

DIAGNOSI DI LABORATORIO DELLE PIÙ COMUNI MALATTIE TRASMESSE DA ZECCA (TBD, TICK BORNE DISEASE) NEL CANE: ANAPLASMOSI, EHRLICHIOSI, RICKETTSIOSI E BABESIOSI

- BREVE GUIDA ALLA SCELTA E ALL'INTERPRETAZIONE DEI TEST -

La diagnosi di malattia infettiva è spesso complessa e prevede la conoscenza di numerosi aspetti quali l'epidemiologia dell'agente eziologico, la patogenesi della malattia e il riconoscimento della fase in atto (acuta, subclinica, cronica), l'accuratezza dei diversi test disponibili. Vediamo di seguito quali sono le domande fondamentali alle quali dobbiamo rispondere per poter scegliere il corretto iter diagnostico in caso di sospette Ehrlichiosi, Anaplasmosi, Rickettsiosi e Babesiosi.

Quale (o quali) patologia devo indagare?

Per poter rispondere a questa domanda è necessario rispondere ad almeno altre 4 domande....

1. C'è la reale **possibilità che il cane sia stato esposto all'infezione?** Vive o ha soggiornato in zone endemiche per queste patologie ed è possibile che sia stato morso da una zecca (es nessuna prevenzione per ectoparassiti)? E' pur vero che i vettori di queste malattie si spostano geograficamente negli anni e invadono nuove aree, ma considero una TBD assai più probabile in un cane che ha soggiornato sulle coste del Sud Italia piuttosto che in un cane di razza toy che vive in appartamento in centro a Bolzano, sebbene entrambi i pazienti possano presentare una sintomatologia simile.
2. **Da quanto dura la sintomatologia?** I segni clinici si presentano in genere pochi giorni dopo l'infezione (morso di zecca infetta), variano da lievi a gravi e in alcuni casi l'infezione decorre in modo asintomatico. E' molto importante determinare il momento patogenetico della malattia perché a seconda della fase acuta – subacuta – cronica devono essere scelti test diagnostici diversi.
3. **Quali segni clinici sono presenti?** I segni - sintomi in corso di queste patologie si sovrappongono molto e sono piuttosto aspecifici, pertanto la loro valutazione può non essere di grande aiuto nel determinare quale agente eziologico ne è responsabile, ma resta fondamentale sia per sospettare un TBD che per determinare la **fase della malattia**. Nella **fase acuta- subacuta** si osservano febbre, abbattimento, linfadenomegalia, splenomegalia, artralgia, mialgia, petecchie, epistassi, anomalie oculari (es. uveite, corioretinite, emorragie retiniche), segni neurologici o respiratori in casi gravi (infrequenti). Delle patologie in esame solo Ehrlichia è sicuramente responsabile di una **forma clinica cronica**, caratterizzata prevalentemente da severe alterazioni clinico-patologiche (vedi oltre). Per quanto riguarda Anaplasma sia platys che phagocytophilum non sono state chiaramente dimostrate forme croniche clinicamente rilevanti, ma si sospetta che possano essere responsabili di patologie immunomediate secondarie con coinvolgimento renale (glomerulonefriti da immunocomplessi), articolare (poliartriti) o in associazione a citopenie periferiche (soprattutto anemie e trombocitopenie). Babesia può persistere nell'ospite ma in genere si sviluppa dopo la prima infezione una immunità tale per cui non si verificano più crisi emolitiche, nemmeno dopo reinfezione. Vale la possibilità anche per Babesia di evocare forme immunomediate secondarie.

NB: Le Rickettsie presenti in Italia (prevalentemente R. conorii, ma le specie sono numerose) sono poco o nulla patogene e solo in alcuni rari casi possono essere responsabili di una sintomatologia lieve e transitoria (1-2 giorni di durata) caratterizzata da ipertermia abbattimento e linfadenomegalia. E' estremamente improbabile (almeno non è riportato in letteratura) che Rickettsia causi quadri gravi e persistenti. I flussi migratori di uccelli (e relative zecche infette) potrebbero essere responsabili dell'ingresso in Italia di nuove e maggiormente patogene Rickettsie,

pertanto non è possibile escludere che in futuro questi batteri potranno causare forme clinicamente più severe.

4. **Quali alterazioni di laboratorio sono presenti?** le alterazioni ematologiche che si osservano più frequentemente sono le seguenti: trombocitopenia (+++), lieve anemia non rigenerativa, possibili sia leucopenia che leucocitosi. In caso di Babesiosi se non viene instaurata una corretta terapia nel momento di insorgenza dei sintomi clinici, alla trombocitopenia frequentemente segue una anemia emolitica (rigenerativa a partire dal 3°-4° giorno), con conseguenti ittero e bilirubinuria. Altre alterazioni di laboratorio comuni sono aumento della proteina C reattiva, proteinuria, aumento della frazione α -2 in elettroforesi. Nella fase cronica dell'Ehrlichiosi si osservano bi o pancitopenia con anemia non rigenerativa, iperglobulinemia, proteinuria, iperazotemia. NB: la ricerca di tali agenti eziologici su striscio ematico è quasi sempre infruttuosa per Ehrlichia, mentre è più probabile osservare Babesia o Anaplasma, seppure la sensibilità della ricerca su striscio di questi patogeni è moderata o bassa: non averli osservati non consente assolutamente di escluderne la presenza.

Dopo aver risposto alle domande qui sopra, diventa possibile stabilire la probabilità di malattia. A causa della sovrapposizione sia dei quadri clinici che clinico-patologici è possibile sospettare di trovarsi di fronte ad una patologia trasmessa da zecca, ma non a quale in particolare, e diventa pertanto necessario richiedere più test per più malattie.

Quale metodo diagnostico scegliere? PCR o test sierologici?

In quali casi e perché scegliere la PCR?

La PCR è una tecnica dotata di elevata sensibilità analitica, vale a dire che riesce ad amplificare quantità minime dell'agente eziologico (diagnosi diretta). La sensibilità "clinica" (o diagnostica) dipende invece da diversi fattori che devono sempre essere considerati attentamente ed è massima purchè siano rispettate le seguenti indicazioni:

1. **SI'** Se si sospettano Ehrlichia, Anaplasma o Babesia in FORMA ACUTA o subacuta è possibile richiedere l'esame **su sangue periferico**.
 - a. un risultato positivo in associazione al quadro clinico e clinico-patologico compatibili consente di arrivare alla diagnosi.
 - b. Un risultato negativo (in assenza di terapie mirate precedenti) diminuisce moltissimo la probabilità di malattia ma non consente di escluderla con certezza e nel caso persista il nostro sospetto clinico è consigliabile ricorrere ai test sierologici (vedi oltre).
2. **NO** Se il paziente è già in terapia da più di un giorno è molto probabile che non sia più possibile ritrovare nel sangue l'agente eziologico (FALSI NEGATIVI) ed è necessario utilizzare i test sierologici (vedi oltre).
3. **NO** Rickettsia ha batteriemie di bassissima entità e brevissima durata ed è pertanto sconsigliabile ricercarle in PCR su sangue periferico.
4. **NO** (su sangue periferico) Se si sospetta una forma cronica sulla base della clinica e degli esami di laboratorio (Ehrlichiosi, possibile Anaplasmosi) è improbabile che la ricerca su sangue periferico dia esito positivo (falso negativo) e in questi casi la matrice da preferirsi è il **midollo osseo**
 - a. NB raramente alcune forme immunomediate secondarie possono svilupparsi anche dopo la guarigione eziologica (il parassita non è più presente nell'organismo) e quindi in questi casi anche la ricerca su midollo osseo può risultare negativa. In questi casi una positività anticorpale può suggerire una possibile associazione con una precedente infezione.

5. **SI** nel caso in cui vogliamo distinguere tra le varie specie di Anaplasma (platys, phagocitophylum) o Babesia (in Italia principalmente B canis, vogeli, gibsoni), per meglio definirne la patogenicità e la conseguente prognosi.

Sono possibili falsi positivi? La PCR oltre ad essere molto sensibile è anche molto specifica da un punto di vista analitico (identifica correttamente quel determinato agente e non si “confonde” con altri). Per quanto riguarda la specificità “diagnostica” (vale a dire avere un risultato positivo in assenza di forma clinica) in ragione dell’immunità efficace che il cane può sviluppare è possibile ritrovare Babesia anche in pazienti sani (non anemici o trombocipenici perlomeno). Ciò non dovrebbe accadere poiché non bisognerebbe cercare Babesia in un cane sano (o meglio non anemico, non trombocitopenico) e l’unico rischio di misdiagnosi è ritrovarla in un paziente che si è anemico, ma lo è per altre cause.

Sono possibili falsi negativi? Come riportato poco sopra sì, non tanto a causa della sensibilità analitica del test che è molto elevata bensì:

1. se si ricerca il patogeno nel sangue periferico dopo che è già stata instaurata terapia
2. se si ricerca il patogeno nel sangue periferico nella fase cronica, quando ormai non è più presente in circolo

In quali casi e perché scegliere i test sierologici?

I test sierologici per le malattie in esame ricercano gli anticorpi prodotti in risposta all’infezione, in particolare le IgG; le IgM non vengono misurate perché hanno scarso significato diagnostico. Un singolo titolo positivo, sia che il cane sia clinicamente sano sia che presenti una sintomatologia compatibile (ma ricordiamoci che può essere aspecifica...) ci dice semplicemente che il nostro paziente è stato in passato esposto all’infezione. Dopo infezione i titoli possono persistere a vita, in genere si abbassano dopo la guarigione e rimangono bassi, ma talvolta possono restare alti.

I test sierologici sono da preferirsi alla PCR in questi casi:

1. Il paziente è già stato trattato con terapia antibiotica e non è più possibile recuperare il campione di sangue EDTA PRE-terapia
2. il paziente non è più in fase acuta ma viene sospettata una fase cronica: in questo caso o si ricerca l’agente eziologico su midollo oppure si misura il titolo anticorpale (vedi oltre)

Come possiamo allora fare diagnosi utilizzando i test sierologici?

Nel caso in cui sia possibile stabilire che il nostro paziente manifesti la patologia in fase acuta, è sempre indispensabile effettuare due titoli: il primo alla presentazione, durante appunto la fase acuta, e il secondo a distanza di 3-4 settimane. Per correttamente interpretare i risultati dei due test ricordiamo che:

1. nel caso in cui il primo titolo sia misurato in una fase iperacuta (il cane sta male da ieri, ad esempio) è possibile che questo venga negativo o basso, perché la produzione delle IgG comincia 8-12 giorni (circa) dopo l’infezione e talvolta dopo che sono comparsi sintomi clinici. Ciò è particolarmente vero per la Babesiosi, malattia per la quale ha davvero scarso significato un test sierologico in fase acuta (molti falsi negativi).
2. un primo titolo negativo in un cane che presenta la sintomatologia da qualche giorno ci consente con elevata probabilità di escludere la malattia
3. per dimostrare che quel determinato agente eziologico è responsabile del quadro clinico devo verificare un aumento di 3-4 diluizioni del secondo titolo rispetto al primo (es. 1:80 il primo, 1:640 o 1:1280 il secondo). In questo modo ho dimostrato che il paziente ha incontrato molto recentemente il patogeno e sta in quelle settimane siero-convertendo. NB: Iniziare dopo il primo titolo la terapia

antibiotica non arresta la risposta anticorpale; una terapia cortisonica immunosoppressiva potrebbe invece sopprimerla.

4. un primo titolo molto elevato in presenza di un quadro clinico e clinico-patologico suggestivi aumenta molto la probabilità di malattia, ma non consente di diagnosticarla con certezza (poiché titoli elevati possono persistere anche anni dopo l'infezione)

Nel caso in cui si sospetti una **forma cronica** (Ehrlichiosi, oppure malattia immunomediata secondaria ad altra TBD) non esiste purtroppo la possibilità di verificare un marcato aumento del secondo titolo poiché ci troviamo già nella fase di plateau della produzione di IgG. In questo caso un quadro clinico e clinico patologico compatibili unitamente ad un singolo titolo elevato supportano il sospetto diagnostico. È consigliabile associare al titolo la ricerca diretta dell'agente eziologico in PCR (possibilmente su midollo in caso di Ehrlichiosi): un test positivo conferma la diagnosi ma un test negativo, soprattutto su sangue periferico non consente di escluderla con certezza.

Data la complessità della diagnosi di TBD il nostro consiglio è, in caso di dubbi, di rivolgersi ai patologi clinici del laboratorio per discutere insieme ogni singolo caso e per definire di volta in volta il corretto iter diagnostico.

Letteratura consigliata

Di seguito troverete una breve selezione di articoli per approfondire questo argomento. Ulteriori titoli sono disponibili su richiesta.

Comparison of serological and molecular panels for diagnosis of vector-borne diseases in dogs
Ricardo G Maggi, et al Parasit Vectors. 2014; 7: 127.

Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. Sainz Á.
et al Parasit Vectors. 2015 Feb 4;8:75.

A review of canine babesiosis: the European perspective. Solano-Gallego L et al. Parasit Vectors.
2016 Jun 11;9(1):336.

Canine babesiosis in Europe: how many diseases? Matijatko V et al. Trends Parasitol. 2012
Mar;28(3):99-105.

Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. Little SE - Vet Clin North Am Small Anim Pract.
2010 Nov;40(6):1121-40

Ehrlichia and Anaplasma infections - Harrus S, Waner T, Neer TM.. In: Greene CE, ed. Infectious
diseases of the dog and cat. 4th ed. St. Louis, Mo.: Elsevier Saunders, 2012;227-258.