



IZSAM G. CAPORALE  
TERAMO

**Bartonellosi:  
Stato dell'Arte e prospettive diagnostiche**

Teramo, 3 novembre 2016  
Tiziana Di Febo




## Immunoblotting *Bartonella*

- Separazione proteine in base al PM in condizioni denaturanti (SDS-PAGE)
- Trasferimento proteine separate su membrana di nitrocellulosa
- Bloccaggio siti liberi con sostanze proteiche (es. latte scremato in polvere)
- Incubazione con sieri
- Rivelazione reazione Ag-Ab con anticorpi secondari marcati con enzimi (es. HRP) e con opportuni substrati chemiluminescenti o colorimetrici



# Immunoblotting *Bartonella*: possibili applicazioni

- 
- Studio risposta immunitaria a seguito di infezione
  - Monitoraggio terapia antibiotica
  - Ricerca e studio di proteine immunodominanti
  - Studio cross-reazioni tra diversi sierotipi/specie di *Bartonella* e con altri batteri
  - Diagnosi di bartonellosi (test home-made, kit commerciali)




## Immunoblotting *Bartonella*: studio della risposta immunitaria

- I cani rimangono sierologicamente positivi per periodi brevi (alti titoli anticorpali fino a 4 settimane, poi diminuzione titolo) (Pappalardo *et al.*, 2000/2001)
- IgG di gatti infettati sperimentalmente persistono per periodi più lunghi rispetto ai cani (Guptill *et al.*, 2010)
- Osservati casi di gatti e cani infetti da *Bartonella* risultati sierologicamente negativi (Diniz *et al.*, 2007; Duncan *et al.*, 2008)
- Uomo: comparazione risposta immunitaria in cat scratch disease e endocardite infettiva causata da *B. henselae* e *B. quintana* (Houpikian *et al.*, 2003; Saisongkorh *et al.*, 2010)



## Immunoblotting *Bartonella*: monitoraggio terapia antibiotica




Comparazione risposta immunitaria e andamento titolo anticorpale pre- e post-terapia in gatti, cani e uomo (diminuzione titoli nell'87,9% dei gatti e nell'88,6% dei cani infetti da *Bartonella*).  
Diminuzione titoli anticorpali anche in sieri umani.

Hardy W.D., Zuckerman E.E. , 2008.

«A comparative western immunoblot antibody titration test for the evaluation of *Bartonella* therapy»

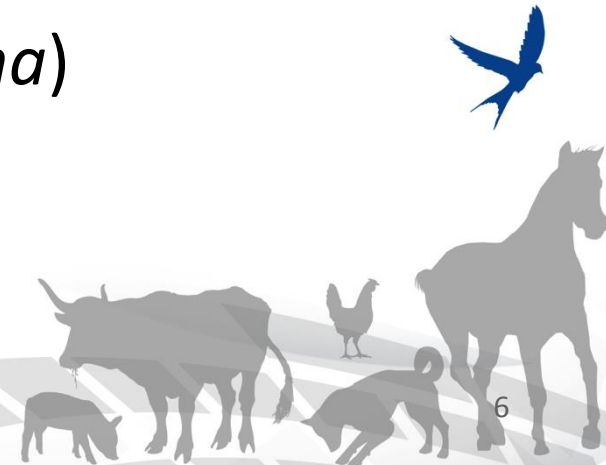


## Immunoblotting *Bartonella*: studio proteine immunogene (I)




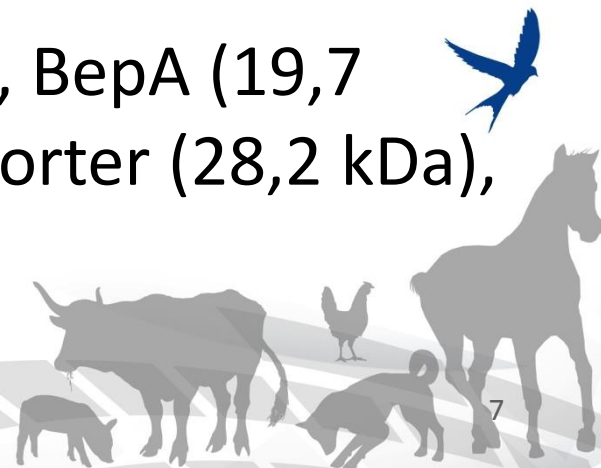
Identificate almeno 25 proteine immunogene con PM compresi tra 97,0 e 7,0 kDa.

- 97 kDa
- 83,0 kDa (non riconosciuta da sieri positivi per Ab vs batteri crossreattivi con *Bartonella*)
- 17,0 kDa (*B. henselae* – *B. quintana*)
- 8,0 kDa




## Immunoblotting *Bartonella*: studio proteine immunogene (II)

- 
- Pap 31 (31 kDa) – *B. henselae*, *B. bacilliformis*  
(Hemin binding protein A)
  - Bad A (340 kDa) – espressa nei ceppi *B. henselae* Marseille, ATCC 49882 (tranne alcune varianti), Freiburg 96BK3 e 96BK38, G-5436; non espressa nei ceppi ATCC 49793, Berlin-1 e maggioranza ceppi Berlin-2 (*Bartonella adhesin A*)
  - GroES (10,7 kDa), Rp1L (12,7 kDa), BepA (19,7 kDa), SodB (23,1 kDa), ABC transporter (28,2 kDa), GroEL (57,6 kDa)





## Immunoblotting *Bartonella*: studio cross-reazioni (I)




• *B. bacilliformis*, *B. henselae*, *B. quintana*, *B. vinsonii*,  
*B. elizabethae*, *B. grahami*, *B. taylorii*, *B. doshiae*, *B.*  
*clarridgeiae*: proteine comuni con PM 120, 104, 85,  
71, 54, 47, 40, 33, 30, 19 kDa (Liang *et al.*, 2000)

- Proteina PM 54 kDa più immunoreattiva
- Antigeni specie-specifici hanno PM < 54 kDa
- Differenze antigeniche tra sierotipi diversi di *B. henselae*



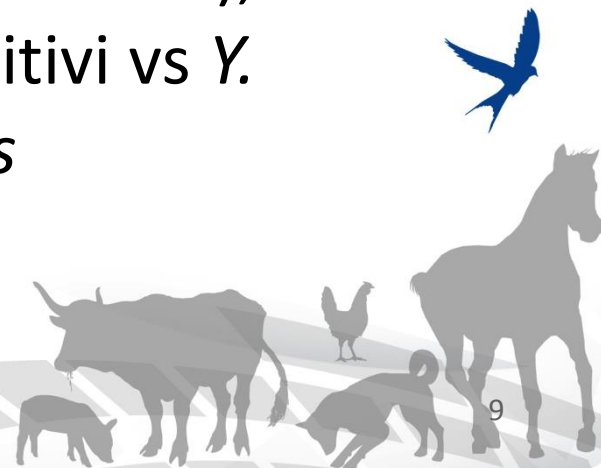


## Immunoblotting *Bartonella*: studio cross-reazioni (II)

- 
- Proteina 43,7 kDa di *B. henselae*: cross-reazioni con sieri positivi vs *Brucella melitensis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Coxiella burnetii*, *Rickettsia typhi*, *Francisella tularensis*

(76,3% omologia con diidrolipoamide succiniltransferasi (SucB) di *B. melitensis*)

- BadA correlata con YadA (*Yersinia adhesin A*), ma nessuna cross-reattività con sieri positivi vs *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*




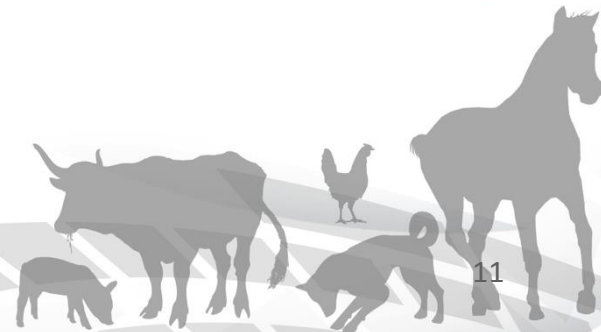
# Immunoblotting *Bartonella*: diagnosi di bartonellosi (I)

- Immunoblotting - ELISA
  - **Batterio intero** (McGill *et al.*, 1998; Freeland *et al.*, 1999; Barnes *et al.*, 2000; Liang *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2002; Houpikian *et al.*, 2003)
  - **Outer membrane proteins (OMP)** (Litwin *et al.*, 1997; Yamamoto *et al.*, 2002; Boonjakuakul *et al.*, 2007)
  - **LPS (???) – PM 3 kDa (R-form) e 20 kDa (S-form)**  
(Zahringer *et al.*, 2004)
- Test home-made (Litwin *et al.*, 1997/2004; McGill *et al.*, 1998; Freeland *et al.*, 1999; Liang *et al.*, 2000; Mallqui *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2002; Houpikian *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2008; Breitschwerdt *et al.*, 2015)
- Kit commerciali

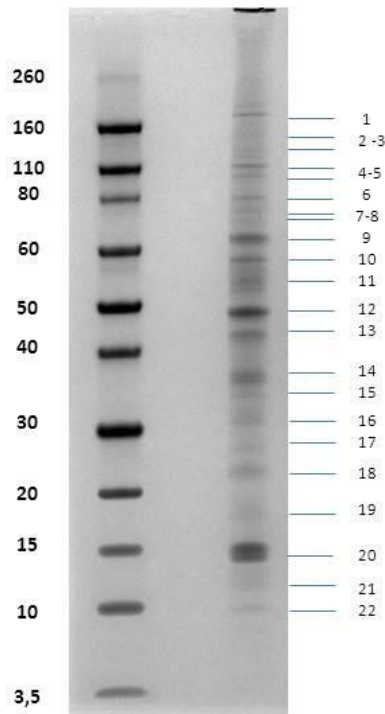


## Immunoblotting *Bartonella*: diagnosi di bartonellosi (II)

- 
- IB-ELISA: fino ad oggi sensibilità e specificità < 100%
  - Necessità di trovare proteine specifiche di *Bartonella* che possano essere utilizzate come markers al fine di migliorare le performances diagnostiche
  - Necessità di un ampio pannello di sieri (gatto – cane – uomo) sicuramente positivi e sicuramente negativi per ottimizzare e validare i test diagnostici



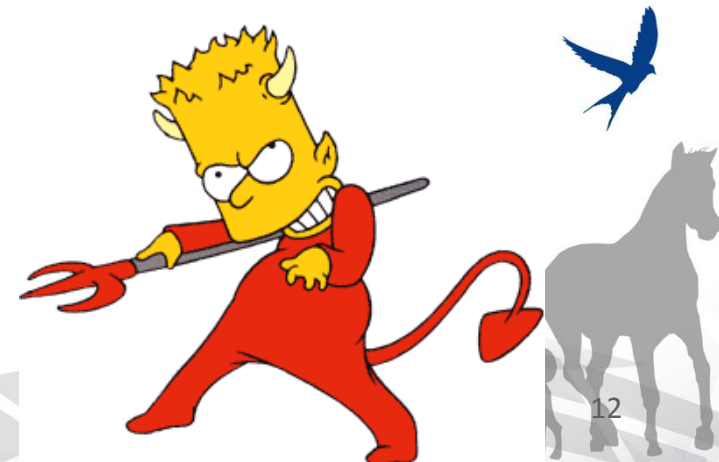
# Immunoblotting *Bartonella*: risultati prove IZSA&M (I)



Gel 4-12%	
N° banda	Peso molecolare (kDa)
1	187
2	155
3	135
4	116
5	110
6	83
7	77
8	72
9	65
10	59
11	55
12	49
13	44
14	37
15	35
16	31
17	28
18	23
19	18
20	15
21	12
22	10

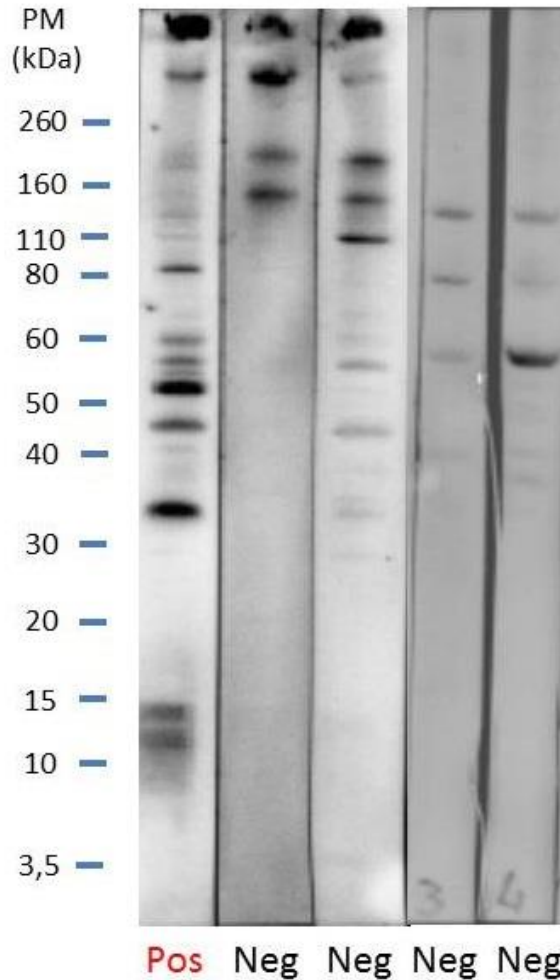
Profilo elettroforetico  
*Bartonella henselae*  
ATCC 49882  
Ceppo Houston-1

Colorazione gel con  
Comassie stain



# Immunoblotting *Bartonella*: risultati prove IZSA&M (II)

SIERI GATTO



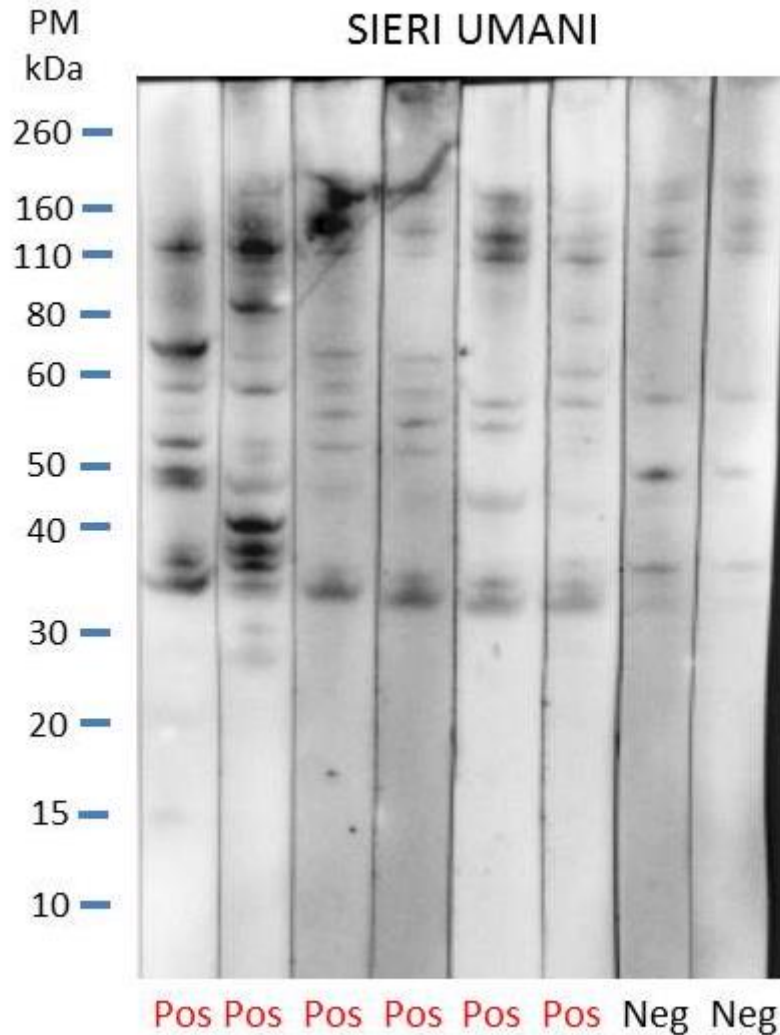
*Bartonella henselae*  
ATCC 49882  
Ceppo Houston-1

Sistema di rivelazione:  
Proteina A-HRP 1:5000  
(profilo delle IgG)

Analisi in chemiluminescenza



# Immunoblotting *Bartonella*: risultati prove IZSA&M (III)



*Bartonella henselae*  
ATCC 49882  
Ceppo Houston-1

Sistema di rivelazione:  
Proteina A-HRP 1:10000  
(profilo delle IgG)

Analisi in chemiluminescenza





**GRAZIE PER L'ATTENZIONE !!!**

