizzazioni d'organo. Senza trattamento i sintomi cardiaci cronicizzano e quelli neurologici perdurano da 3 a 18 mesi. Nel siero e liquido sinoviale di pazienti affetti dall'artrite di Lyme, si trova un alto titolo di IgG specifiche.

Stadio tardivo (Stadio III°)

L'**artrite cronica** è la manifestazione più comune della BL tardiva, soprattutto nel Nord America. Tipicamente soltanto alcune delle grandi articolazioni sono interessate. Il decorso non è caratteristico, così che riesce difficile individuarne l'eziologia in assenza di reperti anamnestici, sierologici e microbiologici. La flogosi è di media entità; aspetti essudativi si sovrappongono ad aspetti di proliferazione sinoviale, non però così spiccati come nell'artrite reumatoide. C'è aumento della VSE, si possono registrare presenza della costellazione flogistica e sierica, di immunocomplessi in circolo e di crioglobuline. L'artrite di Lyme sembra avere una componente immunogenetica, per una maggiore incidenza, non però sempre confermata, nei soggetti con antigeni di istocompatibilità HLA-DR2 e HLA-DR4. Gli attacchi di artrite, dopo 2-3 anni tendono ad allungarsi, durando mesi invece che settimane; nei casi più gravi l'artrite cronica di Lyme può condurre all'erosione delle cartilagini e dei capi articolari, fino all'anchilosi.

Le manifestazioni neurologiche tardive della BL sono caratterizzate da encefalomielite progressiva con paraparesi, vescica neurologica, atassia, deficit del VII o dell'VIII nervo cranico, deterioramento psichico fino alla demenza. Reperti di laboratorio quali una tipica pleiocitosi linfocitaria, livelli di proteine elevati, e soprattutto la sintesi intratecale di anticorpi anti B.b. coadiuvano nel formulare la diagnosi (Achermann R. et al, 1988).

La manifestazione cutanea caratteristica della fase tardiva è l'**Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA)** (Fig. 5 Appendice), che si presenta con lesioni acroposte in sede para-articolare, eventi di atrofia successiva e flogosi cutanea. La pelle diventa permanentemente atrofica e si può associare ad altre forme atrofo-sclerodermiche, come noduli fibrotici, morfea, *lichen sclerosus et atrophicus*, anetoderma e atrofodermia di Pasini-Pierini. La lesione si manifesta nello stesso punto in cui era presente l'eritema migrante all'esordio della malattia ed è riscontrabile esclusivamente negli adulti, preferibilmente di sesso femminile. E' soprattutto riscontrabile nelle BL europee. La risposta immune serica è particolarmente intensa e sostenuta da IgG.

Accanto a queste manifestazioni tipiche, si possono osservare sintomatologie di contorno delle più varie, quali: miosite, cheratite, osteomielite, epatite.

La **trasmissione transplacentare** è alquanto dibattuta: sono stati riportati in letteratura casi di infezione congenita da *B.b.* in figli di donne che avevano presentato manifestazioni cliniche della BL. Le conseguenze dell'infezione del feto vanno dalla morte intrauterina fino alla comparsa di varie patologie nel neonato, quali cecità, sindattilia e l'esantema.

Eterogeneità clinica della BL in rapporto alla genospecie di *B.b.* e continente

Sebbene le principali manifestazioni cliniche della BL - quali l'ECM - siano simili in tutte le parti del mondo, vi sono differenze nella frequenza di comparsa delle varie sintomatologie e nella gravità del loro presentarsi, che possono riflettere variazioni territoriali nella prevalenza delle genospecie di *Borrelia burgdorferi* circolanti. Infatti La BL in Europa si esprime con una maggior varietà di sintomatologie, che non nel Nord America; ciò può essere correlato alla maggiore eterogeneità delle genospecie di *B.b.* (vedi Capitolo 1). Infatti tutti i ceppi isolati da pazienti negli U.S.A. appartengono alla specie *B.b. sensu stricto*, mentre in Europa è stata notata una maggiore presenza di *B.afzelii* nelle acrodermatiti e di *B. garinii* nelle neuroborreliosi e di tutte tre le genospecie negli ECM.

Capitolo 3 - Fattori di patogenicità di *Borrelia burgdorferi*

Come tutte le spirochete patogene, anche quelle coltivabili, *B.burgdorferi* presenta non poche difficoltà allo studio dei suoi caratteri patogenetici; tali difficoltà derivano dal lunghissimo tempo di generazione (10-12 ore), dalla complessità del mezzo in cui vengono coltivate, dalla veloce perdita della virulenza durante i passaggi in terreno artificiale. Nel caso specifico di *B.b.*, un ulteriore problema deriva dalla difficoltà di riprodurre un adeguato modello di infezione nei mammiferi. Pertanto le conoscenze attuali sul tema si articolano in un “puzzle” ancora non composto e di non facile interpretazione.

Analogamente alle altre spirochete la patogenesi della BL è dovuta non alla elaborazione di esotossine o al rilascio di endotossine (in *B.b.* non è stato riscontrato un LPS biologicamente e chimicamente definibile), ma ad una complessa serie di interazioni con le cellule ed i tessuti, in cui giocano una notevole importanza la struttura e le componenti di superficie di *B.b.*, il suo ruolo come **immunomodulante**, la tendenza a modificare gli antigeni di superficie nel corso dell’infezione, e la mimesi molecolare, capace, quest’ultima di indurre imponenti fenomeni di infiammazione ed autoreattività.

1- Dinamica dell’infezione primaria ed invasione di *B. burgdorferi*

Fase iniziale: infezione localizzata

L’infezione viene trasmessa all’uomo dalla zecca, probabilmente per rigurgito finale durante il pasto di sangue. Le borrelie attraversano la cute ed si moltiplicano localmente probabilmente favorite da un effetto immunosoppressore temporaneo esercitato dalla saliva di *Ixodes* e **per soppressione della funzione A-P (presentazione dell’antigene) da parte delle cellule di Langherans** fagocitanti le borrelie (Silberer 1995, vedi oltre). L’espressione clinica è l’ECM, la cui espansione è dovuta alla moltiplicazione centrifuga della spirocheta, facilmente reperibile ed isolabile in questa fase.

Fase disseminata: Invasione

Successivamente *B.burgdorferi* abbandona la cute ed invade l’organismo, comparando nel sangue (spirochetemia) nei tessuti ed in particolari organi

verso i quali manifesta maggiore tropismo (SNC, miocardio, articolazioni) come sommarizzato in Figura 6. I fattori che condizionano l'invasione delle spirochete sono:

- a- Resistenza alle difese aspecifiche e specifiche dell'organismo (fagociti, complemento, anticorpi)
- b- Interazione con componenti tessutali (fibronectina, paltminogeno, etc.) nonché con recettori di superficie di molte cellule, soprattutto con gli endoteli.
- c- Modifica delle lipoproteine (o glicoproteine?!) di superficie. Mimesi molecolare.

Le borrelie viaggiano nel sangue facilitate dall'adesione a elementi e cellule, quali piastrine ed i globuli rossi alle ed ai quali aderiscono mediante i recettori II_3 ed i destrani (Leong J., 1995) e soprattutto dalla Resistenza al sistema complementare ed alla fagocitosi.

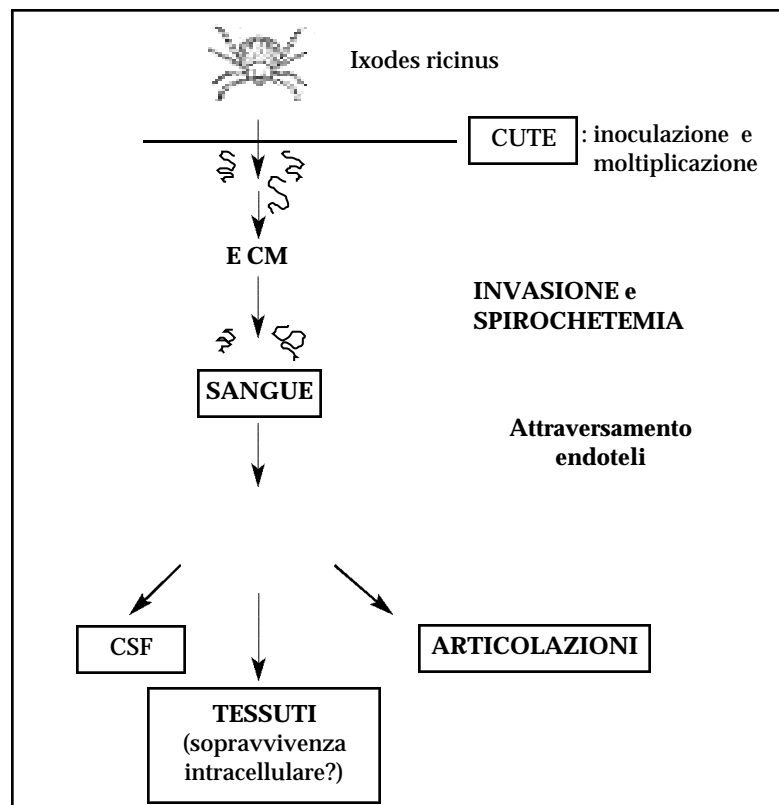


Figura 6. Percorso di *B. burgdorferi* nell'infezione iniziale.

E' stato ampiamente dimostrato che le spirochete attivano il **complemento** sia per via classica che alternata (Kochi 1991), e la maggioranza dei ceppi, soprattutto quelli appartenenti alla genospecie *B. afzelii* e e *B. sensu stricto* resistono al killing complementare in assenza di anticorpi. Tale resistenza, peraltro non ancora spiegata sarebbe dovuta alla difficoltà di inserimento del complesso di attacco (MAC) terminale nel corpo batterico (Breitner 1997); l'anticorpo promuoverebbe, anche se non sempre, il killing complementare, modificando la superficie dell'Outer Membrane e favorendo l'attacco del MAC.

Per quanto riguarda la resistenza ai fagociti, la letteratura è ricca di pubblicazioni ma, andrebbero considerate soltanto quelle riguardanti l'interazione delle borrelie con fagociti UMANI.

B. burgdorferi viene fagocitata da neutrofili (PMN) e monociti, sia in assenza che in presenza di anticorpi (Benach 1984, Cinco 1994). La opson fagocitosa è ovviamente, più intensa, sia per quanto riguarda il numero di borrelie fagocitate, che il tempo impiegato nella internalizzazione delle spirochete, per l'intervento dei recettori Fc da parte dei fagociti. E' stato recentemente dimostrato che, in assenza di anticorpi, la internalizzazione delle spirochete è mediata in gran parte dall'integrina CR 3 (Cinco 1997), con un doppio riconoscimento da parte del recettore sia del frammento iC3b opsonizzante le borrelie sia molecole probabilmente glicoproteine batteriche riconosciute dal dominio "lectin-like" del CR3. Osservazioni al microscopio elettronico hanno dimostrato che la fagocitosi avviene sia attraverso un meccanismo di ingolfamento convenzionale, che attraverso la "coiling phagocytosis" (Rittig M.G.1992), ossia mediante l'arrotolamento progressivo di alcuni pseudopodi, che non richiudono completamente la spirocheta nel vacuolo. Il significato di questa fagocitosi insolita è ancora da determinare e sembra influenzare la compartimentalizzazione intracellulare dei batteri fagocitati (Hulinska, 1995). Su quale sia il destino delle borrelie, una volta fagocitate, esistono ancora dubbi e rapporti controversi. Sicuramente il grado di resistenza alla fagocitosi varia in rapporto al ceppo di borrelia saggiato che al suo grado di virulenza. La maggioranza degli esperimenti sono stati condotti in vitro con fagociti murini, in cui il sistema battericida NO è particolarmente attivo, ma che non è applicabile ai fagociti umani. Mentre è stato dimostrato che epatociti di ratto fagocitano ed uccidono le borrelie in 24 ore (Sabri 1996), i nostri studi, fatti impiegando fagociti umani, hanno dimostrato che: *B. burgdorferi* attiva il burst ossidativo di PMN e macrofagi, ma resiste al Killing ossigeno dipendente; *B. burgdorferi* resiste anche a tutte le proteine cationiche del sistema battericida ossigeno indipendente rilasciato dai granuli primari e secondari nel fagolisosoma, eccetto un'elastasi recentemente identificata per essere borrellicida (Garcia, 1997, in press)). A parte le interazioni subcellulari di *Borrelia* con i fagociti, la

cocoltivazione delle borrelie con neutrofilii e monociti associata ad osservazioni microscopiche indicherebbe che, seppure la maggioranza delle spirochete vengono digerite nel citosol, alcune sarebbero in grado di sfuggire al fagolisosoma e quindi sopravviverebbero al killing (Hulinska 1995).

Un fenomeno che può contribuire alla resistenza di borrelia nei riguardi degli anticorpi neosintetizzati in questa fase dell'infezione è l'abbondante e continuo rilascio delle cosiddette "blebs" ossia vescicole formate da sovrapproduzione dell'outer membrane contenente lipoproteine di superficie OspA ed OspB, DNA. Queste blebs si legherebbero agli anticorpi in via di sintesi, tamponandone l'eventuale l'effetto borrellicida: sono stati infatti dimostrati immunocomplessi antiborreliosi nel siero, liquor ed altri siti dell'organismo.

Un fenomeno recentemente descritto, di enorme interesse biologico perchè unico nella storia delle interazioni anticorpi/batteri, è la capacità, da parte di particolari anticorpi monoclonali anti OspB, di esercitare un'azione borrellicida diretta. Questa riavrebbe come bersaglio l'Outer envelope della spirocheta (Escudero 1997).

Le tappe dell'invasione prevedono anche la fuoriuscita delle borrelie dai vasi sanguigni attraverso l'interazione con le cellule endoteliali (Comstock 1989, Sellati 1995): le spirochete attraverserebbero il tappeto cellulare sia attraverso le giunzioni intercellulari che per transitosi e penetrerebbero nei tessuti (Sigal 1996). Qui l'adesione a componenti della matrice extracellulare e delle superfici cellulari quali proteoglicani, collagene, fibrinonectina, glicosaminoglicani, decorine, glicosfingolipidi cattivazione del plasminogeno, permetterebbero sia la progressione delle spirochete nei tessuti che il loro organotropismo e, forse, una localizzazione intracellulare, senza evidenza di danni cellulari diretti, tranne che per le cellule gliali del SNC.

Sebbene la maggioranza di questi dati provenga da studi effettuati in vitro la conferma dell'invasività di *Borrelia* in vivo è dimostrata dalla presenza delle spirochete negli stadi successivi dell'infezione nel sinovio, SNC, miocardio. Le spirochete possono anche attraversare la barriera placentare: le conseguenze per il feto non sono ancora state ben accertate.

B.burgdorferi è capace di modificare molto i propri antigeni di superficie, come si è già detto: le conseguenze nel corso dell'infezione sono importantissime. Cocoltivando *B.burgdorferi* in presenza di anticorpi anti-OspA o OspB, si assiste alla comparsa di *mutanti "escape"* i quali esprimono forme modificate di questi antigeni o addirittura non li esprimono affatto (Sadziene 1993). Ceppi di borrelia con forme incomplete delle proteine OspA sono stati isolati dal liquido sinoviale di pazienti affetti da artrite (Fikrig 1995). Tutto ciò, ed altri dati ancora, quali il rimaneggiamento delle proteine di superficie, che normalmente avviene nei ceppi neoisolati nel passaggio vivo/vitro,

indicano che *B.burgdorferi* è dotata di una ampia variabilità antigenica e che questa può venire maggiormente evidenziata proprio nel corso dell'infezione, sotto la pressione selettiva degli anticorpi in via di formazione.

2) L'infezione persistente ed i sintomi della BL tardiva

Borrelia burgdorferi tende a dare un'infezione persistente, probabilmente per **sopravvivenza** di pochi elementi batterici nei tessuti e nelle cellule, quali i fibroblasti, milza, sinovio. E' stato dimostrato che le borrelie, nell'infezione localizzata quale ECM ed ACA (acrodermatite cronica atrofica) sopprimono l'espressione dei markers degli MHC nelle cellule di Langherans. Le spirochete agirebbero quindi da **immunomodulatori** inducendo, in questi siti, **immunotolleranza** (Silverer 1995, Aberer 1977).

Più complesso è interpretare e collegare i dati emersi sulle cause delle importanti sintomatologie tardive della BL. Nella maggior parte dei casi, il sistema immunitario continua ad essere sollecitato dalle spirochete ed in alcuni soggetti ciò dà origine ad una **risposta autoimmune**, le cui manifestazioni più gravi sono neuroborreliosi ed artrite. Alla base di tali sintomi c'è sicuramente una componente **infiammatoria** di proporzioni paragonabili a quella suscitata dagli LPS dei Gram negativi; in *B.burgdorferi*, che manca del lipopolisaccaride, analoga funzione è svolta dalle lipoproteine di superficie OspA, OspB, OspD, scoperta unica e peculiare delle spirochete patogene (Norgard 19957). Sarebbero proprio queste molecole di superficie di *B.b.* ad indurre il rilascio di un nutrito corredo di **citochine** (Tnf- α , IL-1, IL-6) da parte dei monociti. Inoltre alcuni di questi antigeni fungono da potenti mitogeni su linfociti B ed inducono il rilascio di mediatori da parte di Linfociti T. E' stata recentemente anche riportata una uccisione diretta *Borrelia*/Linfociti T4 (Dorward 1977).

Analogamente all'infezione sifilitica cui la borreliosi è stata spesso accostata, nella fase tardiva della BL il trattamento antibiotico può non essere efficace ed i sintomi possono continuare ad evolversi anche in completa assenza del batterio. Artrite distruttiva cronica, miocardite anomalie psichiche di entità varia riflettono tale situazione che è stata interpretata come il risultato di fenomeni di **autoimmunità**. A sostegno di questa ipotesi sussistono molti dati, oltre all'analogia con altre malattie infettive ad andamento autoreattivo. Sono state infatti evidenziate reattività crociate tra anticorpi anti flagello ed antigeni delle fibre nervose (di 64Kda, Sigal 1988) e verso il miocardio. Altre proteine implicate nei processi di autoimmunità sa-

rebbero le "heat-shock proteins" di *B.b.* omologhe alle *groEL*, a probabile azione artritogena e le stesse OspA e OspB. La persistenza di anticorpi anti-OspA correlata alla durata dell'artrite cronica ha fatto ipotizzare che tale antigene fosse artritogeno. Non essendosi tuttavia trovata alcuna omologia di sequenza fra le OspA di *B.b.* e proteine umane, tale ipotesi rimane speculativa.

In conclusione pur cercando di correlare l'intreccio delle osservazioni raccolte sulla patogenesi della malattia di Lyme, rimangono non pochi punti oscuri, che sarebbe importante chiarire per un più adeguato approccio terapeutico e per una opportuna preparazione vaccinale.

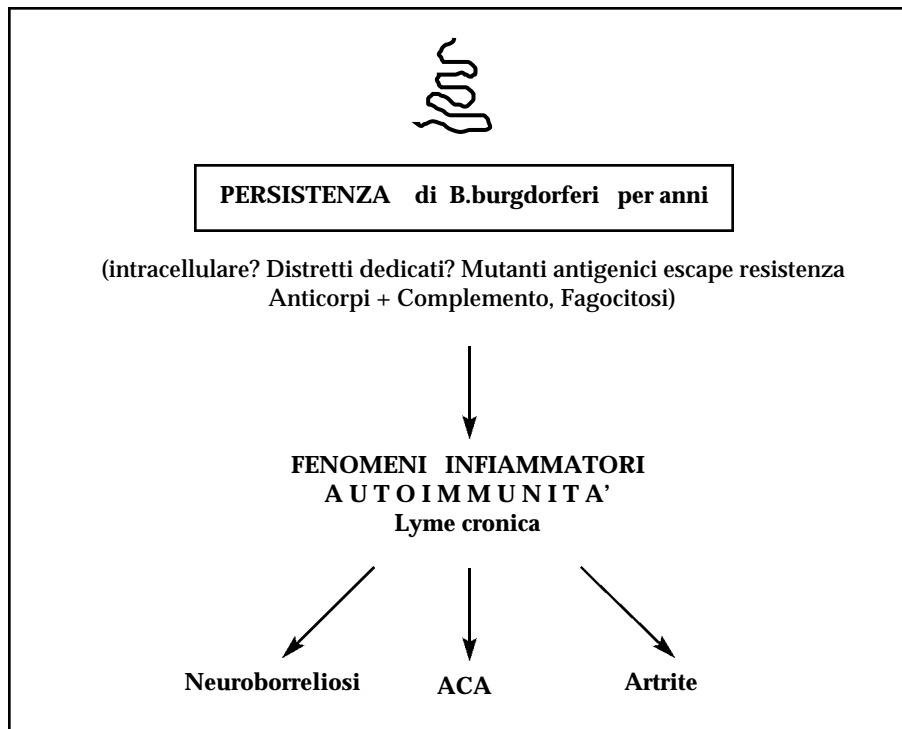


Figura 7. L'infezione tardiva di *B. burgdorferi*.

Capitolo 4 - Ecologia ed Epidemiologia della malattia di Lyme

L'infezione da *Borrelia burgdorferi* è una **zoonosi**, il cui ciclo di trasmissione riguarda una serie di ospiti invertebrati che fungono da **vettori**, ed ospiti vertebrati, alcuni dei quali fungono da **serbatoi** dell'infezione ed altri i quali adempiono al ruolo di **ospiti occasionali**, quest'ultimi senza uno spiccato significato epidemiologico. La trasmissione della borrelia avviene quindi nell'ambito di queste tre categorie di ospiti ed è mediata principalmente dall'esistenza dei vettori, rappresentati da artropodi ematofagi, per lo più zecche del genere *Ixodes*, i quali acquisiscono il microorganismo e rispettivamente lo trasmettono, durante il loro pasto di sangue. L'estrema labilità ai fattori ambientali di *B.burgdorferi*, soprattutto all'essiccamento, condiziona la sua trasmissione che infatti avviene attraverso per contatto diretto, tra tessuti dell'ospite vertebrato ed apparato succhiatore dell'artropode. E' pertanto la biologia e soprattutto l'attività di tali artropodi che condiziona la trasmissione delle Borrelie.

I vettori di *Borrelia burgdorferi*

Vettore di un determinato microorganismo è colui che ha la competenza di trasmetterlo da un ospite all'altro, e ciò si verifica mediante la xenodiagnostics. Portatore "**Carrier**" è colui che può ospitare un determinato microorganismo, ma del quale non è stata documentata la competenza.

Ciò premesso, è noto che gli artropodi vettori responsabili della trasmissione di *B.b.* appartengono prevalentemente alla famiglia delle ***Ixodidae*** (o zecche dure, poichè munite di scudo dorsale). Esiste una notevole specificità territoriale dei vettori, come riportato in Tab.8, per cui nel continente Nordamericano funge da vettore predominante *I. scapularis*, mentre in quello Eurasiatico *I. ricinus*, seguito da *I. persulcatus* (Russia, Asia); in Giappone è presente l'*I. ovatus* e nelle isole del Baltico gioca probabilmente un ruolo importante *I. uriae*, parassita di uccelli marini migratori. Vettori secondari o "carrier" sono considerate zecche non appartenenti agli Ixodidi (Tab. 9) e dubbio, anzi probabilmente privo di significato epidemiologico, risulta il ruolo di insetti ematofagi quali zanzare e tabanidi, nei quali è stata riscontrata la presenza delle spirochete. In quest'ultimi infatti, al contrario delle

	SPECIE	TERRITORIO
IXODIDAE	<i>I. scapularis</i>	Stati Uniti, Nord-Est
	<i>I. pacificus</i>	Stati Uniti, Occidente
	<i>I. ricinus</i>	Europa
	<i>I. persulcatus</i>	Russia, Asia
	<i>I. ovatus, I. persulcatus</i>	Asia
	<i>I. uriae</i>	Isole del Baltico

Tabella 8. Vettori di *Borrelia burgdorferi* e loro distribuzione geografica.

SPECIE	TERRITORIO
<i>Dermacentor variabilis</i>	Stati Uniti ed Europa
<i>Haemophysalis punctata</i>	
<i>Haemaphysalis leporispalustris</i>	
<i>Amblyomma americanum</i>	
<i>Ripicefalus sanguineus</i>	

Tabella 9. Vettori secondari "carrier" di *Borrelia burgdorferi*.

zecche, la digestione avviene in sede extracellulare ove le spirochete, a contatto con gli enzimi digestivi, non avrebbero la possibilità di sopravvivere.

In Europa il vettore per eccellenza di tutte le specie descritte di *B.b.* è *I. ricinus*, (Fig.8), seguito da, dove presente, *I. exagonus* (Gern et al. 1992). Si tratta di una zecca dotata di bassa specificità come quasi tutti gli Ixodidi, in quanto riesce a parassitare facilmente numerosi mammiferi, sia selvatici (piccoli roditori) che domestici ed uccelli. E' possibile, durante la fase larvale anche il parassitismo di rettili.

Infezione da *B.burgdorferi* degli Ixodidi

Il ciclo vitale della zecca (Fig. 9) è trifasica. La femmina adulta fecondata depone alcune centinaia di uova, dalle quali nascono **larve** esapodi che attendono sul terreno il passaggio di un ospite idoneo su cui fissarsi. E' possibile che già alla nascita un certo numero di individui risulti infettato da

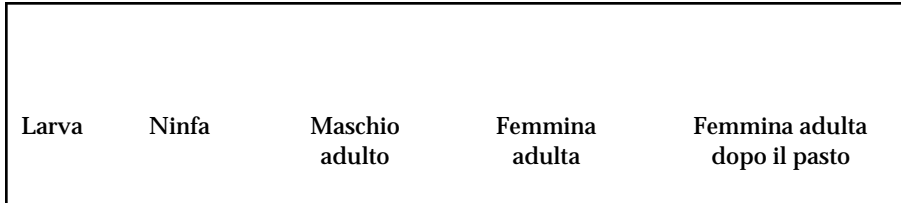


Figura 8. Stadi di sviluppo di Ixodes a grandezza naturale.



Figura 9. Ciclo vitale di I. ricinus.

B.b. per via transovarica. Raggiunto l'ospite effettuano il loro pasto di sangue e si lasciano cadere al suolo, per trasformarsi in **ninfe** ottopodi, in attesa di un nuovo ospite. Le ninfe rappresentano lo stadio più attivo della zecca: esse raggiungono l'apice degli steli erborei e si attaccano a qualsiasi ospite mammifero sia di passaggio, sia di grande che piccola taglia. Effettuato il pasto, a loro volta si lasciano cadere nel terreno (letti fogliari, etc.) e realizzano la muta finale in **zecche adulte**. Queste si accoppiano sull'ospite e le femmine fecondate vanno incontro al riposo invernale (diapausa); nella stagione primaverile seguente depongono le uova, concludendo così il loro ciclo vitale. Nelle zone in cui la BL ha carattere endemico, l'incidenza della malattia segue uno o due picchi stagionali, in relazione al ciclo di attività degli Ixodidi. Nell'Europa meridionale infatti tali picchi sono due e corrispondono ai periodi di Marzo-Aprile e Settembre-Ottobre (Maroli 1995).

L'infezione da *B.b.* si perpetua per tutta la vita della zecca, superando anche i diversi stadi di sviluppo. Le spirochete risiedono di preferenza nell'intestino medio, ove si aggregano ed aderiscono alla membrana basale. Qui si riproducono alla temperatura di 25° potendo raggiungere, durante il pasto di sangue, livelli elevati di contaminazione di 1000 e più spirochete. E' stato dimostrato che più specie possono coinfectare la stessa zecca. E' possibile una distribuzione delle spirochete agli altri tessuti durante le ultime fasi del pasto: la trasmissione all'ospite avviene in gran parte per rigurgito del contenuto intestinale, nelle fasi tardive del pasto (3 giorni), e probabilmente anche mediante la saliva (Burgdorfer et al., 1988).

Fonti di infezione della zecca ed amplificazione dell'infezione

L'infezione delle zecche ha origine dagli *animali riserva*, ove per serbatoi dell'infezione naturale si intendono quelle specie in cui *Borrelia* riesce a sopravvivere per un periodo di tempo molto lungo (in pratica tutta la vita) senza, peraltro, determinare segni evidenti di sofferenza. In questo caso il parassita determina un basso grado di virulenza e dà luogo a spirochetemie periodiche. Fra gli animali riserva figurano, negli Stati Uniti, micromammiferi quali *Peromyscus leucopus*, il topo dalle zampe bianche, *Tamias striatus*, e *Procyon lotor* (procione). Di dubbia competenza risultano gli ungulati quali *Odocoileus virginianus* (cervo dalla coda bianca), i quali tuttavia, pur non andando incontro a spirochetemie, rappresentano una grossa fonte di cibo per le zecche.

In Europa animali riserva sono topi campagnoli, quali *Clethrionomys glareolus*, *Apodemus flavicollis* (Hovmark A. et al) ed *Apodemus sylvaticus*. ed

insettivori quali *L'Erinaceus europeus*. Negli ecosistemi isolati e privi sia di roditori che di insettivori la popolazione infetta da *B.b.* può venire mantenuta da *Lepus europaeus* (lepre).

Anche gli uccelli, della specie *Phasianus colchicus* (fagiano) e soprattutto i passeracei (*Turdus merula*) sono animali serbatoio, soprattutto della specie *Borrelia garinii* e *Borrelia lusitaniae* (Kirstein F. et al.,1996). Di recente scoperta risulta il ruolo, come serbatoi, di certi uccelli marini migratori trovati in isolotti del Baltico non frequentati da mammiferi come le gazze marine (*Uria aalge* e *Alca torda*), parassitizzate da *Ixodes uriae*. (Olsen B. et al.,1993). Tali uccelli nelle loro migrazioni transemisferiche, potrebbero fungere da diffusori delle varie specie di *B.b.* da un continente all'altro, come suggerito da recenti studi (Olsen B. et al,1995).

Durante il loro pasto di sangue della durata di alcuni giorni, su animali riserva infetti, gli Ixodidi possono quindi a loro volta acquisire *B.b.* Un'altra fonte di infezione, che avviene in natura per gli Arbovirus, è stata di recente ipotizzata onde spiegare l'alta prevalenza di zecche infette (Randolph S.E., et al.,1996) per *B.b.* in certi ecotopi: si tratta del fenomeno del "cofeeding", ossia il passaggio contiguo di Borrelie da una zecca all'altra contigue, durante il pasto. In tal caso gli strati epidermici superficiali dell'ospite fungerebbero da tramite dei microorganismi. E' evidente che ciò potrebbe verificarsi allorchè gli atropodi sono attaccati a "grappolo" in gran numero nello stesso punto, e contribuirebbe enormemente ad amplificare la diffusione di Borrelia.

Ospiti occasionali di *Borrelia* sono tutti quelli nei quali l'infezione si arresta e che possono eventualmente ammalare: essi non entrano nel ciclo di trasmissione della spirocheta. Si tratta dell'uomo, animali domestici (il cane può presentare manifestazioni artritiche evidenti), ungulati e mammiferi selvatici. Di particolare interesse in Europa risulta il capriolo (*Capreolus capreolus*) in quanto la sua presenza è associata ad una maggiore infestazione da parte di *Ixodes*.

Fattori che favoriscono la trasmissione di *B.burgdorferi*

La trasmissione di *B.b.* è condizionata dall'attività delle zecche infette che è maggiore quanto più elevato è il tenore di umidità dell'ambiente. La presenza di letti fogliari in cui annidarsi e di copertura erbacea ed arborea favorisce la diffusione degli Ixodidi. Di conseguenza ambienti facilmente infestati sono i boschi (a latifoglie, o misti), gli anfratti erbosi, i margini dei sentieri bordati di erba sulla quale le ninfe e gli adulti si appostano per

l'attacco. Poveri di zecche si presentano invece ambienti come la landa. In altitudine si può dire che l'optimum è rappresentato dai 600-800 metri con reperibilità sino ad una quota di 1200 metri (Svizzera). Il passaggio di *B.burgdorferi* dalla zecca all'ospite avviene verso la fine del pasto, per rigurgito del contenuto intestinale. La maggiore permanenza o meno de ll'Ixodide sull'ospite è quindi un fattore predisponente, come pure il rischio è maggiore negli ecotopi frequentati da grossi ungulati.

Epidemiologia della malattia di Lyme

La BL è ampiamente diffusa in 4 continenti, nell'Emisfero australe prevalentemente nella fascia temperata, (vedi Fig. 10) laddove siano presenti i vettori competenti per *Borrelia burgdorferi*. E così l'infezione si presenta endemica nelle zone costiere del Nord-Est degli USA (Massachussets, Connecticut), registrando migliaia di casi all'anno, veicolate da *I. scapularis*; sulle coste del Pacifico ove il numero di casi è decisamente inferiore, (in California, Oregon) la borrelia è invece trasmessa da *I. pacificus*. Per quanto concerne l'Asia, i rapporti epidemiologici parlano della presenza della BL in Cina e soprattutto in Giappone, nella regione di Hokkaido: qui i vettori risultano essere principalmente due, *I. persulcatus* e *I. ovatus*.. (Nakao M et

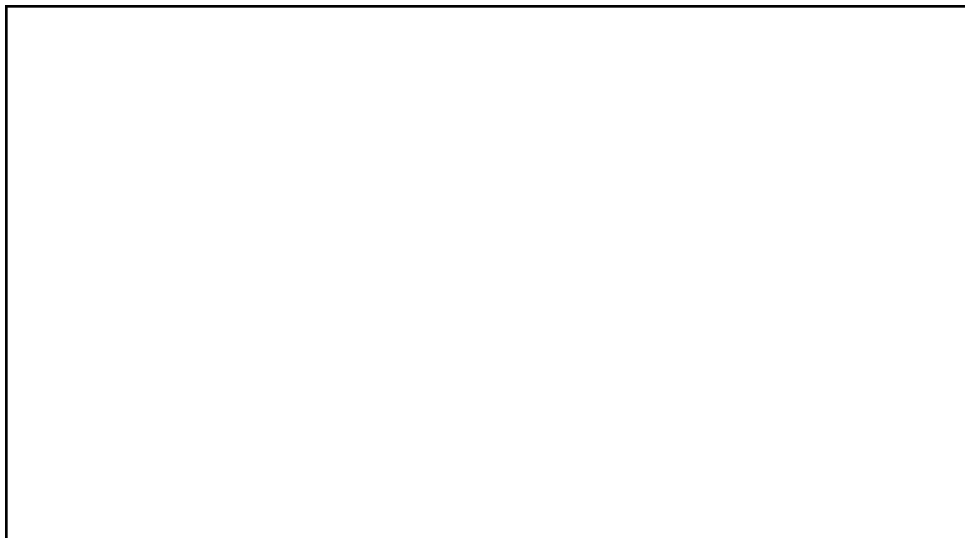


Figura 10. Diffusione nei quattro continenti della BL.

al., 1992). Sebbene nei continenti africano ed australiano siano stati riscontrati Ixodidi, la malattia di Lyme, nell'uomo, non è stata ancora diagnosticata.

Per quanto riguarda l'Europa, sebbene non identificata eziologicamente, la malattia è conosciuta da quasi due secoli e risulta attualmente diffusa nella quasi totalità dei suoi paesi: Germania, Austria, Svezia, Svizzera, Spagna, Ungheria, URSS e Paesi ex-URSS (ove i vettori principali risultano essere, oltre a *I. ricinus* anche *I. persulcatus*), Cecoslovacchia, Francia, Inghilterra, Slovenia, Croazia ed Italia. Il vettore principale in Europa è *I. ricinus* e, come abbiamo detto prima, la distribuzione ed endemicità dell'infezione, seguono i canoni sopra citati. Aree boschive a clima umido, ricche di selvaggina, rappresentano le nicchie ideali per la propagazione della malattia; in Europa l'eterogeneità dei territori e dei suoi abitanti, ha selezionato, nel tempo, una biodiversità nei ceppi di *B.b.*, che non esiste nel Nord America. Ritroviamo infatti tutte tre le principali specie di *B.b.* (*B. b.* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii*), ed inoltre *B. lusitanae*, *B. valaisiana* e probabilmente altre ancora verranno descritte. La Slovenia, l'Austria e le aree boschive della Germania rappresentano, in Europa, i "foci" a maggiore incidenza della BL. Anche le regioni Nord Orientali dell'Italia, in particolare il Friuli-Venezia Giulia, che rappresenta il proseguo geografico naturale del territorio sloveno, è ad alta endemicità per la BL. La diffusione ed epidemiologia della BL in Italia verrà trattata separatamente (vedi pag. 56).

Capitolo 5 - Diagnosi Microbiologica della borreliosi di Lyme

La diagnosi della BL si basa sui dati clinici e di laboratorio. Nei casi tipici di pazienti con ECM e successive manifestazioni, ad esempio artritiche, con serologia positiva, la diagnosi può essere semplice; ma talvolta la clinica è contraddittoria e nel 25-30 % dei pazienti l'ECM iniziale può mancare. Indubbiamente la borreliosi di Lyme può esprimersi con quadri clinici estremamente polimorfi, che, seppure compatibili con la diagnosi, possono essere ritrovati anche in altre patologie, dalle quali deve essere differenziata. La diagnosi, da un sospetto iniziale su base clinica, viene quindi confortata dalle ricerche di laboratorio.

Dati clinici sono: l'anamnesi positiva per puntura di zecca, la zona endemica, la correlazione temporale dell'insorgenza delle manifestazioni patologiche con il quadro clinico compatibile, oltre a criteri terapeutici *ex adjuvantibus*. **Dati di laboratorio** si basano sulla ricerca diretta di *Borrelia burgdorferi* nell'ospite (diagnosi diretta) e sull'evidenziazione di anticorpi antiborreliosi nel siero ed in altri liquidi organici.

Diagnosi diretta: visualizzazione ed isolamento di B.b.

La prova più sicura dell'eziologia dell'infezione è l'isolamento di *Borrelia burgdorferi* dal tessuto. I distretti dell'organismo da cui si può effettuare il campionamento sono: la cute interessata dall'ECM (mediante punch cutaneo), il sangue, ed il liquor; eccezionalmente dall'acrodermatite cronica (ACA) e dal linfocitoma. I campioni vengono insembrati in terreno BSK (Barbour, 1984), che può essere reso selettivo mediante aggiunta di rifampicina (50 µg/ml) e fosfomicina (100 mg/ml). L'eventuale sviluppo di spirochete viene monitorato mediante esame microscopico in campo oscuro (Fig. 11 Appendice). L'incubazione delle colture va prolungata per almeno un mese in condizioni di microaerofilia, in quanto le Borrelie stentano ad adattarsi al medium artificiale. Alcuni ceppi addirittura non si adattano alle sottocoltivazioni. Poichè l'infezione da borreliosi è paucibatterica, la sensibilità di questa tecnica varia dal 30-70% per biopsie cutanee al 5% per quanto concerne il liquor (Schmidt B. 1997): dalla mia esperienza risulta che maggiori

probabilità di successo si hanno insemenzando biopsie cutanee, nelle fasi iniziali della malattia. Al successo dell'isolamento contribuisce, in maniera determinante, la "bontà" del medium i cui componenti labili possono scadere o non essere commercialmente adeguati.

Le spirochete possono anche essere visualizzate direttamente nei tessuti (in biopsie del sinovio, ECM) mediante tecniche istochimiche basate sull'impregnazione argentea: particolarmente utile a questo proposito è il metodo di Bosma Steiner (de Koning, 1987), che prevede, dopo la fissazione con formalina, la digestione con amilasi, onde rimuovere le aspecificità di fondo (vedi Fig. 12).

Ricerca diretta mediante PCR (Polymerase Chain Reaction)

Una nutrita serie di pubblicazioni (più di 100) sono state dedicate all'utilizzo della Reazione Polimerasica a Catena (PCR) nella diagnosi di bor-



Figura 12. *Borrelia burgdorferi* nei tessuti, colorata con il metodo della impregnazione argentea secondo Bosma Steiner

reliosi di Lyme. Sono state saggiate sequenze target situate sia sul cromosoma che su plasmidi, raggiungendo la sensibilità di 5 copie di genoma di *B.b.*, saggiando tutti i tipi di campioni potenzialmente significativi, quali cute, liquor, liquido sinoviale ed urine (Rosa et al. 1991; Picken et al., 1992; Schwartz et al. 1992). Questi dati, validi ai fini della conoscenza patogenetica non hanno, in realtà aumentato la sensibilità della diagnosi, se considerati singolarmente, nemmeno per monitorare l'efficacia della terapia. E' emersa l'importanza di impiegare, nell'analisi, campioni derivanti dal distretto interessato dalla sintomatologia predominante, quali, ad esempio nel caso di neuroborreliosi, liquor ed urine, nel caso di artrite, il liquido sinoviale. Il grado di sensibilità della PCR nella diagnosi è di difficile valutazione, a causa di una completa mancanza di standardizzazione delle metodiche di amplificazione, dei primers utilizzati e dei diversi trattamenti dei campioni. Secondo una recente rassegna della letteratura il grado di detenzione della PCR (von Stedingk L.,1995) nei vari campioni sarebbe come in Tabella 10.

Tralasciando i limiti metodologici insiti in una diagnostica basata sulla PCR (false positività e false negatività), contribuiscono alla variabilità dei reperti l'esiguo numero di spirochete nei fluidi biologici, e l'incompleta conoscenza dei percorsi seguiti da *B.b.* nei vari stadi dell'infezione: a tale proposito infatti c'è da dire che sia la spirochetemia che la presenza delle borrelie nei liquidi biologici è del tutto transeunte e può non corrispondere al momento scelto per l'analisi. Inoltre le borrelie, come tutte le altre spirochete patogene, manifestano uno spiccato tropismo per i tessuti, e

Campioni	% Di corrispondenza diagnostica *
ECM, ACA (tessuto)	60-90 (specie <i>B. afzelii</i>)
Morphea, Linphadenosis benigna cutis (tessuto)	100
Artrite (liq. sinoviale)	75
Neuroborreliosi (liquor ,urine)	20-100 (predominante <i>B. garinii</i>)
Borreliosi disseminata	50

*I valori si riferiscono a casi europei.

Tabella 10.

tendono a localizzarsi in nicchie non facilmente accessibili per la campionatura. La PCR eseguita con primers specie specifici ha permesso tuttavia di evidenziare in pazienti, coinfezioni, dovute a più specie associate e di verificare, come appare nella tabella, una certa corrispondenza tra specie e sintomatologie predominanti.

In conclusione allo stato attuale, l'utilizzo della PCR ha valore diagnostico quando associato ad altri dati sia clinici che di laboratorio. Essa, quando positiva, non dà alcuna indicazione sulla fase dell'infezione, se acuta o persistente, e non sembra correlata all'esito della terapia.

Diagnosi indiretta: ricerca degli anticorpi anti-Borrelia

La ricerca degli anticorpi anti *B.b.* è la strategia attualmente più usata nella diagnosi, anche se presenta non poche difficoltà di interpretazione e non deve prescindere da una precisa indicazione clinica. Occorre ricordare che nell'uomo, la risposta anticorpale a *B.b.* è alquanto lenta e consiste in una fugace iniziale produzione di IgM (tra la terza e sesta settimana di malattia) seguita a breve distanza da IgG, le quali raggiungono la maggiore concentrazione alcuni mesi più tardi (Fig. 13). Pertanto mentre pazienti affetti da Lyme secondaria e terziaria esprimono titoli significativi per IgG, coloro che si trovano in fase di ECM possono risultare seronegativi. Quest'ultima eventualità è stata stimata dell'ordine del 20-30%, in relazione al test serologico impiegato. L'intervento terapeutico tende, comunque a negativizzare la risposta immune in fase iniziale di malattia.

Tests serologici di screening: Immunofluorescenza (IFA) ed Immunoenzimatico (ELISA)

Un primo approccio alla ricerca degli anticorpi anti-Borrelia va fatto con i cosiddetti tests di "screening", intendendo come tali quelli che consentono, in prima battuta, di confermare la diagnosi o sospetto clinico; se opportuno, tali tests abbisognano di una conferma, che può essere sia negativa, che positiva, da parte della reazione di Western Blot (Tab. 12).

Il test IFA, attuabile sia in campo umano che veterinario, consiste in una reazione di immunofluorescenza indiretta, in cui l'antigene è rappresentato da Borrelie fissate su vetrino, o eccezionalmente vitali in sospensione (SIFA, Cevenini al. 1992). La procedura è generalmente attuata sia in IgM che IgG:

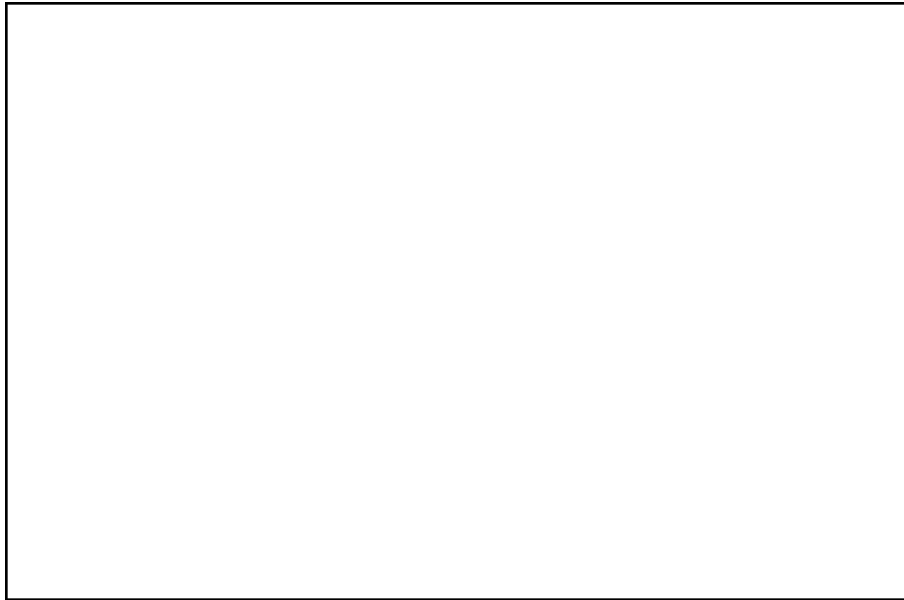


Figura 13. Dinamica della risposta immune nel corso dell'infezione da *B. burgdorferi*.

Isolamento di B.b. da :	cute (ECM, ACA, Morphea, scleroderma) sangue liquor, liq. sinoviale
Visualizzazione Borrelia nei tessuti: oppure	mediante tecniche istochimiche (metodo Bosma-Steiner) evidenziazione con Anticorpi Monoclonali marcati
PCR :	nei tessuto (pelle), sangue, liquor, liquido sinoviale, urina. La campionatura dipende dallo stadio della malattia

Tabella 11. Diagnosi diretta di Malattia di Lyme.

TEST di SCREENING	IMMUNOFLUORESCENZA	Rivela IgM ed IgG preadsorbimento con <i>T. phagedenis</i> Titolo minimo significativo 1/64 - 1/236 Sensibilità media
	TEST IMMUNOENZIMATICO	Rivela IgM ed IgG Più sensibile nella fase iniziale "cross - reattività" standardizzabile
	Tipo di antigene	Borrelie sonicate Flagellina purificata IgM IgG capture ELISA Antigeni naturali purificati
TEST di CONFERMA - IMMUNOBLOTTING (IB)		Rivela IgM ed IgG Maggiore sensibilità Maggiore specificità
	Tipo di antigene	Borrelie sonicate Antigeni di B.b. ricombinanti (allo studio)

Tabella 12. Test serologici per malattia di Lyme.

prima del saggio è tuttavia imperativo preadsorbire il siero con una sospensione di *Treponema phagedenis*, onde rimuovere antigeni comuni ad altre spirochete. Esistono immumerevoli Kit in proposito, ognuno con il suo cut-off.

Attualmente i più usati nella serodiagnosi sia umana che animale sono i tests ELISA. Tali metodiche sono le preferite nei laboratori ospedalieri in quanto di buona sensibilità e automatizzabili; inoltre la preparazione dell'antigene ha seguito una sua evoluzione, in campo commerciale, a partire da un prodotto fin troppo sensibile da dare false positività, fino all'adsorbimento su piastra di antigeni purificati. Nei tests ELISA di prima generazione infatti l'antigene era costituito da cellule di *Borrelia* sonicate; ciò

creava false positività, in quanto questi microorganismi possiedono antigeni in comune con altri batteri, soprattutto spirochete, a livello della componente flagellare (p41) e della p60-64 (*heat shock proteins*). Nei tests immunoenzimatici di seconda generazione sono state quindi elaborate nuove preparazioni antigeniche costituite da un antigene unico, cioè la flagellina purificata (Hansen, K., 1988) arricchito o no da altre frazioni immunologicamente valide. La terza generazione di ELISA è stata allestita impiegando antigeni nativi purificati ed assolutamente specifici per *B.burgdorferi* quali la OspA di 31Kda, la p100, la p22 (OspC) e la p 17, variamente associate. Inoltre, per quanto riguarda i casi di Lyme europei, si è tenuto conto della notevole eterogeneità di specie, e quindi antigenica dei ceppi circolanti, impiegando, nell'estrazione isolati Europei, come ad esempio il ceppo di *B. afzelii* pKo. Interessante risulta anche la proposta di un IgM capture ELISA, in grado di evidenziare la componente IgM in fase precoce di malattia (Hansen LK, 1991). Ciò ha incentivato notevolmente non solo la sensibilità, ma soprattutto la specificità della serologia. I tests immunoenzimatici sono attualmente le metodiche di screening più usate. Accanto alle caratteristiche descritte sono da aggiungere costo relativamente basso, utilizzo di un elevato numero di campioni per volta, realizzazione piuttosto rapida e riproducibile.

Serologia della neuroborreliosi:

Quando l'infezione interessa il sistema nervoso, nella maggioranza dei casi si assiste ad una produzione di anticorpi intratecali (60-90%). In tal caso risulta di notevole sostegno diagnostico ricercare la presenza di anticorpi nel liquor. Ciò deve essere fatto calcolando l'indice liquor/siero, ossia il rapporto tra gli anticorpi specifici ed il rapporto tra le IgG totali trovate nei campioni di siero e liquor, come segue:

Calcolo dell'indice liquor/siero

$$\frac{\text{Titolo Ig specifiche per } B.b. \text{ nel liquor}}{\text{Siero - IgG}} : \frac{\text{Titolo Ig specifiche per } B.b. \text{ nel siero}}{\text{Liquor- IgG}}$$

Se il valore di tale indice è inferiore a 2 ciò è indice di normalità: se tale valore è uguale o superiore a 4 ciò è indice di sintesi intratecale di anticorpi.

Immunoblotting

L'Immunoblotting è attualmente considerato un test serologico di "conferma", da eseguire in seconda battuta, dopo i tests di screening. Esso consente di evidenziare la reattività anticorpale di siero, CSF e liquido sinoviale verso le singole frazioni antigeniche di *B.b.*: ciò rende possibile distinguere i vari antigeni che si comportano da immunodominanti nelle varie fasi dell'infezione e nelle diverse espressioni cliniche del morbo di Lyme. Essa inoltre permette di definire in quale sequenza temporale compaiono gli anticorpi verso i singoli antigeni immunodominanti.

La tecnica prevede la separazione di preparati antigenici di *B.b.* mediante elettroforesi su gel, trasferimento di questi su membrana ed incubazione con il siero di pazienti (anticorpo primario). La rivelazione di bande di immuno-complessi formatesi avviene mediante incubazione con anticorpi secondari coniugati con enzima e per aggiunta finale del substrato. La valutazione finale del profilo di bande formatesi (Fig. 14) è essenzialmente di tipo qualitativo, anche se qualche autore propone una lettura quantitativa basata sulla densitometria ottica (Zoller L. 1993). Il numero ed il **tipo** di bande che si sviluppano nell'immunoblotting, in corrispondenza dei vari antigeni immunodominanti, costituisce un serio **problema interpretativo**, nell'esprimere una positività o una negatività di reazione. Le problematiche in proposito sono le seguenti:

- **Specificità delle bande.** Accanto a bande che sono specifiche per *B.b.*, compaiono altre, non specifiche, ma che sono il risultato di una reattività a largo spettro. Alcune di queste sono la già citata p41, corrispondente al flagello ed il gruppo delle Hsp di 60-64 Kda; inoltre altri antigeni comuni all'ospite ed altri che si evidenziano nel corso di diverse patologie infettive e non (Spirochetosi, Mononucleosi, tubercolosi, gengiviti, artriti reattive, malattie autoimmuni). Si presenta quindi, al laboratorista, un primo problema di interpretazione del "pattern" di bande rilevato.

Stadio dell'infezione

Esiste una diversa comparsa e significatività delle bande in relazione allo stadio dell'infezione ed all'isotipo di Ig. Infatti gli anticorpi anti p21-24 di tipo IgM sono più frequenti nella fase iniziale dell'infezione; quelli di tipo IgG diretti verso OspA, OspB, OspC e p100 nella fase tardiva (Zoller 1993; Dressler F., 1993). Alcune di queste bande, rilevate dalle IgG sono risultate marcatori rispettivamente dell'artrite cronica di Lyme (bande a 17-18,70-72, Kda) e di neuroborreliosi (bande a 72-74,58,36-37,28,30-33 Kda) (Cinco M. et al., 1995, 1996).

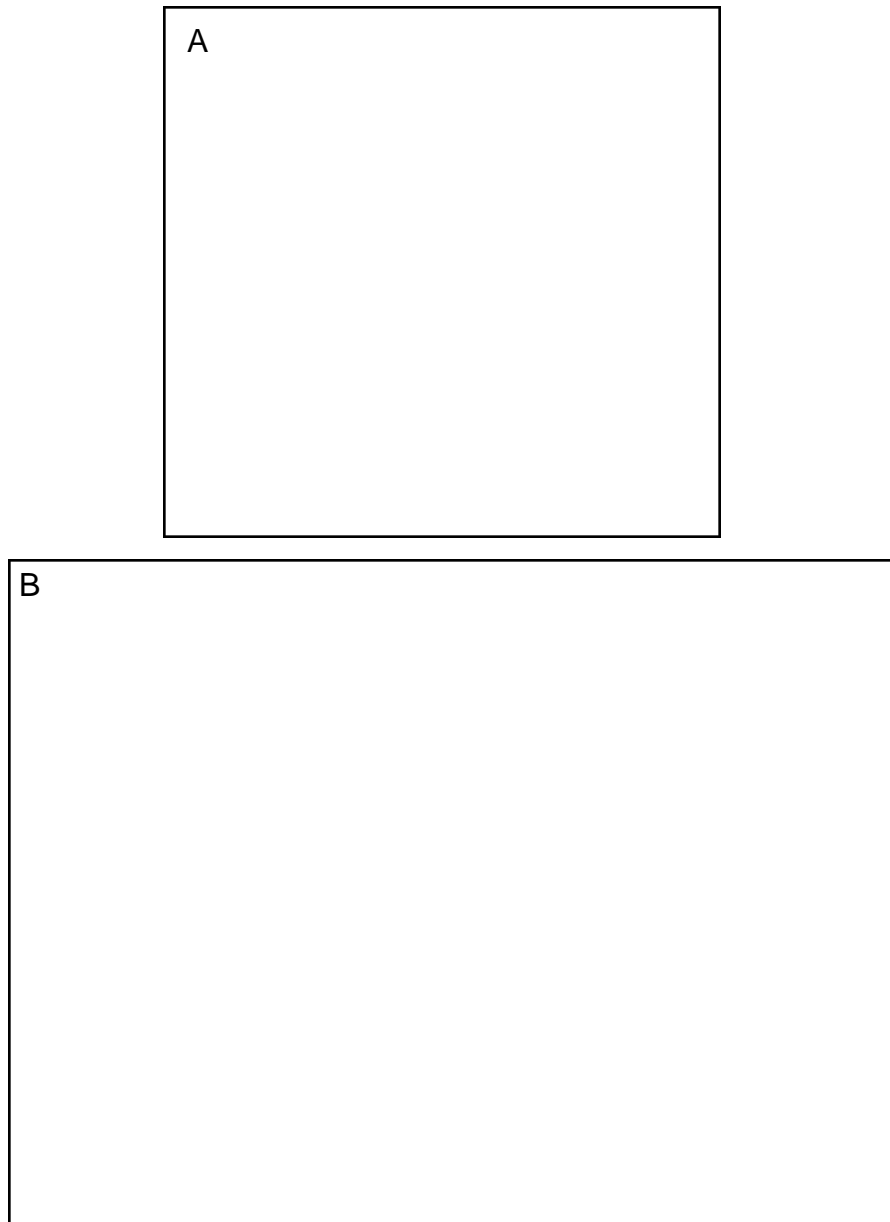


Figura 14. Profili di bande ottenuti mediante Immuno (Western) Blot. A. lane 1: Standard molecolari; lanes 2-7 Lyme iniziale; lane 8 ACA (Lyme tardiva). B. Bandeggio di Western Blot ottenuto con IgG ed IgM in varie fasi della malattia (quale antigene è stato impiegato un ceppo di *B.afzelii*).

Eterogeneità antigenica di *B.b.*

Un ulteriore problema, in Europa, è costituito dalla eterogeneità antigenica di *B.burgdorferi*, per cui il tipo di bande, nell'ambito di un complesso immunodominante, può variare entro un certo intervallo. Ad esempio la proteina di superficie OspA, può presentarsi, nelle varie specie *B.b.* *sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii* e *B. lusitanae* nell'intervallo da 30 a 32 Kda; le OspC da 20 a 23 Kda, etc. Tale eterogeneità non si presenta ad esempio, nei sieri di pazienti Nord Americani, dove l'infezione è prevalentemente sostenuta da *B. burgdorferi sensu stricto* ed il profilo proteico appare piuttosto costante. Sono infatti scarsamente rappresentate le OspC e le P83-100, mentre prevalgono le OspA e la p39.

Polimorfismo antigenico intraspecie: scelta dei ceppi/antigeni.

Tale problematica si riflette nella scelta degli antigeni da impiegare nell'immunoblotting. Siamo ancora lontani dall'impiego di antigeni ricombinanti, perciò si fa ancora ricorso a preparazioni antigeniche costituite dal ceppo in toto. Sorge quindi il problema della scelta dei ceppi. I ceppi impiegati infatti devono esprimere tutti i possibili antigeni immunodominanti che possono essere presenti nell'infezione, in una data area geografica. La precisazione "data area geografica" sta ad indicare che il grado di specificità antigenica non solo è continente specifico, ma addirittura territorio specifico. Così ad esempio, i ceppi isolati localmente, o in territori contigui, esprimono meglio il mosaico antigenico immunodominante presente nell'infezione endemica e dovrebbero venire impiegati nell'immunoblot. E' evidente che tali considerazioni vanno applicate ai laboratori che eseguono Western Blot "in home" e che, quindi utilizzano quali antigeni tre ceppi di isolamento locale, rappresentanti le tre specie principali. Per quanto riguarda i Kit commerciali, il problema è ancora aperto: alcuni propongono un antigene unico, dotato di ampia capacità di "coprire" il polimorfismo antigenico sia in Europa, sia nel Nord America. Altri hanno optato per l'impiego di tre ceppi di isolamento europeo, rappresentanti le tre genospecie. E' evidente che l'industria deve conciliare l'esigenza di una adeguata specificità della reazione con i costi del kit.

Le problematiche di base dell'immunoblotting hanno reso necessaria la costituzione di una Commissione deputata alla Standardizzazione di tale test. Tale Commissione, riunitasi nel corso della seconda Conferenza Nazionale Statunitense sulla diagnosi della BL (Ottobre 1994) ha formulato le seguenti raccomandazioni e criteri:

- 1) L'immunoblot deve essere eseguito nei casi risultati positivi o ambigui dopo i test di screening.
- 2) Nella fase iniziale di malattia devono essere ricercate sia IgM che IgG; nelle fasi tardive, è sufficiente il rilievo delle IgG.
- 3) L'immunoblot è considerato positivo per IgM se compaiono due tra le seguenti bande: OspC (21-24 Kda); 39 Kda; 41 Kda.
- 4) E' considerato positivo per IgG se compaiono 5 tra le seguenti bande: 18 Kda; OspC (21-24 Kda); 28 Kda; 30-33 Kda; 41 Kda; 45 Kda; 58 Kda; 66 Kda; 83-100 Kda

Attualmente una nuova Commissione di laboratoristi Europei (Progetto EUCALB) sta vagliando i criteri di valutazione dell'immunoblotting su sieri esclusivamente europei. I primi risultati ripropongono il Western Blot come reazione di conferma della serologia; sono ancora sotto esame il tipo di bande da considerare quali indici significativi e specifici dell'infezione. Secondo i risultati raccolti in un recente studio (Hauser et al, 1997) ed osservazioni emerse in precedenza (Cinco et al. 1995, 1996), il Western Blot in Europa dovrebbe essere eseguito con almeno due ceppi rappresentanti rispettivamente *B. afzelii* e *B.garinii*. Tali ceppi dovrebbero esprimere abbondantemente le OspC, considerate estremamente specifiche per l'infezione da borrelia. La specificità del bandeggio sarebbe la seguente:

per IgG: p100-83, p58,p43,p39,p30, OspC, p21p17,p14.
 per IgM: forte p41, p39,OspC, p18, p17.

Ciascuno dei ceppi impiegati non è assolutamente capace di identificare la specie di borrelia infettante, se *B. garinii*, *B. afzelii* o *B. sensu stricto*, come taluni continuano a ripetere. Al massimo esiste una **reattività prevalente**, verso una determinata specie/ceppo, da parte di certe sintomatologie cliniche, il che è ben diverso. Noi stessi abbiamo notato una certa prevalenza di reattività da parte di pazienti affetti da neuroborreliosi verso *B. garinii*. Ciò non vuol dire che tale specie era la causa dell'infezione, infatti da alcuni di questi casi, sono stati isolati ceppi di *B. afzelii*.

Detenzione della risposta cellulare

L'infezione da *Borrelia* non sempre dà origine ad anticorpi, persino nella fase cronica, pertanto la serologia può risultare "negativa". Parimenti negativa può risultare nel caso di terapia antibiotica. In entrambi i casi tuttavia i pazienti possono sviluppare una risposta cellulo mediata che può

essere evidenziata in un test di **mitogenicità**. Linfociti T periferici possono infatti essere coltivati per 5 giorni in presenza di antigeni di *Borrelia burgdorferi*; al termine di tale intervallo viene misurata l'incorporazione di timidina radioattiva (Dressler 1991, Roessner 1994). Il test non è stato standardizzato e può essere soggetto ad individualità di interpretazione; esso non appare particolarmente sensibile e specifico, essendosi trovati positivi anche un numero troppo elevato di soggetti non infettati. Inoltre, quando positivo, il test non permette di distinguere tra **infezione acuta e persistente**. Per tali motivi, il test della proliferazione dei linfociti non è di grande aiuto nella diagnosi; esso potrebbe essere raccomandato per una limitata coorte di pazienti seronegativi e in fase tardiva di infezione e, comunque, eseguito ed interpretato da laboratoristi esperti.

Interpretazione e validità dei risultati serologici

Nel caso di infezione recente la serologia può risultare negativa, per cui deve essere ripetuta 4 settimane dopo e, comunque, non deve essere in tal caso esclusa la terapia. La seronegatività ha invece maggior significato nel caso di sospetta Lyme cronica. Di tutti i tests menzionati, è ormai opinione comune che l'immunoblot sia il più affidabile e specifico. Positività per IFA ed ELISA, non confermate da Immunoblot, possono essere causate da una reazione immune non specifica, soprattutto nel caso di ELISA o IFA contenenti anticorpi flagellari e *heat-shock proteins*. Nel caso di sierologia positiva i tests di screening difficilmente possono discriminare tra l'infezione acuta o cronica. L'identificazione della classe di Ig può aiutare, soprattutto se si tratta di IgM; questi anticorpi infatti, se presenti, indicano infezione acuta o di recente acquisizione e danno, in immunoblot, una tipica reattività per la p21, p41 e p58.

Al contrario di quanto accade nella lue, il monitoraggio degli anticorpi quale risposta al trattamento non è attendibile, infatti il titolo anticorpale che tende ad abbassarsi molto lentamente, può persistere anche molto tempo dopo l'attuazione di una terapia antibiotica efficace.

In conclusione il valore diagnostico della serologia della malattia di Lyme è limitato, secondo quanto detto sopra, amenochè non vengano opportunamente associati tests diversi e seguendo determinati criteri.

- Comunque i dati serologici da soli non permettono di formulare una diagnosi o di escludere una malattia in fase acuta o cronica. Essi sono tuttavia di grande supporto al clinico, in un contesto di presente sintomatologia clinica e dati anamnestici, quali ad esempio l'esposizione all'infezione in una zona in cui la BL sia endemica o no.

Capitolo 6 - Terapia della Malattia di Lyme

La terapia della BL si avvale essenzialmente del trattamento antibiotico, eventualmente associato ad altri farmaci: la scelta dell'antibiotico dipende da molti fattori tra cui l'età del paziente, lo stadio della malattia, e la sintomatologia.

Borrelia burgdorferi è, come la maggioranza delle spirochete, estremamente sensibile ai comuni antibatterici. Bisogna tenere presente però che ha la tendenza a rifugiarsi in certi tipi di cellule, quali gli endoteli, le cellule di Langherans, fibroblasti, etc, come pure di localizzarsi in siti dell'organismo dove gli antibiotici possono arrivare in piccola concentrazione, al di sotto della MIC. Per tali motivi, ed a causa anche di interventi tardivi, non raramente la terapia per la BL fallisce. Gli antibiotici impiegati, oltre ad una efficace azione antibatterica in vitro, dovrebbero quindi esercitare un'azione battericida, una buona diffusione nei tessuti, capacità di attraversare la barriera ematoencefalica, penetrare nelle cellule ed avere una lunga emivita.

Gli antibiotici maggiormente efficaci sono riportati in Tab.13, con il loro dosaggio ed in rapporto allo stadio della malattia.

E' da tenere comunque presente che altri antibiotici possono essere presi in considerazione in casi particolari, come il cloramfenicolo, in presenza di meningo-encefalite. Quali effetti deve attendersi il medico dal trattamento antibiotico? L'efficacia sul piano clinico. Patologie non comuni perchè non descritte nella clinica della BL, hanno svelato la loro eziologia da *Borrelia* proprio in risposta alla terapia. La sierologia non sembra essere di aiuto nel monitorare l'efficacia. Nel giro di 24 ore dall'inizio del trattamento si può manifestare una reazione di Jarisch-Herheimer caratterizzata da febbre, cefalea, mialgie, accentuazione della sintomatologia cutanea e nervosa.

In taluni casi è indispensabile ricorrere all'impiego di più cicli antibatterici; è anche proposta l'associazione di più antibiotici soprattutto nelle forme a lunga durata. Si raccomanda anche di usare gli antibiotici ad un dosaggio che permetta di raggiungere nei tessuti coinvolti la minima concentrazione battericida, ben più elevata della MIC.

Una questione ancora insoluta riguarda l'opportunità di trattare o meno soggetti che siano stati morsi dalla zecca, in aree endemiche. Un protocollo che è stato consigliato nelle nostre regioni (Fig. 15) è quello di non trattare il soggetto morso da zecca, ma di farlo tempestivamente allorchè si manifesti l'ECM. E' evidente che tali indicazioni hanno una loro logica in una popolazione debitamente informata da adeguate campagne informative sull'esistenza, trasmissibilità ed effetti della BL, nelle aree endemiche.

STADIO I (per 10-14 giorni)	
Localizzato (ECM)	
Doxiciclina	2 x 100mg/die, os
<i>In alternativa</i>	
Ceftriaxone	1 x 500mg/die os
Amoxicillina	1x 500 mg/die os
Eritromicina	3 x 500 mg/die os
Penicillina V	3 x 1000000 U/die os
STADIO II (per 14-28 gg)	
Neuroborreliosi, artrite cronica, cardite, irite	
Ceftriaxone	1x2 g/die E.V.
<i>In alternativa:</i>	
Cefotaxime	3x2 g/die E.V.
Penicillina G	4x 5000000mg/die E.V.
Doxiciclina	2 x 100 mg/die os
Acrodermatite cronica atrofica ed altre manifestazioni	
Doxiciclina	2 x 100 mg/die os
<i>In alternativa:</i>	
Amoxiciclina	3 x 500 mg/die os
Eritromicina	3 x 500 mg/die os
Penicillina V	3 x 1000000 u/die os

Tabella 13. Terapia della Malattia di Lyme.

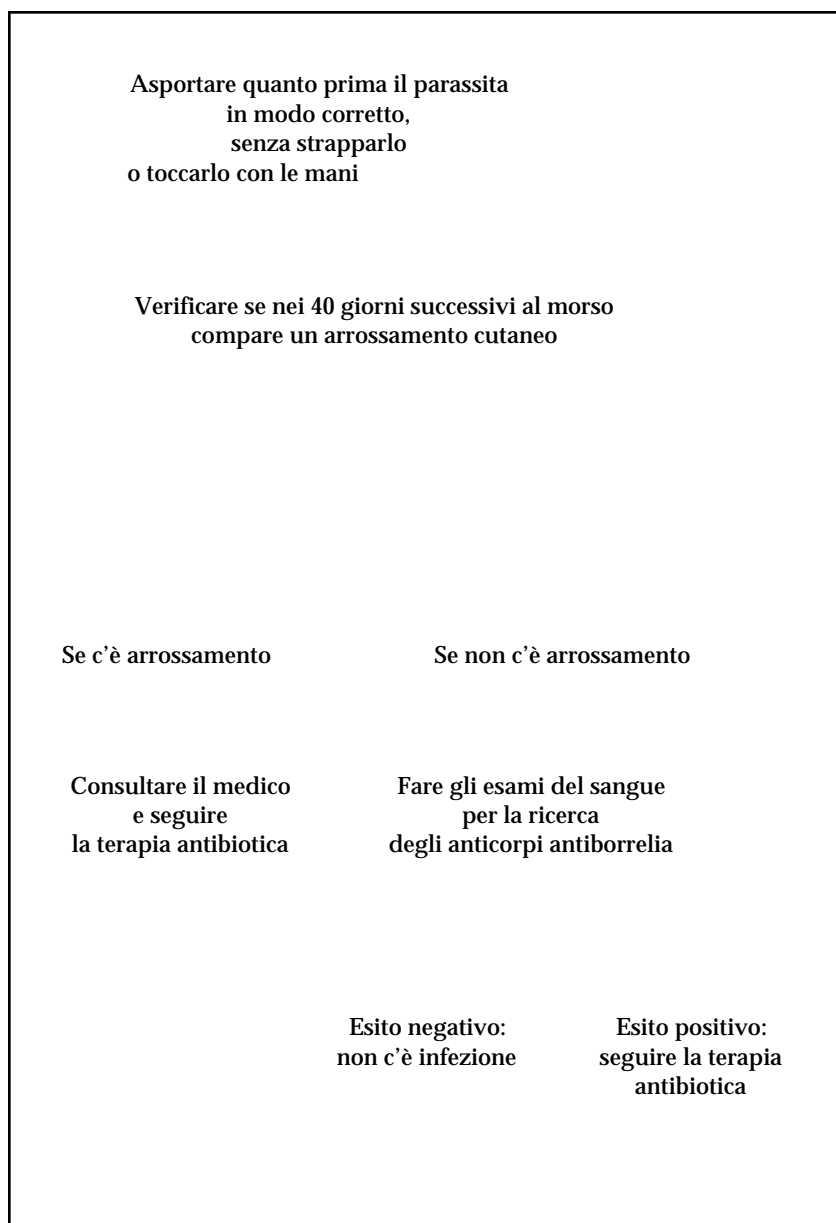


Figura 15. Che cosa fare in caso di morso di zecca.

Capitolo 7 - Prevenzione

Data l'estrema diffusibilità della malattia di Lyme in certe aree geografiche, le conseguenze gravi della malattia e, talvolta, l'incerto esito dell'intervento terapeutico, si rende indispensabile pensare, ed attuare, una serie di misure preventive. Tali misure riguardano vari livelli di attuazione, interessando sia il territorio, che la collettività, che il singolo.

L'Informazione


Una adeguata campagna di *informazione* nei riguardi della *popolazione* residente in aree endemiche è il primo intervento che deve essere fatto dalle autorità competenti. Essa si può esprimere in articoli sul giornale ripetuti ad ogni inizio di stagione, seminari, e poster affissi nei punti chiave della città, come pure nelle Farmacie ed uffici sanitari. Un esempio è quello approntato dalla nostra regione in Figura 16. Avvisi sul rischio d'infezione dovrebbero pure essere appesi agli alberi nelle zone infestate dalle zecche.

Misure di Controllo verso il vettore zecca

a) Contenimento degli animali selvatici (micromammiferi) che fungono da serbatoio oppure da veicoli di grandi quantità di zecche (ungulati). Tali provvedimenti non possono essere attuati interamente, per ovvio rispetto all'ecologia. E' comunque stato dimostrato che il ripopolamento di aree con ungulati o pecore, favorisce enormemente l'arrivo di *Ixodes ricinus*.


b) Monitoraggio del territorio per stabilire il rischio d'infezione da parte di *I. ricinus*. Tale prassi è quella attualmente consigliata a livello Europeo. Come sempre l'informazione e la conoscenza preventiva possono indirizzare verso una prevenzione razionale. E' infatti importante, in una data area in cui si verificano casi di BL, avviare ricerche mirate a:

- stabilire la concentrazione di zecche nel territorio;
- determinare il grado di infezione delle zecche, ovvero la prevalenza di infezione per *B.b.* per singolo ecotopo, ecologicamente definito.
- Sulla base dei dati raccolti stabilire delle correlazioni e definire il rischio di infezione.



LA BORRELIOSI DI LYME

UNA PATOLOGIA DA EVITARE



Essa viene trasmessa all'uomo mediante la puntura di zecca infetta che è il vettore dell'agente responsabile della malattia, ossia della spirocheta "Borrelia Burgorferi"

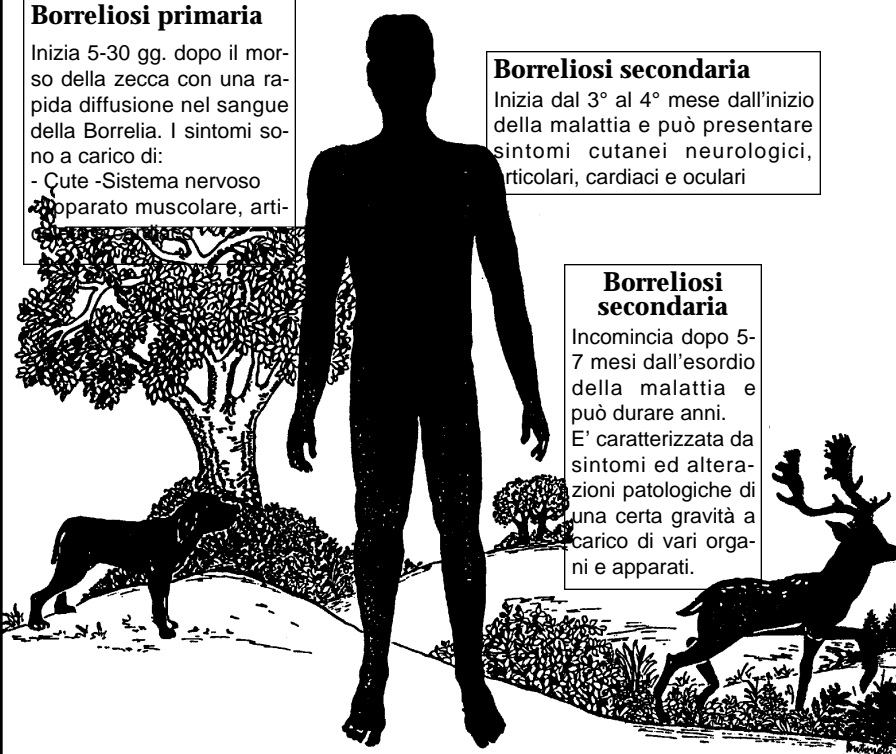
Borreliosi primaria

Inizia 5-30 gg. dopo il morso della zecca con una rapida diffusione nel sangue della Borrelia. I sintomi sono a carico di:

- Cute
- Sistema nervoso
- Apparato muscolare, arti-

Borreliosi secondaria

Inizia dal 3° al 4° mese dall'inizio della malattia e può presentare sintomi cutanei neurologici, articolari, cardiaci e oculari




Borreliosi secondaria

Incomincia dopo 5-7 mesi dall'esordio della malattia e può durare anni. E' caratterizzata da sintomi ed alterazioni patologiche di una certa gravità a carico di vari organi e apparati.

Le zecche infette
Si può incontrare nell'ambiente agrosilvestre e sottoboschivo ed essere veicolate da animali selvatici ed eventualmente domestici. La malattia diffusa in tutti i continenti presenta numerose zone endemiche tra cui il **Friuli Venezia Giulia**

In caso di morso di zecca rivolgersi al proprio medico curante oppure al più vicino "Pronto Soccorso"



REGIONE AUTONOMA FRIULI VENEZIA GIULIA
DIREZIONE REGIONALE DELLA SANITA'

Servizio Igiene e Tutela Ambientale

Figura 16. Manifesto preparato dalla regione Friuli-Venezia Giulia nella campagna preventiva verso la malattia di Lyme.

- Informazione in loco degli ecotopi a rischio (cartelli sugli alberi, all'inizio di sentieri, distribuzione di mappe, etc.

I risultati dovrebbero infine confluire nell'allestimento di MAPPE del rischio, specifiche per ogni territorio esaminato.

E' quanto viene fatto nell'area del Carso triestino, territorio che circonda la città di Trieste, zona ad alta endemicità per la BL. Il mio gruppo di studio in questi anni, in collaborazione con il centro di Ecologia locale, ha individuato (Figura 17) delle stazioni ove raccogliere gli esemplari di zecche, lungo tutto l'arco dell'anno. E' stata stabilita l'incidenza annua della popolazione di zecche, suddivisa in larve, ninfe e adulti, come pure è stata determinata la prevalenza dell'infezione per *B.burgdorferi* nelle zecche, per stazione (Cinco 1996, 97), ricorrendo a metodiche molecolari, come la PCR. Sono state quindi individuate delle zone maggiormente a rischio per la maggiore presenza di zecche infette (70% di infezione) stazioni a media prevalenza (<30%) e a bassa prevalenza (<5%). Le stazioni ad alta prevalenza di infezione corrispondevano a formazioni geologiche peculiari del Carso, chiamate "doline", veri e propri ricettacoli di zecche infette. Areali privi di copertura arborea e con erba falciata risultavano praticamente indenni da zecche.

E' da notare in proposito che il monitoraggio nel territorio di *I. ricinus* è particolarmente importante anche per altre possibili infezioni delle quali risulta essere il vettore in Europa, quali l'encefalite da TBE e l'Ehrlichiosi.

Contenimento della popolazione dei vettori

Tale prassi involve molte operazioni sia a livello di singolo che di collettività. I possibili interventi sono infatti:

- Eliminazione delle zecche dal proprio territorio (giardino) mediante **falciatura** e/o trattamento con **acaricidi**. Entrambe le soluzioni sono temporanee, infatti la prima diventa inoperante con il crescere dell'erba, la seconda ha una durata di pochi mesi e può non essere accettabile sul piano ecologico. Le zecche infatti, scaduto il tempo del trattamento, ripopolano velocemente il territorio.

Merita citare in proposito un esperimento attuato negli Stati Uniti sull'eliminazione mirata delle zecche attraverso l'ospite primario di *B.burgdorferi*, mediante l'acaricida DAMINIX. Tale prodotto infatti, confezionato in batuffoli di cotone contenuti in provettine di carta biodegradabili, è stato distribuito sul territorio. Il topo selvatico, abituale riserva di *B. burgdorferi*, ha la naturale tendenza a trasportare nel proprio nido materiale

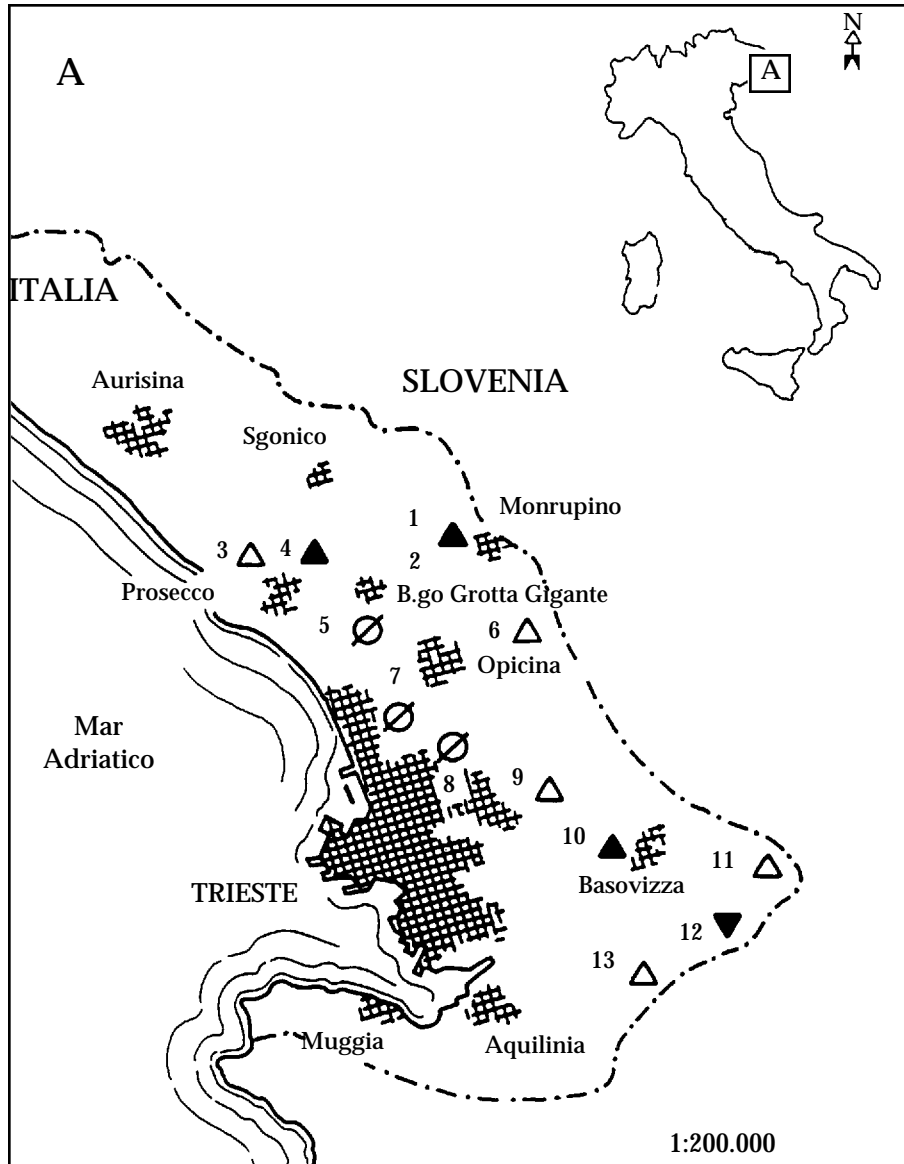


Figura 17. Distribuzione di *Ixodes ricinus* nel Carso. Prevalenza per stazione: >40-70%; <30%; <5%; o nessuna zecca.

morbido ed isolante del calore: il cotone fioccoso con cui è confezionato il DAMINIX all'uopo, costituisce pertanto un'interessante esca, che viene trasportata proprio nella tana dell'ospite, e che, successivamente, in seguito all'attività dell'animale viene distribuito a tutti i componenti del nido. L'uccisione dei vettori avverrà quindi in maniera molto mirata e rispettando l'ecologia. Non mi risulta che tale esperimento abbia avuto un seguito, probabilmente per gli alti costi di attuazione su vasta scala.

Controllo a livello personale

Coloro che si apprestano a recarsi in areali a rischio, (escursionisti, forestali, cacciatori, etc.) dovrebbero:

- vestirsi opportunamente: ossia coprire estremità, soprattutto inferiori con calze chiare (meglio stivali) ed utilizzare pantaloni lunghi.
- piccoli accorgimenti, quali evitare di toccare l'erba lungo il margine dei sentieri, non addentrarsi nell'erba alta, sono oltremodo utili.
- E' imperativo, ultimata l'escursione, un esame attento della propria cute e ovvia rimozione delle zecche eventualmente presenti.
- Presso alcuni presidi sanitari italiani è stata pure adottata la prassi di spruzzare **sugli abiti** degli operatori forestali, prima dell'uscita in areali infestati, acaricidi ed acaro repellenti.
- Trattamento degli animali domestici (cani) con acaro repellenti, prima dell'uscita.

Profilassi vaccinale

Prima di riferire sullo stato dell'arte in tema di vaccino anti-borreliosi di Lyme vorrei richiamare alla mente quella che è il razionale di base sull'immunoprofilassi: il rapporto costo beneficio. Se le misure profilattiche sopra menzionate fossero messe opportunamente in pratica e se il medico di base fosse allertato sulle sintomatologie iniziali della BL (ECM) ed i laboratori a cui riferirsi usassero una corretta strategia nella scelta ed esecuzione dei tests serologici, sono sicura che l'infezione da *Borrelia* verrebbe svelata con una buona probabilità; a questo punto rimarrebbe il problema dell'efficacia della terapia che, se non adeguata e soprattutto non tempestiva, lascia qualche porta aperta all'insuccesso. Tutte queste considerazioni stanno ad indicare

che la corsa alla preparazione di un vaccino per l'infezione da *B.burgdorferi* non è così prioritaria come certa stampa lascia credere. A ciò si aggiungano notevoli perplessità relative alla immunogenicità e grado di protezione possibili, soprattutto in Europa, data l'eterogeneità e diversa espressività degli antigeni in *Borrelia burgdorferi* (Jonsson 1992). Non va sottovalutato inoltre il potere artritogeno di molte componenti del corpo batterico, e la loro capacità di innescare reazioni generalizzate di autoimmunità. Infine va ricordato che non tutti gli anticorpi suscitati da *Borrelia burgdorferi* nell'organismo sono borrellicidi, anzi solo alcuni di essi e non è molto facile valutarne il potere anti spirocheta nell'uomo. A questo proposito infatti è opportuno ricordare che mancano modelli animali in cui riprodurre fedelmente l'infezione e quindi il grado di protezione, ad eccezione delle scimmie.

Vaccini di prima generazione "whole cell"

Il primo vaccino a disposizione è stato prodotto in America per essere utilizzato in campo animale e cioè sui cani. Tale vaccino è costituito da dall'intera cellula di *B.b.* adsorbita e inattivata chimicamente. Questo vaccino non è certamente idoneo ad essere impiegato sull'uomo, trattandosi di cellula intera e quindi capace di suscitare cross-reattività con antigeni self, innescando processi immunopatologici.

Immunogeni purificati: le proteine Osp di superficie

Dovendo quindi ricorrere ad antigeni purificati, non cross reagenti ed efficientemente immunogenici, l'attenzione dei ricercatori si è concentrata sulle lipoproteine di superficie **OspA** ed **OspC**. Di queste il complesso immunodominante OspA, sebbene polimorfico, si è rivelato estremamente protettivo per la cavia, indipendentemente dalla via di introduzione ed utilizzando anche, per il challenge, zecche infettate con *B.burgdorferi* (Fikrig 1992). Si è pure visto che Borrelie contenute nell'intestino di zecche infette, venivano uccise durante il pasto di sangue effettuato da queste su cavie vaccinate. In questo caso è evidente che l'efficacia vaccinale potrebbe estendersi al di fuori dell'ospite vaccinato e che quindi la preparazione con OspA potrebbe svolgere una doppia azione, sia a livello di ospite che prevenendo la trasmissione di *B.b.* dai vettori.

Negli Stati Uniti sono state condotte sperimentazioni sull'efficacia vaccinale di preparazioni di OspA ricombinante lipidata in 10.000 volontari umani (fase III° della sperimentazione), che sembrano promettenti (Keller 1994); ad esempio è stata riscontrata l'innocuità di tale preparazione e la sua formulazione ottimale in associazione con l'idrossido di alluminio.

Vaccini a DNA

Poichè una serie di esperimenti indicavano che la proteina OspA viene scarsamente espressa in vivo, anzi risulta mascherata, si è pensato che risultati migliori si potevano raggiungere utilizzando un "cocktail" di antigeni, ad esempio l'associazione ospA/OspC.

Esperimenti su cavie hanno dimostrato che l'immunizzazione con la OspC porta ad una completa protezione e ciò non è legato necessariamente alla formazione di anticorpi circolanti, quanto ad una immunità cellulare. Di conseguenza al momento attuale vengono sperimentati preparati ricombinanti di OspA ed OspC.

I progressi nell'ambito della biologia molecolare hanno portato allo sviluppo di un vaccino costituito da DNA codificante per la lipoproteina OspA. Il gruppo di ricercatori tedeschi coinvolti in questo magistrale studio, guidati da R. Wallich e M. Simon (Simon1996), ha costruito un plasmide ricombinante contenente il gene per l'OspA che, inoculato per via parenterale in topi BALB, ha indotto una risposta immune capace di proteggere dall'infezione. Tale protezione era tuttavia dovuta alla comparsa di anticorpi circolanti ma non sembrava interessare e coinvolgere i linfociti T, giudicati importanti nella difesa verso *B.burgdorferi*.

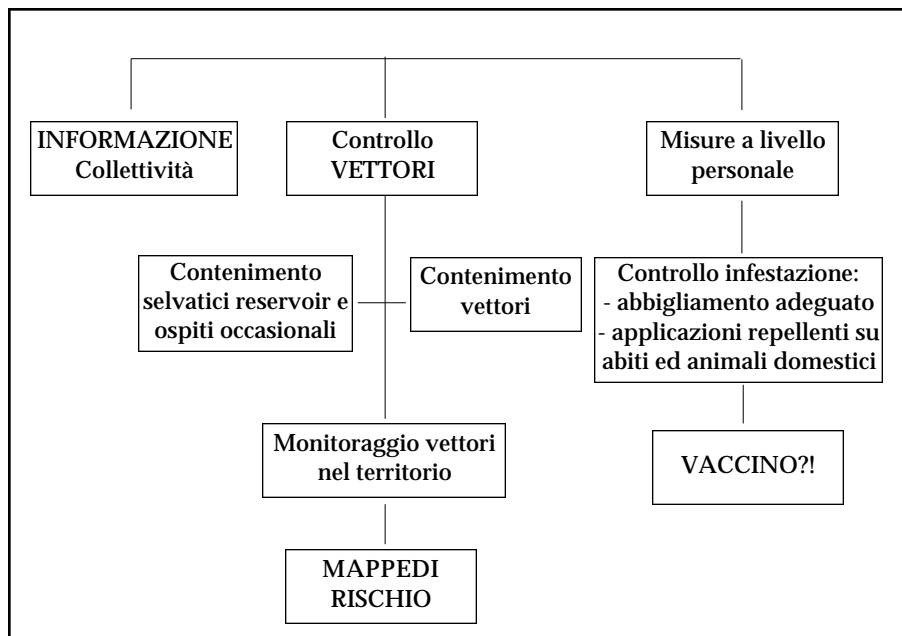


Figura 18. Flusso di prevenzione per la malattia di Lyme.

Lo stesso gruppo ha quindi esaminato diversi epitopi della OspA nativa e ricombinante, trovando regioni peptidiche capaci di stimolare i linfociti T. Ne è seguita la sperimentazione da parte del medesimo gruppo di ricercatori tedeschi Wallich, Kramer e Simon (Wallich, 1977), per conto della Smith Kline Biologicals di un vaccino costituito dalla lipoproteina ricombinante OspA sia nella sua forma nativa purificata che ottenuta per via ricombinante. L'immunizzazione è stata avviata dapprima in topi SCID con ottimi risultati; successivamente il vaccino è stato somministrato a soggetti sani, dimostrando di essere assolutamente innocuo e di provocare la formazione di anticorpi borrelidici. Attualmente è in fase di completamento la sperimentazione su 10.000 volontari scelti a caso ed i dati finora raccolti sembrano promettenti.

Capitolo 8 - Epidemiologia della malattia di Lyme in Italia

Seppure la scoperta della presenza del morbo di Lyme in Italia sia stata abbastanza precoce, ossia nel 1984 (Crovato, 1985), rispetto alla I° descrizione della malattia (1975) e soprattutto alla sua identificazione eziologica (1983), a tutt'ora non esiste un quadro unitario della epidemiologia della BL sul territorio nazionale e le motivazioni in proposito sono tracciate più avanti.

La descrizione del I° caso di BL in Italia è avvenuta a Chiavari, Liguria, nel 1983 ad opera di un dermatologo (Crovato, 1985). Subito dopo veniva descritto, a Trieste, il primo caso di ECM, accompagnato da artrite (Trevisan, 1986) e, nel 1986, (Cinco, 1989), giungeva la conferma della presenza di *Borrelia burgdorferi* nel vettore *I. ricinus*, con l'isolamento del ceppo BITS, risultato appartenere alla specie *B. garinii* (Cinco, 1994). A questi primi ritrovamenti, seguivano un intreccio di scambi ed attività volti a delineare la diagnosi clinica e di laboratorio, nonché la ricerca di *Borrelia burgdorferi* nei vettori e negli ospiti (uomo) e per approfondire le conoscenze sull'epidemiologia e la biologia di tale microorganismo. Su iniziativa del gruppo di reumatologi dell'Istituto Bruzzone di Genova e del Prof. Trevisan (Clinica dermatologica dell'Università di Trieste) e con il contributo della sottoscritta in qualità di Microbiologo, veniva fondato un primo nucleo di ricercatori operanti a livello nazionale denominatosi Gruppo Italiano di Studio sulla Malattia di Lyme (GISML) al quale presto si aggiungevano altre componenti, appartenenti in prevalenza a regioni del Nord Italia, quali Veneto, Trentino Alto Adige, Emilia Romagna, seguiti quindi da Toscana, ed altri ancora. Poiché la casistica della BL cominciava a divenire numerosa e l'impatto della malattia importante, nel 1992 la BL è stata inserita nel novero delle malattie infettive della classe V (D.M. 15.12.90), soggetta quindi a notifica obbligatoria. Nonostante ciò l'approccio alla conoscenza e ricerca della BL sul territorio nazionale, sono ancora disomogenee e sporadiche, per cui ci sono regioni quali il Friuli Venezia Giulia, Liguria, Veneto, Trentino Alto Adige Emilia Romagna in cui l'osservazione dei casi è iniziata precocemente e nelle quali sono stati proposti dei network operativi, e regioni che stanno appena conoscendo il problema BL.

Le cause di ciò sono da ricercare nel polimorfismo della BL, e in una certa difficoltà nel formulare la diagnosi. L'obbligo della denuncia non sembra aver facilitato molto la raccolta dei casi, - a causa della classe in cui è stata inserita la BL. Per una migliore conoscenza della situazione globale italiana è stata organizzata nel 1995 presso Il Centro Ricerche Cliniche per le Malattie

rare "Aldo e Cele Daccò" dell'Istituto Mario Negri in collaborazione con il GISML un'indagine epidemiologica Nazionale della Malattia di Lyme, i cui dati, una volta raccolti ed elaborati, saranno resi noti agli interessati.

Incidenza della malattia di Lyme in Italia

I dati a disposizione sull'incidenza della malattia di Lyme in Italia derivano principalmente da:

- A) Rilevamento dei casi certi;
- B) Studi di siero prevalenza effettuati nella popolazione sana ed a rischio (forestali);
- C) Isolamento di ceppi di *B.b.* da pazienti;
- D) Ricerca di *Borrelia* nel territorio, ossia vettori ed animali riserva.

Casi di BL

Dal 1983 fino al 1996 sono stati descritti almeno 1324 casi accertati di BL. La distribuzione, in base alla regione di appartenenza, conferma che la malattia è maggiormente segnalata nelle regioni storicamente endemiche quali il Friuli-Venezia Giulia, Liguria, Veneto e Trentino Alto-Adige, che supportano il 91,1% dei casi complessivamente identificati in Italia; si presenta allo stato endemico anche in altre regioni quali Emilia Romagna e Toscana; in forma sporadica nelle altre regioni, come riportato in Tabella 14 e Figura 19. Alcune di queste segnalazioni inoltre si riferiscono ad analisi serologiche risultate positive su casi di importazione.

Riguardo il periodo dell'anno, la malattia segue un **andamento stagionale** con un picco che si estende dalla primavera inoltrata ad agosto. Nelle regioni ad alta endemicità le punture delle zecche, e di conseguenza i casi, si susseguono, anche se con minore frequenza, nel periodo invernale.

L'analisi delle **manifestazioni cliniche**, eseguita su un campione di circa 727 casi, ha indicato che l'interessamento cutaneo era prevalente rispetto alle altre manifestazioni, interessando il 57,6% dei pazienti, articolare del 28,6% e neurologico del 23,2% (Figura 20). L'ECM era presente nel 52,9% dei pazienti e rappresentava l'89% delle manifestazioni cutanee osservate.

Il preponderante **interessamento cutaneo** della BL, rispetto alle sintomatologie nervose ed artritiche, riflette l'aspetto geografico latitudinale della malattia: secondo osservazioni emesse dall'OMS (WHO Meeting, Praga, 1990) la prevalenza di determinate manifestazioni cliniche della BL rispetto ad altre, sarebbe correlata, in Europa, con la latitudine, per cui nel Nord Europa prevarrebbero le forme neurologiche della malattia, nel Sud Europa invece, (Paesi dell'area Mediterranea), sarebbero prevalenti le forme dermatologiche.

Regione	n° casi	(Riferimento bibliografico, <u>comunicazione personale</u>)
Piemonte	2	(Fruttualdo <i>et al.</i> , 1990; Marone <i>et al.</i> , 1994)
Valle D'Aosta	*	
Lombardia	17	(Marone <i>et al.</i> , 1994; Braga <i>et al.</i> , 1992; Pistrutto <i>et al.</i> , 1992; Sala <i>et al.</i> , 1992; <u>Vellucci</u> -Min.Sanità; <u>Panuccio</u> -MI)
Trentino-A.A.	80	(Simeoni <i>et al.</i> , 1988; Nava-TN; Zuccaro-BZ)
Veneto	368	(Grazioli, 1995; Trevisan, 1991; <u>Vellucci</u> -Min. Sanità; Lorenziet <i>et al.</i> , 1992; Troi <i>et al.</i> , 1992)
Friuli Venezia G.	528	(GISML, 1992; <u>Vellucci</u> -Min. Sanità)
Liguria	230	(Monteforte <i>et al.</i> , 1996)
Emilia-Romagna	18	(Gaddoniet <i>et al.</i> , 1996; Baldari <i>et al.</i> , 1996)
Toscana	25	(Stefanelli <i>et al.</i> , 1994; Leoncini <i>et al.</i> , 1988)
Umbria	1	(<u>Pacifico</u> -PG)
Marche	2	(<u>Vellucci</u> -Min. Sanità)
Lazio	18	(Burioni <i>et al.</i> , 1989; Caprilli <i>et al.</i> , 1992; Santino-RM)
Abruzzo	15	(Fazii <i>et al.</i> , 1996; <u>Fazii</u> -PE)
Molise	1	(Fazii <i>et al.</i> , 1996)
Campania	5	(Nocerino <i>et al.</i> , 1992)
Puglia	n.q. ¹	
Basilicata	*	
Calabria	*	
Sicilia	13	(Rinaldi <i>et al.</i> , 1991; Salpietro <i>et al.</i> , 1996)
Sardegna	1	(Ruata <i>et al.</i> , 1992)
Italia	1324	

*Nessun caso segnalato o riportato in letteratura; ¹Casi non quantificati

Tabella 14. Casi di Malattia di Lyme in Italia distribuiti per regione (Ciceroni L., Atti Congresso AMCLI, Pescara, 1997).

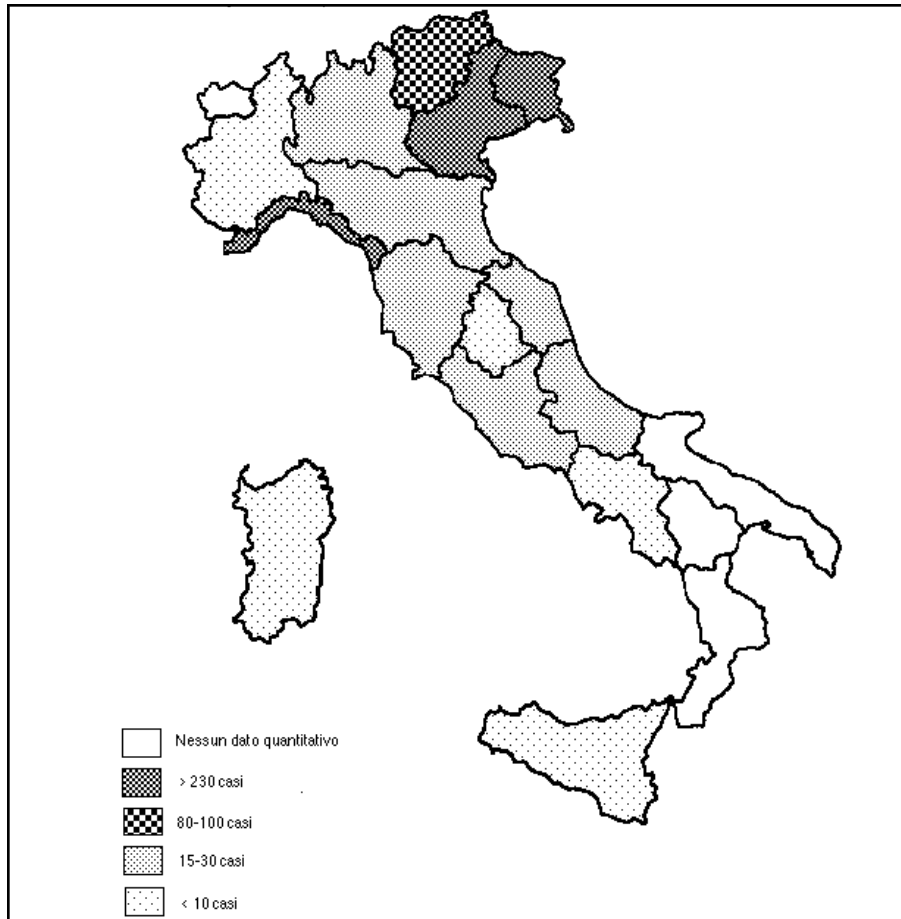


Figura 19. Morbo di Lyme in Italia (casi riportati fino al 1997). (Congresso AMCLI, Pescara).

Dati sulla seroprevalenza nella popolazione sana ed a rischio (forestali)

Come per ogni patologia infettiva, informazioni indirette sulla sua diffusione derivano dalle ricerche di seroprevalenza nella popolazione sana ed in quella a rischio. Nel caso della malattia di Lyme, come per la TBE e, oggi-giorno l'Ehrlichiosi, il rischio dipende dalla possibilità di essere esposti al morso di zecca: di conseguenza addetti alle foreste, cacciatori ed escursionisti, rappresentano le popolazioni pilota in cui cercare anticorpi anti *Borrelia*.

Vanno sottolineati in proposito i limiti insiti in ricerche di questo tipo, a causa della aspecificità dei tests serologici, soprattutto quelli impiegati negli

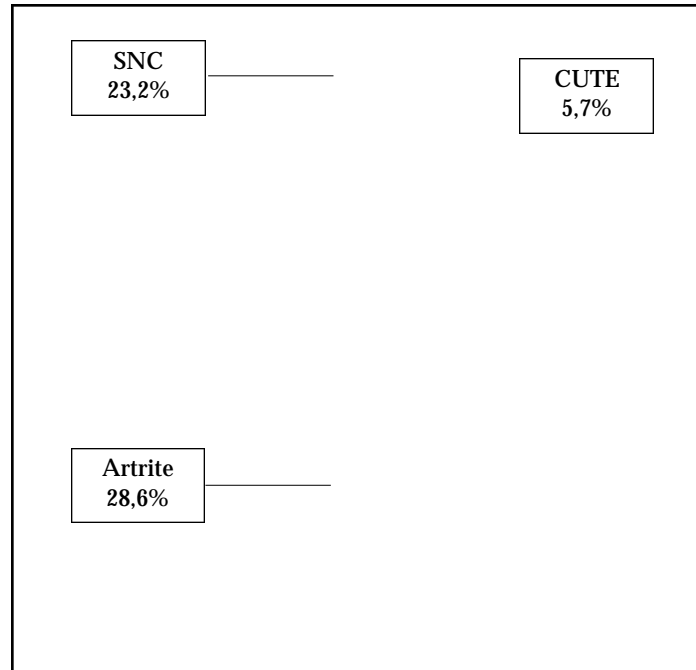


Figura 20. Manifestazioni cliniche della BL in Italia (727 casi).

studi meno recenti. Infatti sia l'Immunofluorescenza attuata senza preadsorbire i sieri, sia i tests ELISA di prima generazione erano viziati da una falsa positività; maggiore credito poteva essere ottenuto associando il Western Blot, saggio che, agli inizi degli anni 90, non era tuttavia ancora disponibile in commercio e pertanto risultava appannaggio di pochi laboratori specializzati. In Figura 21 vengono riportate percentuali di positività anticorpale per *B.b.* riscontrata nei forestali e in individui sani. Si può vedere come, se da un lato per alcune regioni si ripropone una consistente prevalenza (Veneto, Friuli-Venezia Giulia), per altre i dati appaiono discutibili (percentuale dei seropositivi sani in Liguria). Va detto comunque che il dato di seropositività è meramente indicativo, in quanto è ormai noto che la distribuzione della malattia di Lyme si presenta a macchia di leopardo.

Ceppi di *B.burgdorferi* isolati e specie presenti in Italia

Gli isolamenti di ceppi di *Borrelia burgdorferi* sia dal vettore *I. ricinus*, che da ospiti riserva che dai pazienti (Cinco 1988, 1989, 1993, 1994, Burioni 1988, Cacciapuoti 1995, Stefanelli 1994, 1995, Genchi 1994, Gaddoni 1996) hanno permesso di appurare che tutte e tre le principali specie *B.burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, e *B. afzelii* sono presenti in Italia come riportato nella



Figura 21. Seroprevalenze in Forestali/sani - dati da autori diversi.

Figura 22; c'è anche il riscontro indiretto della presenza della specie VS 116 (*B. valaisiana*): sequenze specifiche per questa *Borrelia* reperite a livello dell'interspazio genico compreso tra le sequenze codificanti per i geni *rrf* e *rrl*, sono state trovate in *I. ricinus*, accanto alle specie di *B.b.* tradizionali (Cinco, 1997).

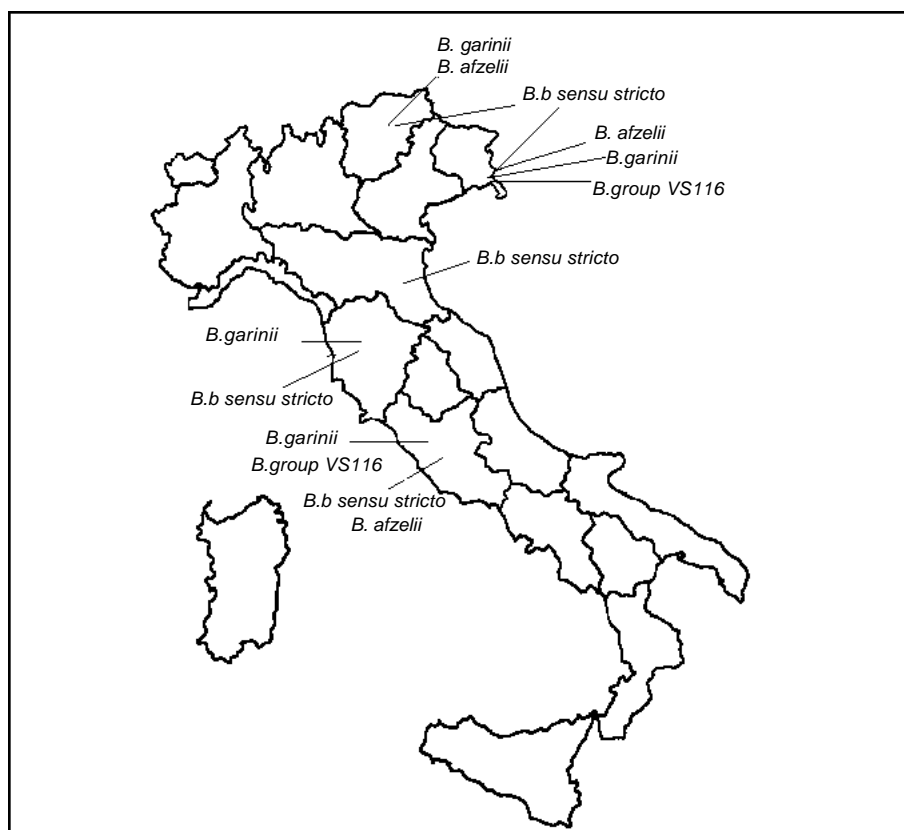


Figura 22. Genospecie di *B.burgdorferi* localizzate in Italia (identificate a Trieste).

Epidemiologia della Malattia di Lyme in Friuli-Venezia Giulia

La regione Friuli-Venezia Giulia è storicamente legata alla BL in quanto - negli anni 80- ha fornito la maggior parte dei pazienti che sono stati studiati e curati presso la Clinica Dermatologica dell'Università di Trieste e presso l'ospedale Civile di Gemona del Friuli.

Incidenza della BL

Anche per questa regione, in cui la BL è endemica, non è ancora stato fatto un censimento complessivo del **numero di casi**, tuttavia disponiamo, sulla base di rapporti presentati a Congressi dal Centro per la Malattia di

Lyme (Clinica Dermatologica, Univ. TS) e da M. Ruscio dell'ospedale di Gemona, di indicazioni e numeri i quali attestano la notevole presenza di questa infezione. Ad esempio, i dati raccolti presso l'Ospedale Civile di Gemona (Dr. Maurizio Ruscio, in corso di stampa), esaminando il decennio 1987-97 indicano la presenza della malattia di Lyme clinicamente evidente in 1684 casi, su 8120 soggetti esaminati; si tratta di cifre rilevanti numericamente (se l'incidenza annuale fosse uniforme avremmo più di 100 casi all'anno) che si riferiscono ad un bacino di utenza non molto esteso (Alto Friuli).

Riguardo le **sintomatologie cliniche prevalenti**, riportate in Tabella 15, si può vedere come, in generale, l'ordine gerarchico delle prevalenze corrisponda a quello riscontrato a livello nazionale (Fig. 20).

Sintomatologia	N°	%
Eritema Cronico Migrante	1061	63
Sintomi Articolari	387	23
Sintomi Neurologici	236	14
ACA	845	
LBC	29	1,7
Cardite	23	1,4

* La prevalenza di una sintomatologia non esclude, com'è tipico della BL, l'interessamento di altri organi ed apparati.

Tabella 15. Sintomatologie prevalenti * osservate in 1684 casi di BL nel - l'Alto Friuli (1987-1997).

Sieroprevalenza della BL nelle guardie forestali del FVG

La ricerca di anticorpi anti *Borrelia* nel siero di tutti gli addetti alle foreste della regione ha permesso di avere ulteriori indicazioni, anche se indirette sulla circolazione di *Borrelia burgdorferi*. Nella primavera ed autunno del 1990 vennero raccolti i sieri di 208 guardie forestali, rappresentanti l'intera popolazione degli addetti all'attività forestale, e saggiati con due tests immunoenzimatici a diversa sensibilità, per la presenza di anticorpi anti-*Borrelia*. Dati relativi al numero di ore trascorse in aree boschive, numero di punture di zecche, eventuali sintomatologie Lyme compatibili accompagnavano ciascun campione. I risultati, indicavano una prevalenza media nelle due stagioni del 19.8 e 22.5%. Tali valori di sieroprevalenza riscontrati in questa categoria a rischio all'atto del primo prelievo era significativamente più alta rispetto alla popolazione di controllo, rappresentata da emodonatori

sani (13,3-14,5%) ed aumentava nei 6 mesi dando un'incidenza di 6,56. Confrontando questi dati con quelli ottenuti in studi analoghi in altri paesi europei, la regione si colloca tra le aree a media prevalenza. La distribuzione delle sieroprevalenze tuttavia non era omogenea, presentando dei picchi, rispettivamente nella stazione di Basovizza (Carso triestino) e di Maniago (Pordenone), ben più elevati rispetto ad altre. Altri dati in proposito sono riportati in Figura 23 ed in bibliografia (Cinco M., 1993). Soltanto 6 soggetti presentavano sintomi Lyme-compatibili, nel primo prelievo: a questi si aggiungevano 8 nuovi sintomatici all'atto del secondo prelievo. Pertanto la maggioranza dei seropositivi era asintomatica: espressione, questa, di una vaccinazione naturale verificatasi durante la stagione di massima attività all'aperto.

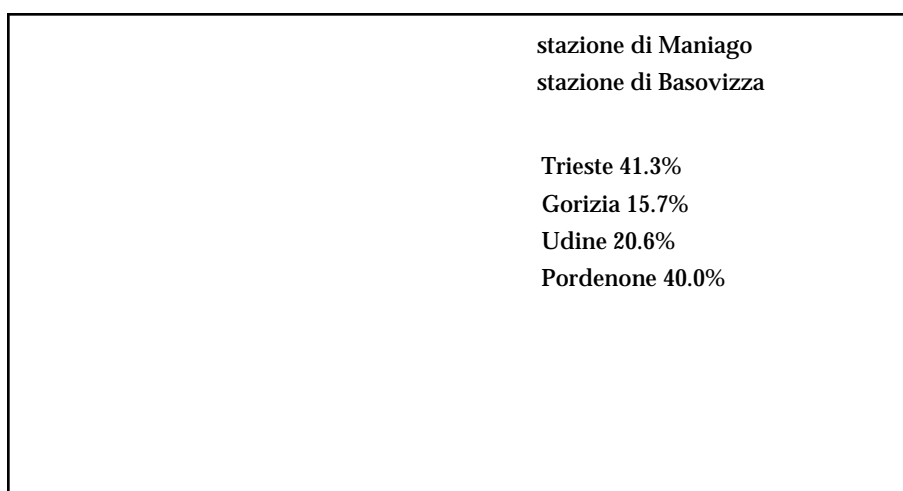


Figura 23. Sieroprevalenze rilevate nei forestalli della regione Friuli Venezia Giulia.

Isolamento e classificazione di ceppi di B.burgdorferi: attività del Laboratorio sulla Spirochete, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Trieste.

Poco dopo la descrizione del primo caso di BL in regione, l'attività di ricerca del Laboratorio sulle Spirochete dell'allora Istituto di Microbiologia dell'Università (ora Dipartimento di Scienze Biomediche) si è rivolta alla ricerca di *B.burgdorferi* nel vettore e nei pazienti. Dopo l'isolamento del primo ceppo italiano da zecca (Cinco 1989), denominato BITS, seguirono altri isolamenti, questa volta da pazienti: i campioni che con maggiore

probabilità davano cultura positiva erano la cute (ECM), scarsamente il sangue e liquor. Un reperto eccezionale è stato l'isolamento di due ceppi di *B.b.* da miocardio, in fase acuta di malattia. A questo proposito, il reperto microbiologico era stato l'unico capace di segnalare l'eziologia della cardite (Cinco, 1993). Da allora ceppi di *B.b.* vengono non solo isolati, ma anche classificati nel nostro laboratorio, sia dal punto di vista genotipico che fenotipico (composizione proteica). Una parziale lista di tali ceppi è riportata in Tabella 16, ma l'elenco complessivo si può reperire nel sito Internet del nostro laboratorio:<www.dfp.UNIV.trieste.it/Spirolab>

Dopo aver sviluppato ed impiegato varie metodiche per individuare il genotipo di appartenenza (Cinco et al. 1993, Stefanelli 1994), da quando le genospecie di *B.b.* sono state delineate, si è fatto ricorso ad una tecnica più celere e di maggiore resa ossia la Reazione Polimerasica a Catena (PCR), amplificando sequenze specie specifiche posizionate sull'operon per l'rRNA 16S (Marconi & Garon, 1992, Cinco,1994). Poichè tale metodica non consente di evidenziare altre specie di borrelie, nel frattempo descritte (Postic et

Ceppo	Genospecie	Origine	Località	Riferimento bibliografico
BITS	<i>B. garinii</i>	<i>I. ricinus</i>	Trieste	Cinco et al. 1988
Alcaide	<i>B.b. sensu stricto</i>	uomo	Roma	Burioni et al. 1988
Nancy	<i>B. afzelii</i>	uomo	Trieste	Cinco et al.1993
Myo1	<i>B. b. sensu stricto</i>	uomo	Trieste	
Myo II	"	"	"	"
D.A.	<i>B. garinii</i>	"	Trieste	"
Gualtieri	<i>B. afzelii</i>	uomo	"	"
Versilia	<i>B.garinii</i>	<i>I. ricinus</i>	Versilia	Stefanelli et al; 1994
BL 1	<i>B. b. sensu stricto</i>	uomo	Belluno	Cinco et al. 1994
BL3-31				
(30 ceppi)	<i>B. afzelii, B. garinii</i>	uomo	Belluno in	stampa
Z10,TDE	<i>B. afzelii</i>	<i>I. ricinus</i>	RFT**	
Z1	<i>B.b. sensu stricto</i>	"	Trieste	
Z3	"	"	RFT	
Z2,L8,Z176				
Z19,Twa	<i>B.garinii</i>	RFT		

* Classificati a Trieste, laboratorio sulle spirochete.
L'elenco completo dei ceppi classificati è riportato nel sito:
<www.dfp.UNIV.Trieste.it/spirolab>
** RFT : Repubblica Federale Tedesca

Tabella 16. Ceppi di *B. burgdorferi sensu lato* isolati in Italia.*

al.,1994), utilizziamo attualmente, ai fini classificatori, una PCR delle sequenze situate nell'interspazio tra i geni *rrf* ed *rri*, seguita da digestione dell'amplificato con enzima MseI. I profili elettroforetici ottenuti dopo migrazione in gel sono caratteristici di ogni specie, come indicato in Figura 24.

Entrambe queste metodiche molecolari vengono impiegate con successo nella identificazione della specie infettante di *B.burgdorferi* anche se presente in piccola quantità, nel campione biologico iniziale. Ciò è molto utile in quanto spesso i ceppi non si adattano al terreno culturale BSK e pertanto rischierebbero di essere perduti prima della loro caratterizzazione.

Prevalenza di *B.burgdorferi* nel vettore *I. ricinus* : mappatura del territorio e definizione del rischio

Le metodiche molecolari sopra citate vengono impiegate, nel nostro laboratorio, anche per stabilire il grado di infezione da *Borrelia* nelle zecche.

Come si è detto nel Capitolo precedente dedicato alla prevenzione, una delle strategie atte al controllo dell'esposizione è il rilevamento dell'infettività di *I. ricinus* in una data area geografica. Poichè il territorio - anche se limitato - si presenta sempre disomogeneo, la presenza di zecche infette è distribuita diversamente nei vari ecotopi dei quali è quindi importante effettuare una mappatura. Il nostro laboratorio si è dunque impegnato in questi anni a tracciare una mappa degli ecotopi a rischio nel Carso triestino: sono già state individuate delle stazioni maggiormente infestate da *I. ricinus* a diverso tasso di infezione per *B.burgdorferi*, come riportato in Figura 20, del precedente capitolo. Attualmente, in collaborazione con l'AREA di Ricerca di Padriciano, stiamo analizzando tutto il territorio, adibito ad area ricreativa, che circonda il l'insediamento del Sincrotrone, sempre nel Carso triestino. Viene valutata la stagionalità di comparsa delle zecche raccolte nel territorio, la loro densità e soprattutto i fattori che possono influenzarla, (falcatura dell'erba, presenza di animali selvatici, etc.). Le tecniche di evidenziazione di *B.b.* sono basate sulla PCR e sono capaci di individuare anche la **genospecie** di *B.burgdorferi* infettante *I. ricinus*. Abbiamo così appurato che, accanto alle tre specie più note di *B.b.* è presente anche il genogruppo *B. valaisiana*, non ancora isolata da pazienti. E' stata inoltre notata una notevole tendenza alla **coinfezione** di *I. ricinus* da parte di più specie di *Borrelia* contemporaneamente, come riportato in Figura 25.

Le prevalenze riscontrate verranno poi correlate a dati ecofaunistici e floristici già rilevati sul territorio, mediante un Programma statistico già elaborato per sviluppare un Sistema Informativo Geografico (GIS), capace di produrre una rappresentazione cartografica di mappe di rischio all'infezione da *B.burgdorferi*.

Ritengo che questa sia una buona pista da seguire, anche se laboriosa e costosa, nella prevenzione sul territorio verso non solo il morbo di Lyme, ma anche altre infezioni potenzialmente trasmissibili dalle zecche.

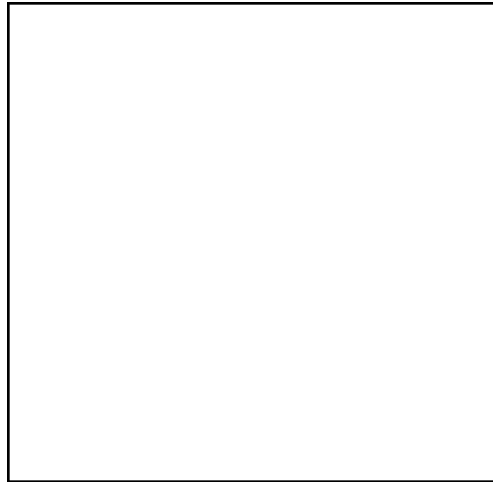


Figura 24. Profili elettroforetici di ogni genospecie di *B. burgdorfei* ottenuti dopo digestione con *Msel*.

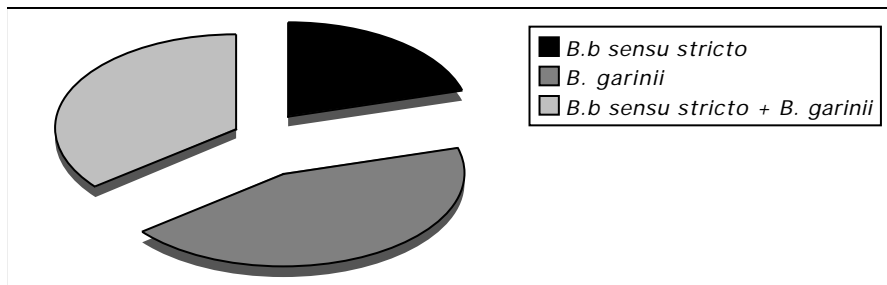


Figura 25. Prevalenza genospecie di *B. b. sensu lato* nel sito A1 (Boschetto).

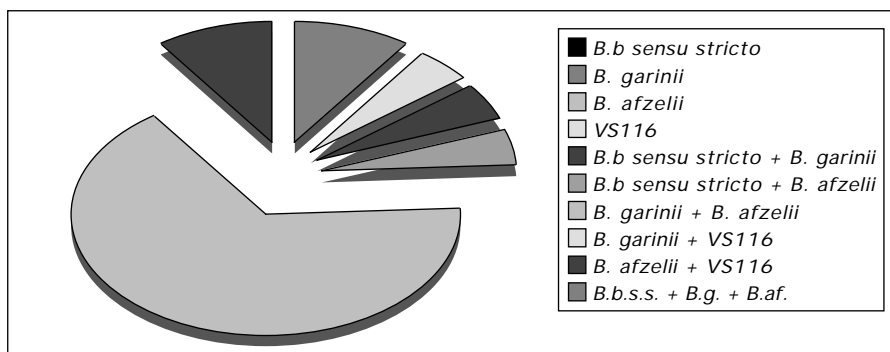


Figura 25a. Prevalenza genospecie di *B. b. sensu lato* nel sito B.

Appendice

Figura 3. Eritema cronico migrante (*Erythema chronicum migrans*).

Figura 4. Linfocitoma da borreliosi.

Appendice

Figura 5. Acrodermatite cronica atrofica (ACA; Acrodermatitis chronica atrophicans).

Figura 11. *B. burgdorferi*. Osservazione in campo oscuro.

Bibliografia

Capitolo 1

1. Afzelius A.: Verhandlungen der dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm, 1090. Arch. Dermatol. Syph. 1910; 101: 404.
2. Bannwarth A.: Chronische Lymphocytare Meningitis, eiszundliche Pleineuritis, und Rheumatismus. Arch. Psychiat. Nervenkr. 1941; 113: 284.
3. Baril C., Richard G., Baranton G., Saint-Giron I.: Linear chromosome of *Borrelia burgdorferi*. Res. Microbiol. 1989; 140: 507.
4. Buchwald A.: Ein Fall von diffuser idiopathischer Hautatrophie. Vjschr. Derm. 1883; 15: 553-556.
5. Burgdorfer W., Barbour A.G., Hayes S.F., Benach J.L., Grunwalt E., Davis J.P.: Lyme disease: a tick borne Spirochetosis? Science 1982; 216: 1317.
6. Barbour A.: *Borrelia* diversity in the mammalian host. VII Congresso Internazionale on Lyme borreliosis. S. Francisco, 16 June, 1996.
7. Canica M., Nato F., DuMerle I., Mazie J.C., Baranton G., Postic D.: Monoclonal antibodies for identification of *B. afzelii* sp. nov., associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. Scand. J. Infect. Dis. 1993; 25: 441 (Fraser C.M. et al. Nature 1997; 390 December, 580).
8. Fraser C.M. et al. Nature 1997; 390 December, 580.
9. Jauris-Heipke S., Liegel G., Preac-Mursic V., Roessler D., Schwab E., Soutschek E. and Wilske B.: Molecular analysis of genes encoding outer surface protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: relationship to OspA genotype and evidence of lateral gene exchange of OspC. J. Clin. Microbiol. 1995; 33: 103.
10. Jauris-Heipke S., Liegel G., Preac-Mursic V., Roessler D., Schwab E., Soutschek E. and Wilske B.: Molecular characterization of the p100 gene of *Borrelia burgdorferi* strain pK0; FEMS Microbiology Letters. 1993; 114: 235.

11. Le Fleche A. Postic D., Girardet K., Peter O. Baranton G.: Characterization of *Borrelia valaisiana* sp. nov. and *Borrelia lusitanae* sp. nov., by 16S ribosomal DNA sequence analysis, two members of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1997; 47: 921-925.
12. Luft B.J., Gorevic B.D., Jiang W., Munoz P., Dattwyler R.J.: Immunologic and structural characterization of the dominant 66 to 73 Kda antigens of *Borrelia burgdorferi*. *Eur. Neur.*1991; 31: 18.
13. Steere G., Malawista S.E., Snyder D.R., Shope R.E., Andiman W.A., Ross M.R., Steele F.M.: Lyme arthritis: an epidemic of oligoarthralgia in children and adults in three Connecticut communities. *Arthritis Rheum.* 1977; 20: 7.
14. Wilske B. et al.: An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with Monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31: 340-350.
15. Zoller L., Cramer J., Failde M.: Western Blot in The Diagnosis of Lyme borreliosis. *Electrophoresis.* 1993; 14: 937.

Capitolo 2

1. Ackermann R., Rhese-Kupper B., Gollmer E., Schmidt R.: Chronic neurologic manifestations of erythema migrans borreliosis. *Ann. NY Acad. Sci.* 1988; 539: 16.
2. Cinco M. & Trevisan G.: Lyme disease, a general survey. *Int. J. Dermatol.* 1990; 29: 1.
3. Cinco M., G. Lardieri A., Salvi F., Camerini and G. Trevisan: Isolation of *Borrelia burgdorferi* from myocardium. *The Lancet* 342, 21, August, 490, 1993.
4. Glasscock M.E., Pensak M.L., Gulia A.J., Baker D.C.: Lyme disease. A cause of bilateral facial paralysis. *Arch. Otolaryngol.* 1985; 111: 47.
5. Steere A.C.: Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* 1989; 321: 586.
6. Trevisan G. & M. Cinco.: Lyme borreliosis: a general survey *Intern. J. of Dermatology.* 1990; 29: 8.

7. Trevisan G. and M. Cinco.: Lyme borreliosis in childhood. *Eur. J. Pediatric Dermatology*.1992; 2: 81.

Capitolo 3

1. Aberer E., Koszik F., Silberer M.: Langherans cells in Lyme borreliosis. 3rd Czech Days on Lyme borreliosis. Prague, 27-29 August 1977.
2. Breitner S., Wurznner R., Schulze J., Brade V.: Heterogeneity in the complement-dependent bacteriolysis within the species of *Borrelia burgdorferi*. *Med. Microbiol. Immunol.* 1997; 185: 253 1997.
3. Cinco M., Murgia R., Presani G., Perticarari S.: Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and metabolic burst induced in phagocytic cells in whole blood by *Borrelia burgdorferi*. *FEMS Microbiol.Lett.* 1994; 122: 187.
4. Cinco M., Murgia R., Presani G., Perticarari.: Integrin CR3 mediates the Binding of nonspecifically opsonized *Borrelia burgdorferi* to human phagocyte and mammalian cells. *Infect; Immun.*1997; 11: 4784.
5. Comstock L.E., Thomas D.D.: Penetration of endothelial cell Monolayers by *Borrelia burgdorferi*. *Inf. Immun.*1989; 57: 1626.
6. Dorward D.W., Fisher R., Brooks D.M.: Invasion and cytopathic killing of human Lymphocytes by spirochetes causing Lyme disease.*Clin. Infect. Dis.* 1997; 25 Suppl: 2.
7. Escudero R., Backenson P.B., Coleman J.L., Benach J.: Characterization of the physiological requirements for the bactericidal effects of a monoclonal antibody to OspB of *Borrelia burgdorferi* by cofocal microscopy.*Infect. Immun.* 1997; 65: 1908.
8. Fikrig E., Liu B., FU L., Das S., Smallwood JI. et al.: An OpsA frame-shift, identified from DNA in Lyme arthritis synovial fluid results in an outer surface proteins that does not bind protective antibodies. *J. Immunol.* 1995; 63: 1658
9. Garcia R., Gusmani L., Murgia R., Guarnaccia C., Cinco M. and Rottini G.: Elastase is the Human Neutrophil Granule Protein Responsible for the In Vitro Killing of the Lyme Disease Spirochete *Borrelia burgdorferi*. accettato ed in press su *Infection and Immunity*.

10. Hulinska D., Basta J., Murgia R., Cinco M.: Intracellular morphological events observed by Electron Microscopy on neutrophil Phagocytosis of *Borrelia garinii*. *J of Spirochetal and Tick-borne Diseases*. 1995; 2: 82.
11. Kochi, S. Johnson R.C., Dalmasso A.P.: Complement-mediated killing of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. Role of antibody in formation of an effective membrane attack complex. *J. Immunol.* 1991; 146: 3964.
12. Leong J., Morrissey P.E., Ortega-Barria E., Pereira M.E.A., Coburn J.: Haemagglutination and proteoglycan binding by the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Inf. Immun.* 1995; 63: 874.
13. Norgards M.V., Riley B.S., Richardson J.A., Radolf J.: Dermal inflammation elicited by synthetic analogs of *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins. *Infect. Immun.* 1995; 63: 1507.
14. Rittig M.G., Krause A., Haupl T., Schaible U.E., Modolell M. et al.: Coiling phagocytosis is the preferential phagocytosis mechanism of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 1992; 60: 4205.
15. Sadziene A., Barbour A.G., Rosa P. and Thomas D.D.: An OspB mutant of *Borrelia burgdorferi* has reduced invasiveness in vitro and reduced infectivity in vivo. *Infect. Immun.* 1993; 61:3590.
16. Sellati T.J., Burns M.J., Ficazzola M.A., Furie M.B.: *Borrelia burgdorferi* upregulates expressing of adhesion molecules of endothelial Cells and promotes transendothelial migration of Neutrophils in vitro. *Infect. Immun.* 1995; 63: 4439.
17. Sigal L.H., Tatum A.H.: Lyme disease patients' serum contains IgM antibodies to *Borrelia burgdorferi* that cross react with neuronal antigens. *Neurology*. 1988; 38: 1439.
18. Silberer M., Koszik F., Stingl G., Aberer A.: Down regulation of MHC class II molecules on Langerhans cells in acrodermatitis chronica atrophicans. *J. Invest. Dermatol.* 1995; 105: 473.

Capitolo 4

1. Burgdorfer W., Hayes S.F., Benach J.L.: Development of *Borrelia burgdorferi* in Ixodid tick vectors. 1988; *Ann. NY Acad. Sci.* 539: 172.

2. Gern L., Burgdorfer W., Aeschlimann A. and Krampitz H.E.: Ecology and Histopathology of Lyme borreliosis. in: Aspects of Lyme borreliosis, Eds. Weber, Springer Verlag, 1992; 59.
3. Hovmark A., Jaeson T., Asbrink E., Forsman A., Jansson E.: First isolation of *Borrelia burgdorferi* from rodents collected in Northern Europe. *APMIS*. 1988; 96: 917.
4. Kirstein F., Rijpkema S., Molkenboer M., Gray J.S.: The distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* genomospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Ireland. *Eur. J. Epidemiol.* 1977; 13: 67.
5. Maroli M., Khoury C., Frusteri L.: Diffusione di *I. ricinus* in Italia. *Giornale Mal. Parass.* 1995; 1: 269.
6. Nakao M., Miyamoto N., Kawagishi N., Hashimoto Y. and Iizuka H.: Comparison of *Borrelia burgdorferi* isolated from humans ixodid ticks in Hokkaido, Japan. *Microbiol. Immunol.* 1992; 36: 1189.
7. Olsen B., Jaeson T.G.T., Noppa L., Bergstrom S.A.: Lyme borreliosis Cycle in Seabirds and *I. uriae* ticks. *Nature*. 1993; 362: 340.
8. Olsen B., Duffy D.C., Jaeson T.G.T., Gylfe A., Bonnedhal J., Bergstrom S.: Transhemispheric Exchange of Lyme disease Spirochetes by Seabirds. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33: 3270.
9. Randolph S.E., Gern E., Nuttal P.A.: Co-feeding ticks: epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitology Today*. 1996; 12: 472.

Capitolo 5

1. Barbour A.: Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J. Biol. Med.* 1984; 57: 521.
2. Cevenini R., Sambri V., Massaria F., Franchini R., Antuono A., Borda G., Negosanti M.: Surface immunofluorescence assay for diagnosis of Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30: 2456.
3. Cinco M., Murgia R., Ruscio M. and Andriolo B.: IgM and IgG significant reactivity to *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* and *B. afzelii* among Italian patients affected by Lyme arthritis or neuroborreliosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 1996; 14: 2-3, 159.

4. de Koning J., Bosma R.B. and A.A.: Hoogkamp-Korstanje. Demonstration of spirochaetes in patients with Lyme disease with a modified silver stain. *J. Med. Microbiol.* 1987; 23: 261.
5. Dressler F., Yoshinari N.H., Steere A.C.: The T-cell proliferative assay in the diagnosis of Lyme disease. *Ann. Med. Int.* 1991; 115: 533.
6. Dressler F., Whalen A.J., Reinhardt N.B., Steere C.A.: Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *J. Infect. Dis.* 1993; 167: 392.
7. Hansen K., Hindersson P., Strandberg Pedersen N.: Measurement of antibodies to the *Borrelia burgdorferi* flagellum, improves serodiagnosis in Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26: 338.
8. Hansen K., Pii K., Lebech AM.: Improved Immunoglobulin M serodiagnosis in Lyme borreliosis by using a capture enzyme-linked immunosorbent assay with biotinylated *Borrelia burgdorferi* flagella. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29: 166.
9. Hauser U., Lehnert G., Lobentanze R., B. Wilske.: Interpretation criteria for standardized Western Blots for three European Species of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35, 1433.
10. Picken M., Picken R.N. Han D., Strle F.: Single tube nested polymerase chain reaction assay based on flagellin gene sequences for detection of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1996; 15: 489.
11. Roessner K., Frkrig E., Russel J.Q., Cooper S.M., Flavell R.A. and Budd R.C.: Prominent T-lymphocyte response to *Borrelia burgdorferi* from peripheral blood of unexposed donors. *Eur. J. Immunol.* 1994; 24: 320.
12. Rosa P.A., Hogan D. and Schwan T.G.: Polymerase chain reaction analyses identify two distinct classes of *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29: 524.
13. Schmidt B.L.: PCR in Laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infection. *Clin. Microbiol. Rew.* 1997; 10: 185.
14. Schwartz I., Wormser G.P., Schwartz J.J. et al.: Diagnosis of early Lyme disease by polymerase chain reaction amplification and culture of skin biopsies from erythema migrans lesions. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30: 3082.

15. Von Stedingk L.V.: PCR in the diagnosis of Lyme borreliosis. 1995.
16. Zoller L., Cremer J., Faulde M.: Western blot in the diagnosis of Lyme borreliosis. *Electrophoresis*, 1993; 14: 937., Negosanti, M. Surface Immunofluorescence assay for diagnosis of Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30: 2456.
17. M. Cinco, Rossella Murgia and Cristiano Costantini: Prevalence of IgG reactivity in Lyme borreliosis patients versus *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* in a restricted area of Italy. *FEMS Microbiology Immunology*. 1995; 12: 217.

Capitolo 7

1. Cinco M., Murgia R., Bonin S., Padovan D., Stanta G.: Detection of the three species of *Borrelia burgdorferi* in *I. ricinus* with Polymerase Chain Reaction. *Alpe Adria Microbiol. J.* 1996; 5, 4: 253.
2. Cinco M., D. Padovan, R. Murgia, L. Frusteri, I. van de Pol, N. Verbeek de Kruif, S. Rijpkema, and M. Maroli.: Infection rate of *I. ricinus* (Acarina: Ixodidae) with *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* and group VS 116 in two areas of low and high rate of endemicity in Italy. *accettato in Europ. J. of Microbiology and Infectious Diseases*, 1997.
3. Fikrig E., Barthold S.W., Kantor F.S. and Flavell R.A.: Long term protection of mice from Lyme disease by vaccination with ospA; *Infect; Immun.* 1992; 60: 773.
4. Jonsson M., Noppa L., Barbour A.G., Bergstrom S.: Heterogeneity of outer membrane proteins of *Borrelia burgdorferi*: comparison of osp perons of three isolates of different geographic origins. *Infect; Immun.* 1992; 60: 1845,
5. Keller D., Koster F.T., Marks D.H., Hosbach P., et al.: *Jama* 1994: 271.
6. Simon M.M., Gern L., Hauser P., Zhong W., Nielsen P., Kramer M.D., Brenner C., Wallich R.: Protective immunization with plasmid DNA containing the outer surface lipoprotein A gene of *Borrelia burgdorferi* is independent of an eucaryotic promoter. *Eur. J. Immunol.* 1996; 26: 2831.

7. Wallich R., Kramer M., Simon M.: A vaccine against Lyme disease. 3rd Czech Days on Lyme borreliosis. Praga, August, 1997.

Capitolo 8

1. Burioni R., R. Grillo, Magaro M., Dettori G.: *Eur. J. Epidemiol.* 1988; 4: 506.
2. Cacciapuoti B., Ciceroni L., et al.: *Microbiologica*.1995; 18: 169.
3. Cinco M., Banfi E., Trevisan G.: I° Convegno Internazionale Malattie Infettive dell'Arco Alpino. Siusi,17-19 Marzo 1988.
4. Cinco M., Banfi E., Trevisan G. and Stanek G.: *APMIS*, 1989; 97: 381-382.
5. Cinco M., De Giovannini R., Fattorini P., Florian F. and Graziosi G.: *Microbiologica*, 1993; 16: 323.
6. Cinco M., Balanzin D., Benussi P., Trevisan G.: *Alpe Adria Microbiology Journal*; 1993; 2: 91.
7. Cinco M., Lardieri G., Salvi A., Camerini F. and Trevisan G.: *The Lancet* 1993; 342, 21, August, 490.
8. Cinco M. and De Giovannini R.: *J. of Clin. Microbiol.*1993; 31: 440-443.
9. Cinco M., Costantini C., Wilske B., Graziosi G., Trevisan G. and Florian F.: *Med. Microbiol. Immunol.*1994; 183: 307-313.
10. Cinco M., Padovan D., Murgia R., Frusteri L., van de Pol I., Verbeek de Kruif N., Rijpkema S. and Maroli M.: Accettato in *Europ. J. of Microbiology and Infectious Diseases*, 1998, a.
11. Cinco M., Padovan D., Murgia R., Frusteri L., van de Pol I., Verbeek de Kruif N., Rijpkema S., Taggi F. and Maroli M.: accettato in *Europ. J. of Microbiology and Infectious Diseases*, 1998, b.
12. Ciceroni L.: *Atti Pescara*, gennaio 1997. In corso di stampa.
13. Crovato F., Nazzari G., Desirello G. de Marchi: *Eritema cronico migrante: malattia di Lyme? Giorn. It. dermatol. Venereol.*1984; 119: 368.
14. Gaddoni G., Pavan W., Bandassari L., Benini F., Gambi G.V., Bandini P.G.: *G. Ital. dermatol. Venereol.* 1996; 131: 15.

15. Genchi C., Rizzoli A.P., Fabbi M., Sambri V., et al. Proceedings of the VI Conference on Lyme Borreliosis. Bologna, Giugno 1994.
16. Marconi R., Garon G. J.: *Clin. Microbiol.*1992; 30:2830.
17. Postic D., Assous M.V., Grimont P.A.D., and Baranton G.: *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1994; 44: 743.
18. Stefanelli S., Paladini A., Conforti P., Leoncini F., Viganò S., De Giovannini R., Cinco M.: *Microbiologica.*1994; 17:3 33.
19. Stefanelli S., Gambi G, Bandini P.G., Paladini A, Cinco M.: *Atti Convegno "Società Italiana Malattie Infettive e Parassitarie "*. Genova, ottobre 1995.
20. Trevisan G., *Malattia di Lyme: Ann. It. Derm. Clin. Sper.* 1986; 40: 91.

Indice

Editoriale	pag.	3
Prefazione	»	5
Cenni storici	»	6
L'agente della Malattia di Lyme: <i>Borrelia burgdorferi</i>	»	6
Classificazione di <i>B. burgdorferi</i>	»	8
Fenotipo antigenico e fenospecie	»	13
Sintomatologia Clinica	»	14
Stadio precoce della LB. (Stadio I°)	»	14
Stadio precoce, infezione disseminata, (Stadio II°)	»	14
Stadio tardivo (Stadio III°)	»	17
Eterogeneità clinica della BL in rapporto alla genospecie di B.b. e continente	»	18
Fattori di patogenicità di <i>Borrelia burgdorferi</i>	»	19
1- Dinamica dell'infezione primaria ed invasione di <i>B. burgdorferi</i>	»	19
Fase iniziale: infezione localizzata	»	19
Fase disseminata: Invasione	»	19
2- L'infezione persistente ed i sintomi della BL tardiva	»	23
Ecologia ed Epidemiologia della malattia di Lyme	»	25
I vettori di <i>Borrelia burgdorferi</i>	»	25
Infezione da <i>B.burgdorferi</i> degli Ixodidi	»	26
Fonti di infezione della zecca ed amplificazione dell'infezione	»	28
Fattori che favoriscono la trasmissione di <i>B.burgdorferi</i>	»	29
Epidemiologia della malattia di Lyme	»	30

Diagnosi Microbiologica della borreliosi di Lyme	» 32
Diagnosi diretta: visualizzazione ed isolamento di B.b	» 32
Ricerca diretta mediante PCR (Polymerase Chain Reaction)	» 33
Diagnosi indiretta: ricerca degli anticorpi anti-Borrelia	» 35
Tests serologici di screening: Immunofluorescenza (IFA) ed Immunoenzimatico (ELISA)	» 35
Immunoblotting	» 39
Stadio dell'infezione	» 39
Eterogeneità antigenica di B.b.	» 40
Polimorfismo antigenico intraspecie: scelta dei ceppi/antigeni. . .	» 41
Detenzione della risposta cellulare	» 42
Interpretazione e validità dei risultati serologici	» 43
Terapia della Malattia di Lyme	» 44
Prevenzione	» 47
L'Informazione	» 47
Misure di Controllo verso il vettore zecca	» 47
Contenimento della popolazione dei vettori	» 49
Controllo a livello personale	» 51
Profilassi vaccinale	» 51
Vaccini di prima generazione "whole cell"	» 52
Immunogeni purificati: le proteine Osp di superficie	» 52
Vaccini a DNA	» 52
Epidemiologia della malattia di Lyme in Italia	» 55
Bibliografia	» 69
Indice	» 78

Caleidoscopio

Italiano

1. Rasso S.: *Principi generali di endocrinologia*. Gennaio '83
2. Rasso S.: *L'ipotalamo endocrino*. Giugno '83
3. Rasso S.: *L'ipofisi*. Dicembre '83
4. Alagna, Masala A.: *La prolattina*. Aprile '84
5. Rasso S.: *Il pancreas endocrino*. Giugno '84
6. Fiorini I, Nardini A.: *Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza)*. Luglio '84.
7. Rasso S.: *L'obesita'*. Settembre '84
8. Franceschetti F., Ferraretti A.P, Bolelli G.F., Bulletti C.: *Aspetti morfofunzionali del - l'ovaio*. Novembre '84.
9. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (1)*. Dicembre '84.
10. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima*. Gennaio '85.
11. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda*. Febbraio '85.
12. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima*. Aprile '85.
13. Nacamulli D, Girelli M.E, Zanatta G.P, Busnardo B.: *Il TSH*. Giugno '85.
14. Facchinetti F. e Petraglia F.: *La -endorfina plasmatica e liquorale*. Agosto '85.
15. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (1)*. Ottobre '85.
16. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda*. Dicembre '85.
17. Nuti R.: *Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale*. Febbraio '86
18. Cavallaro E.: *Ipnosi: una introduzione psicofisiologica*. Marzo '86.
19. Fanetti G.: *AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti*. Maggio '86.
20. Fiorini I, Nardini A.: *Toxoplasmosi, immunologia e clinica*. Luglio '86.
21. Limone P.: *Il feocromocitoma*. Settembre '86.
22. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.: *Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici*. Novembre '86.
23. Bolcato A.: *Allergia*. Gennaio '87.
24. Kubasik N.P.: *Il dosaggio enzimoimmunologico e fluoroimmunologico*. Febbraio '87.
25. Carani C.: *Patologie sessuali endocrino-metaboliche*. Marzo '87.
26. Sanna M., Carcassi R., Rasso S.: *Le banche dati in medicina*. Maggio '87.
27. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.: *L'amenorrea*. Giugno '87.
28. Zilli A., Pagni E., Piazza M.: *Il paziente terminale*. Luglio '87.
29. Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.: *Patologie prostatiche*. Settembre '87.
30. Cingolani M.: *Manuale di ematologia e citologia ematologica*. Novembre '87.
31. Kubasik N.P.: *Ibridomi ed anticorpi monoclonali*. Gennaio '88.
32. Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.: *Diagnostica del carcinoma mammario*. Febbraio '88.

33. Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.: *Neuroendocrinologia dello stress*. Marzo '88.
34. Guastella G., Cefalù E., Carmina M.: *La fecondazione in vitro*. Maggio '88.
35. Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.: *Il gozzo nodulare*. Giugno '88.
36. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (2)*. Luglio '88.
37. Piantino P., Pecchio F.: *Markers tumorali in gastroenterologia*. Novembre '88.
38. Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.: *Le leucemie acute infantili*. Gennaio '89.
39. Sommariva D., Branchi A.: *Le dislipidemie*. Febbraio '89.
40. Butturini U., Butturini A.: *Aspetti medici delle radiazioni*. Marzo '89.
41. Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.: *Diagnostica delle neoplasie colo-rettali*. Aprile '89.
42. Palleschi G.: *Biosensori in Medicina*. Maggio '89.
43. Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.: *HTLV-I*. Giugno '89.
44. Fanetti G.: *Emostasi: fisiopatologia e diagnostica*. Luglio '89.
45. Contu L., Arras M.: *Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie*. Settembre '89.
46. Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.: *Immunologia dell'occhio*. Ottobre '89.
47. Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E.: *Infezioni oppor-tunistiche in corso di AIDS*. Gennaio '90.
48. Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P.: *La coriagonadotropina umana*. Febbraio '90.
49. Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.: *L'immunologia del diabete mellito*. Marzo '90.
50. Cappi F.: *La trasfusione di sangue: terapia a rischio*. Aprile '90.
51. Tortoli E., Simonetti M.T.: *I micobatteri*. Maggio '90.
52. Montecucco C.M., Caporali R., De Gennaro F.: *Anticorpi antinucleo*. Giugno '90.
53. Manni C., Magalini S.I. e Proietti R.: *Le macchine in terapia intensiva*. Luglio '90.
54. Goracci E., Goracci G.: *Gli allergo-acari*. Agosto '90.
55. Rizzetto M.: *L'epatite non A non B (tipo C)*. Settembre '90.
56. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Razzini E. e Gulminetti R.: *Infezione da HIV-1: patogenesi ed allestimento di modelli animali*. Ottobre '90.
57. La Vecchia C.: *Epidemiologia e prevenzione del cancro (I)*. Gennaio '91.
58. La Vecchia C.: *Epidemiologia e prevenzione del cancro (II)*. Febbraio '91.
59. Santini G.F., De Paoli P., Mucignat G., e Basaglia G., Gennari D.: *Le molecole dell'adesività nelle cellule immunocompetenti*. Marzo '91.
60. Bedarida G., Lizioli A.: *La neopterin nella pratica clinica*. Aprile '91.
61. Romano L.: *Valutazione dei kit immunochimici*. Maggio '91.
62. Dondero F. e Lenzi A.: *L'infertilità immunologica*. Giugno '91.
63. Bologna M., Biordi L., Martinotti S.: *Gli Oncogeni*. Luglio '91.
64. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Gulminetti R., Razzini E., Zambelli A. e Scevola D.: *Infezione-malattia da HIV in Africa*. Agosto '91.
65. Signore A., Chianelli M., Fiore V., Pozzilli P., Andreani D.: *L'immunoscintigrafia nella diagnosi delle endocrinopatie autoimmuni*. Settembre '91.
66. Gentilomi G.A.: *Sonde genetiche in microbiologia*. Ottobre '91.
67. Santini G.F., Fornasiero S., Mucignat G., Besaglia G., Tarabini-Castellani G. L., Pascoli L.: *Le sonde di DNA e la virulenza batterica*. Gennaio '92.
68. Zilli A., Biondi T.: *Il piede diabetico*. Febbraio '92.
69. Rizzetto M.: *L'epatite Delta*. Marzo '92.
70. Bracco G., Dotti G., Pagliardini S., Fiorucci G.C.: *Gli screening neonatali*. Aprile '92.
71. Tavani A., La Vecchia C.: *Epidemiologia delle patologie cardio e cerebrovascolari*. Luglio '92.

72. Cordido F., Peñalva A., De la Cruz L. F., Casanueva F. F., Dieguez C.: *L'ormone della crescita*. Agosto '92.
73. Contu L., Arras M.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (I)*. Settembre '92.
74. Ferrara S.: *Manuale di laboratorio I*. Ottobre '92.
75. Gori S.: *Diagnosi di laboratorio dei patogeni opportunisti*. Novembre '92.
76. Ferrara S.: *Manuale di laboratorio II*. Gennaio '93.
77. Pinna G., Veglio F., Melchio R.: *Ipertensione Arteriosa*. Febbraio '93.
78. Alberti M., Fiori G.M., Biddau P.: *I linfomi non Hodgkin*. Marzo '93.
79. Arras M., Contu L.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (II)*. Aprile '93.
80. Amin R.M., Wells K.H., Poiesz B.J.: *Terapia antiretrovirale*. Maggio '93.
81. Rizzetto M.: *L'epatite C*. Settembre '93.
82. Andreoni S.: *Diagnostica di laboratorio delle infezioni da lieviti*. Ottobre '93.
83. Tarolo G.L., Bestetti A., Maioli C., Giovanella L.C., Castellani M.: *Diagnostica con radionuclidi del Morbo di Graves-Basedow*. Novembre '93.
84. Pinzani P., Messeri G., Pazzagli M.: *Chemiluminescenza*. Dicembre '93.
85. Hernandez L.R., Osorio A.V.: *Applicazioni degli esami immunologici*. Gennaio '94.
86. Arras M., Contu L.: *Molecole di Membrana e funzione immunologica. Parte terza: I Infociti B*. Febbraio '94.
87. Rossetti R.: *Gli streptococchi beta emolitici di gruppo B (SGB)*. Marzo '94.
88. Rosa F., Lanfranco E., Balleari E., Massa G., Ghio R.: *Marcatori biochimici del rimodelamento osseo*. Aprile '94.
89. Fanetti G.: *Il sistema ABO: dalla sierologia alla genetica molecolare*. Settembre '94.
90. Buzzetti R., Cavallo M.G., Giovannini C.: *Citochine ed ormoni: Interazioni tra sistema endocrino e sistema immunitario*. Ottobre '94.
91. Negrini R., Ghielmi S., Savio A., Vaira D., Miglioli M.: *Helicobacter pylori*. Novembre '94.
92. Parazzini F.: *L'epidemiologia della patologia ostetrica*. Febbraio '95.
93. Proietti A., Lanzafame P.: *Il virus di Epstein-Barr*. Marzo '95.
94. Mazzarella G., Calabrese C., Mezzogiorno A., Peluso G.F., Micheli P., Romano L.: *Immunoflogosi nell'asma bronchiale*. Maggio '95.
95. Manduchi I.: *Steroidi*. Giugno '95.
96. Magalini S.I., Macaluso S., Sandroni C., Addario C.: *Sindromi tossiche sostenute da principi di origine vegetale*. Luglio '95.
97. Marin M.G., Bresciani S., Mazza C., Albertini A., Cariani E.: *Le biotecnologie nella diagnosi delle infezioni da retrovirus umani*. Ottobre '95.
98. La Vecchia C., D'avanzo B., Parazzini F., Valsecchi M.G.: *Metodologia epidemiologica e sperimentazione clinica*. Dicembre '95.
99. Zilli A., Biondi T., Conte M.: *Diabete mellito e disfunzioni conoscitive*. Gennaio '96.
100. Zazzeroni F., Muzi P., Bologna M.: *Il gene oncosoppressore p53: un guardiano del genoma*. Marzo '96.
101. Cogato I., Montanari E.: *La Sclerosi Multipla*. Aprile '96.
102. Carosi G., Li Vigni R., Bergamasco A., Caligaris S., Casari S., Matteelli A., Tebaldi A.: *Malattie a trasmissione sessuale*. Maggio '96.
103. Fiori G. M., Alberti M., Murtas M. G., Casula L., Biddau P.: *Il linfoma di Hodgkin*. Giugno '96.
104. Marcante R., Dalla Via L.: *Il virus respiratorio sinciziale*. Luglio '96.
105. Giovanella L., Ceriani L., Roncari G.: *Immunodosaggio dell'antigene polipeptidico tissutale specifico (TPS) in oncologia clinica: metodologie applicative*. Ottobre '96.

106. Aiello V., Palazzi P., Calzolari E.: *Tecniche per la visualizzazione degli scambi cromatici (SCE): significato biologico e sperimentale*. Novembre '96.
107. Morganti R.: *Diagnostica molecolare rapida delle infezioni virali*. Dicembre '96.
108. Andreoni S.: *Patogenicità di Candida albicans e di altri lieviti*. Gennaio '97.
109. Salemi A., Zoni R.: *Il controllo di gestione nel laboratorio di analisi*. Febbraio '97.
110. Meisner M.: *Procalcitonina*. Marzo '97.
111. Carosi A., Li Vigni R., Bergamasco A.: *Malattie a trasmissione sessuale (2)*. Aprile '97.
112. Palleschi G., Moscone D., Compagnone D.: *Biosensori elettrochimici in Biomedicina*. Maggio '97.
113. Valtriani C., Hurle C.: *Citofluorimetria a flusso*. Giugno '97.
114. Ruggenini Moiraghi A., Gerbi V., Ceccanti M., Barcucci P.: *Alcol e problemi correlati*. Settembre '97.
115. Piccinelli M.: *Depressione Maggiore Unipolare*. Ottobre '97.
116. Pepe M., Di Gregorio A.: *Le Tiroiditi*. Novembre '97.
117. Cairo G.: *La Ferritina*. Dicembre '97.
118. Bartoli E.: *Le glomerulonefriti acute*. Gennaio '98.
119. Bufi C., Tracanna M.: *Computerizzazione della gara di Laboratorio*. Febbraio '98.
120. National Academy of Clinical Biochemistry: *Il supporto del laboratorio per la diagnosi ed il monitoraggio delle malattie della tiroide*. Marzo '98.
121. Fava G., Rafanelli C., Savron G.: *L'ansia*. Aprile '98.
122. Cinco M.: *La Borreliosi di Lyme*. Maggio '98.

Caleidoscopio
Rivista mensile di Medicina
anno 16, numero 122

Direttore Responsabile

Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
Tel.-Fax 079 270464
Tel. mobile 0338 2202502
E-mail: rassu@ssnet.it

EDITORE

Consulenti di Redazione

Giancarlo Mazzocchi ed
Angelo Maggio

Segretaria di Direzione

Letizia Cuccuru

Servizio Abbonamenti

Fina Grandeppieno
Flavio Damarciasi

Responsabile Ufficio Acquisti

Giusi Cunietti

Via Rio Torbido, 40
16165 Genova (Italy)
Tel. (010) 83401 Numero Verde 167 801005 (senza prefisso);
Telex 270310 Ideal I.
Telefax (010) 803498- 809070.

Internet URL: <http://medicalsistemas.editoria.com> e <http://www.medicalsistemas.it>
La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Journal of Clinical Ligand Assay,
Guida Pratica Immulite[®], Caleidoscopio, Kaleidoscope, Caleidoscopio letterario, Pandora,
Journal of Preventive Medicine and Hygiene, Tribuna Biologica e Medica.

Stampa

Tipolitografia ATA
16143 Genova - Via G. Torti, 32 c.r.
Tel. (010) 513120 - Fax (010) 503320

Registrazione Tribunale di Genova n. 34 del 31/7/1996
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989

Finito di stampare: Maggio 1998
Sped. in Abb. Post. 50%

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento professionale continuo e riservata ai medici.

Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:
"L'ECO DELLA STAMPA"
Via Compagnoni, 28 - Milano