



IZSAM G. CAPORALE  
TERAMO

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

Teramo, 3 novembre 2016

S.A. Angioni



## Batterio intraeritrocitario e intracellule endoteliali principale agente zoonotico della Bartonellosi



- Dominio: Prokaryota
- Regno: Bacteria
- Phylum Proteobacteria
- Classe: Alphaproteobacteria
- Ordine: Rhizobiales
- Famiglia: Bartonellaceae
- Genere : Bartonella
- Specie : henselae

D.J. Brenner, S.P. O'Connor, H.H. Winkler and A.G. Steigerwalt. (1993) Proposals To Unify the Genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with Descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae*, comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and To remove the Family *Bartonellaceae* from the order *Rickettsiales*. Int .J.Syst. Bacteriol ogy - 43(4):777-86.



## Rapporti ISTISAN 16/1



La Bartonellosi (malattia da graffio del gatto) è una zoonosi, malattia naturalmente trasmissibile dagli animali all'uomo che costituisce un problema per la coesistenza uomo/animale

I dati forniti dal Sistema Informativo delle Malattie Infettive sono limitati



**Impatto sottostimato**



**Scarsa conoscenza epidemiologica**



**Graziani C, Duranti A, Morelli A, Busani L, Pezzotti P. Zoonosi in Italia nel periodo 2009-2013  
Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2016. (Rapporti ISTISAN 16/1**

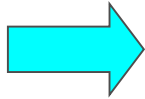


# Bartonellosi (malattia del graffio del gatto)

## Tasso medio di incidenza ricoveri

Rapporti ISTISAN 1/16

**Fonte**



Dati degli archivi delle Schede Dimissione  
Ospedaliera (SDO)

Tasso medio di incidenza dei ricoveri (n. casi / 1.000.000)

Periodo 2009-2013

Calcolato sulla popolazione italiana residente per classe di età,  
sesso e per provincia (ISTAT )



**1,85 / 1.000.000**

*Graziani C, Duranti A, Morelli A, Busani L, Pezzotti P. Zoonosi in Italia nel periodo 2009-2013.  
Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2016. (Rapporti ISTISAN 16/1)*



Incidenza media dei ricoveri per Bartonellosi (malattia da graffio del gatto)  
(Periodo 2009-2013)



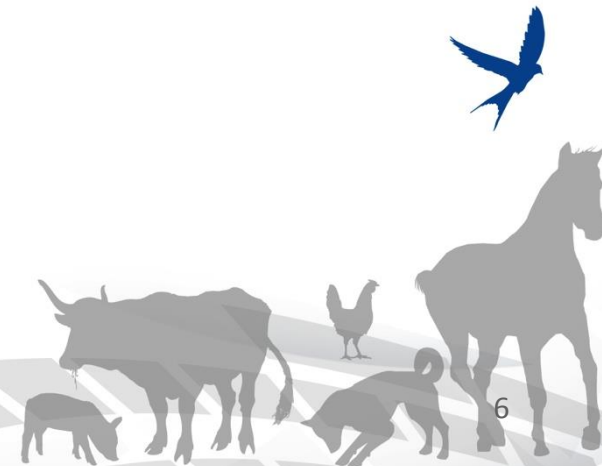
Provincia	Incidenza media di ricoveri (1.000.000)
Teramo	3.19 - 9.06
Pescara	0.01 - 1.90
L'Aquila	0.01 - 1.90
Chieti	1.90 - 3.19


Graziani C, Duranti A, Morelli A, Busani L, Pezzotti P. *Zoonosi in Italia nel periodo 2009-2013*.  
Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2016. (Rapporti ISTISAN 16/1)

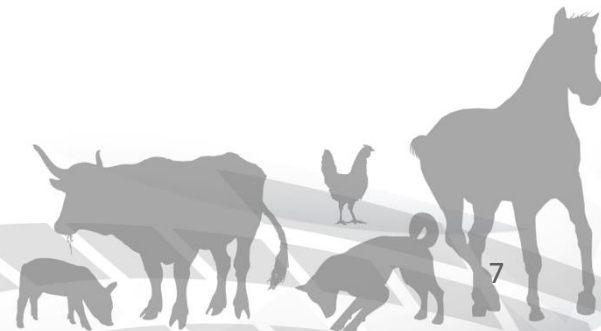



## Obiettivi:

- Studiare la prevalenza di *Bartonella* nel gatto, nel cane, in Abruzzo
- Confermare diagnosi sia in sospetti clinici umani e animali, sia in positivi a test di screening
- Favorire e consolidare un approccio “One Health, nello studio, favorendo collaborazione e comunicazione tra medici e veterinari al fine di condividere informazioni e intenti nella gestione della diagnosi della malattia



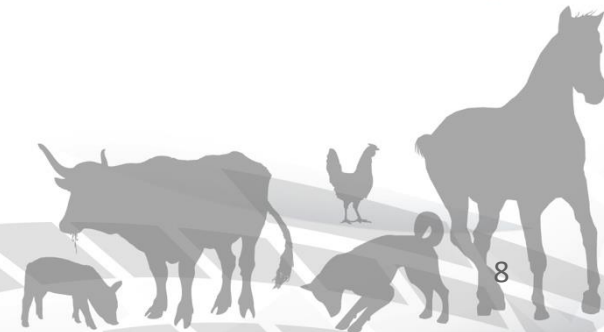
- 
- Validare la tecnica sierologica IFI per la ricerca di anticorpi verso *Bartonella* in sieri, sia animali (gatto, cane), sia umani, da applicare nella diagnosi sierologica della bartonellosi
  - Validare la tecnica sierologica di immunoblotting
  - Valutare i parametri ematochimici dei sieri oggetto di studio (emocromo con formula, profilo biochimico ed elettroforesi delle proteine)





• Mettere a punto la tecnica di ricerca diretta della *Bartonella* mediante isolamento da sangue di animali infetti (metodo colturale, PCR)


- Mettere a punto e validare metodiche innovative di biologia molecolare
- Valutare il confronto tra le tecniche tradizionali di diagnosi indiretta e diretta e le tecniche diagnostiche innovative di biologia molecolare per la diagnosi di laboratorio della bartonellosi





## Stesura:

### ➤ Protocolli operativi:



Coltura ceppo *Bartonella henselae*, su terreni di coltura (AGAR Sangue, terreno liquido (brucella broth con emina e 8% Fildes solution, 37° C in 5% CO<sub>2</sub>)

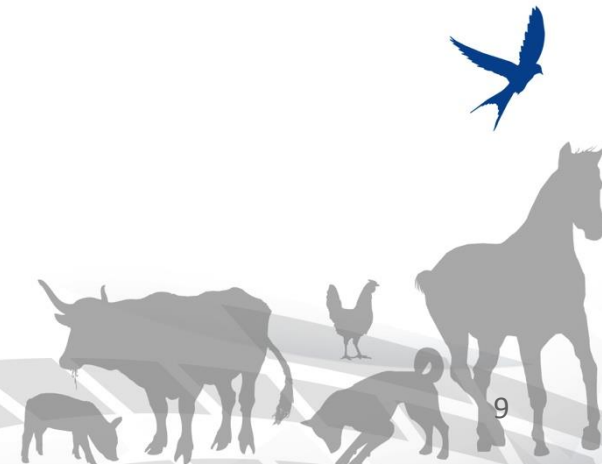
- Mantenimento linee cellulari L929, fibroblasti di topo
- Mantenimento *Bartonella henselae* in cellule L 929, 37° C in 5% CO<sub>2</sub>
- Produzione Antigene per prova IFI
- Allestimento vetrini, prova e lettura IFI per la diagnosi di bartonellosi

### ➤ Scheda Terreno per Bartonella e produzione terreno

### ➤ Protocollo validazione del metodo IFI

### ➤ Protocolli diagnostici

- ### ➤ Schede anamnestiche:
- ➔ Animale
  - ➔ Uomo



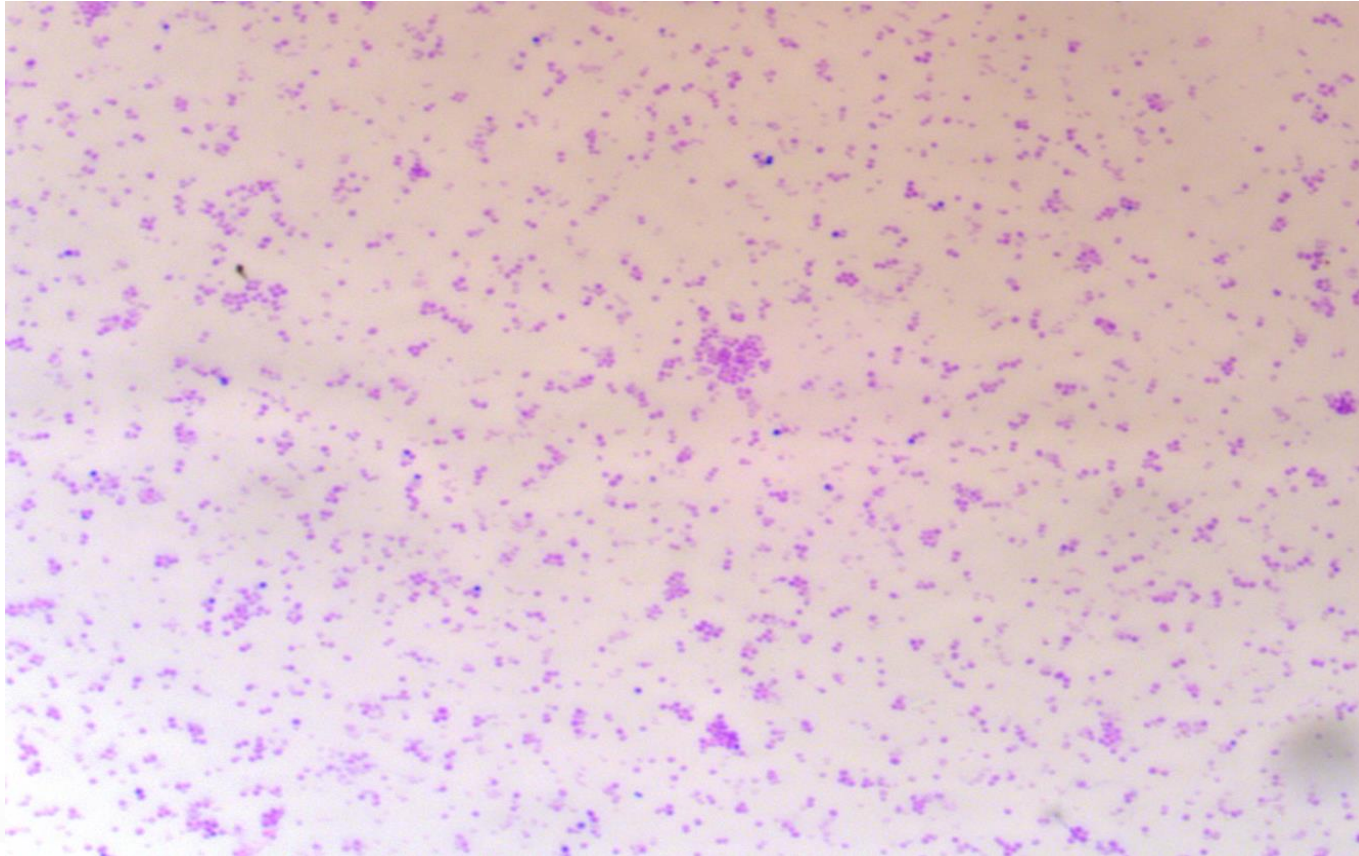
# *Bartonella henselae* ATCC 49882 Houston1 AGAR Sangue 37° C in 5% CO<sub>2</sub>



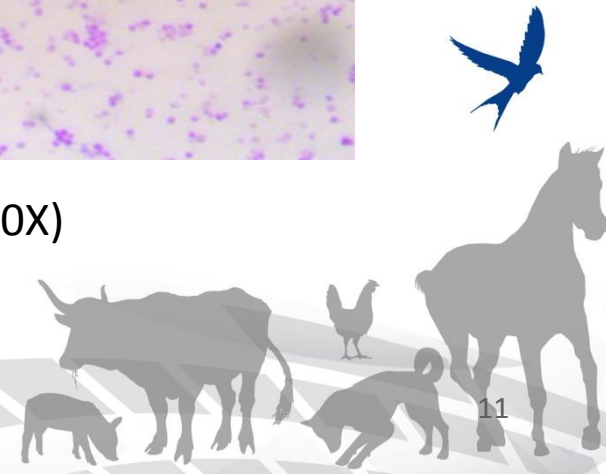
R. Zobba, G. Chessa, S. Mastrandrea, M.L. Pinna Parpaglia, C. Patta and G. Masala (2009). Serological and molecular detection of *Bartonella* spp. in humans, cats and dogs from Northern Sardinia, Italy. *Journal Compilation, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15 (Suppl. 2): 134-135.

# *Bartonella henselae* ATCC 49882 Houston 1

## Colorazione Gram



Batterio pleomorfo Gram negativo (100X)

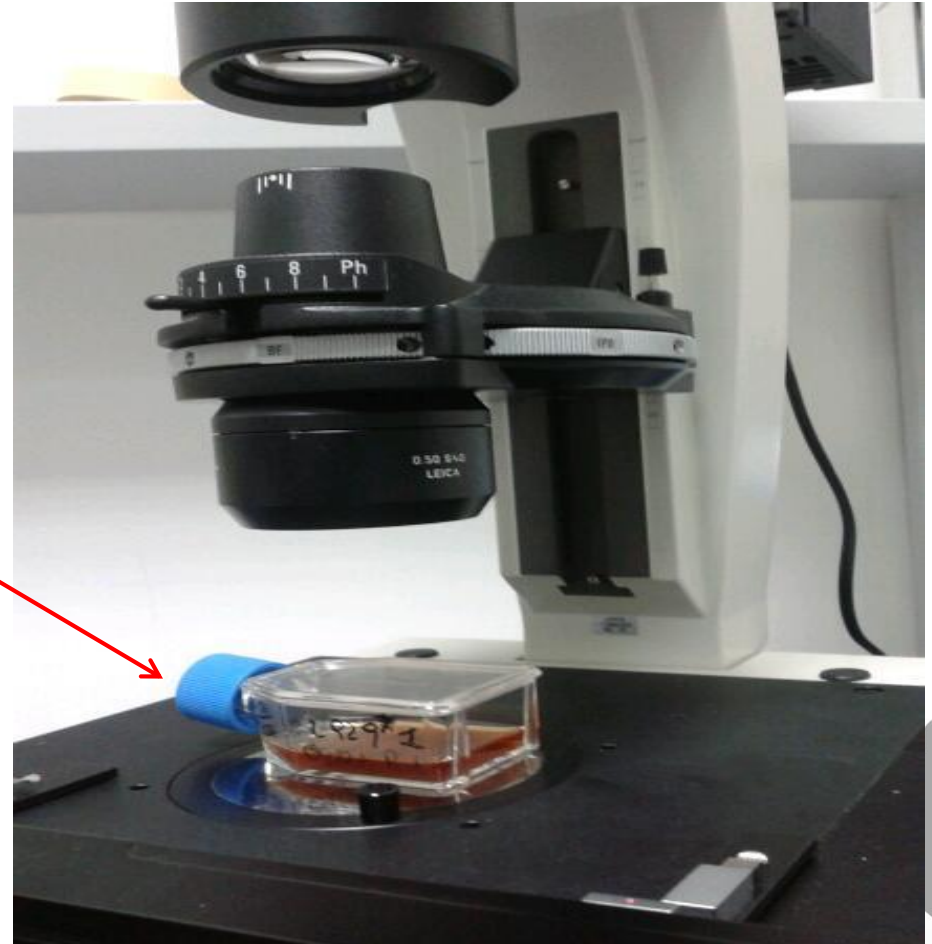


***Bartonella* da AS in brucella broth con emina e 8% Fildes solution, 37° C - 5% CO<sub>2</sub>**



## Amplificazione antigene *Bartonella*

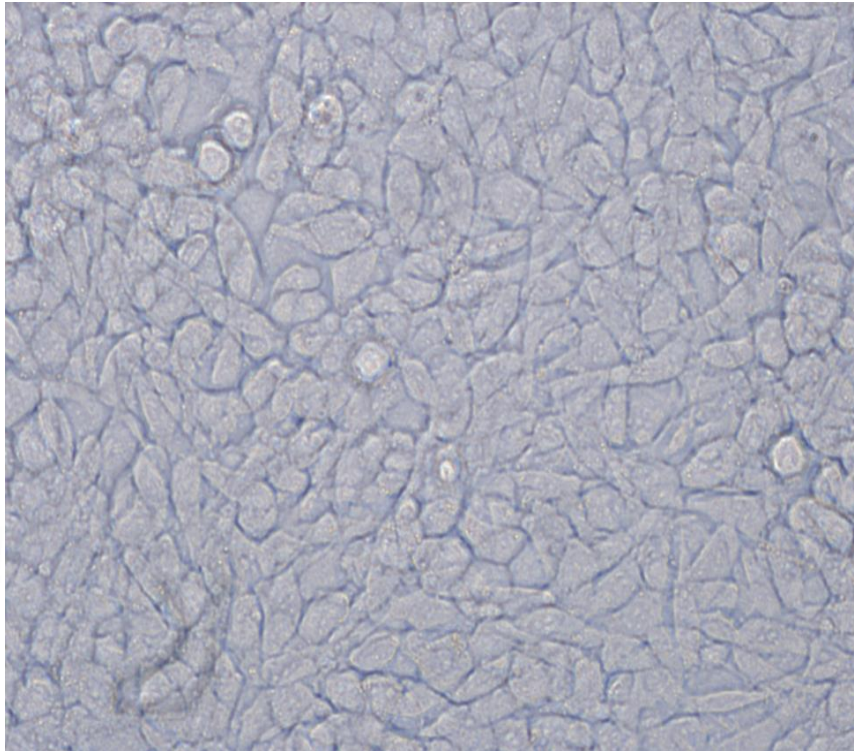
Flask (25cm<sup>2</sup>) con substrato di cellule L929 con *Bartonella*, al microscopio



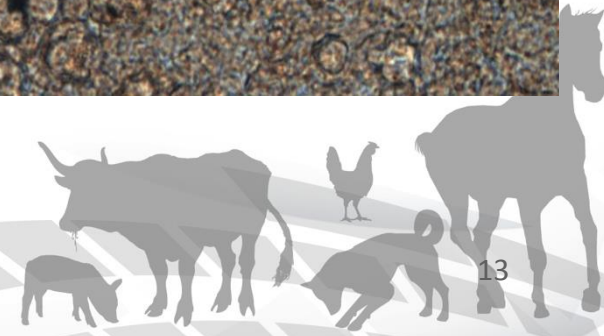
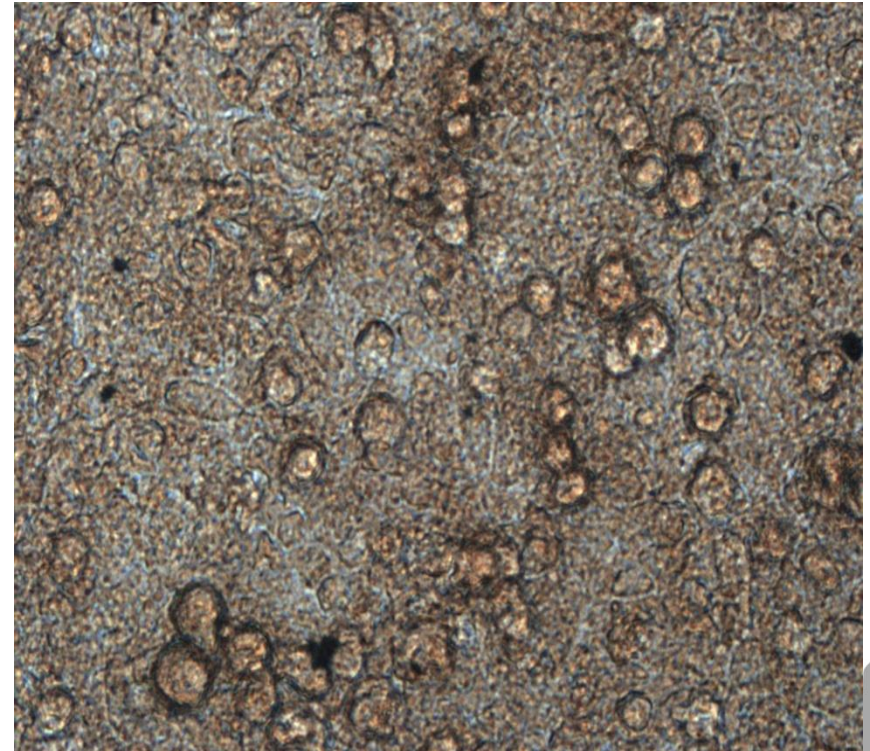
## *Bartonella henselae* in cellule L929

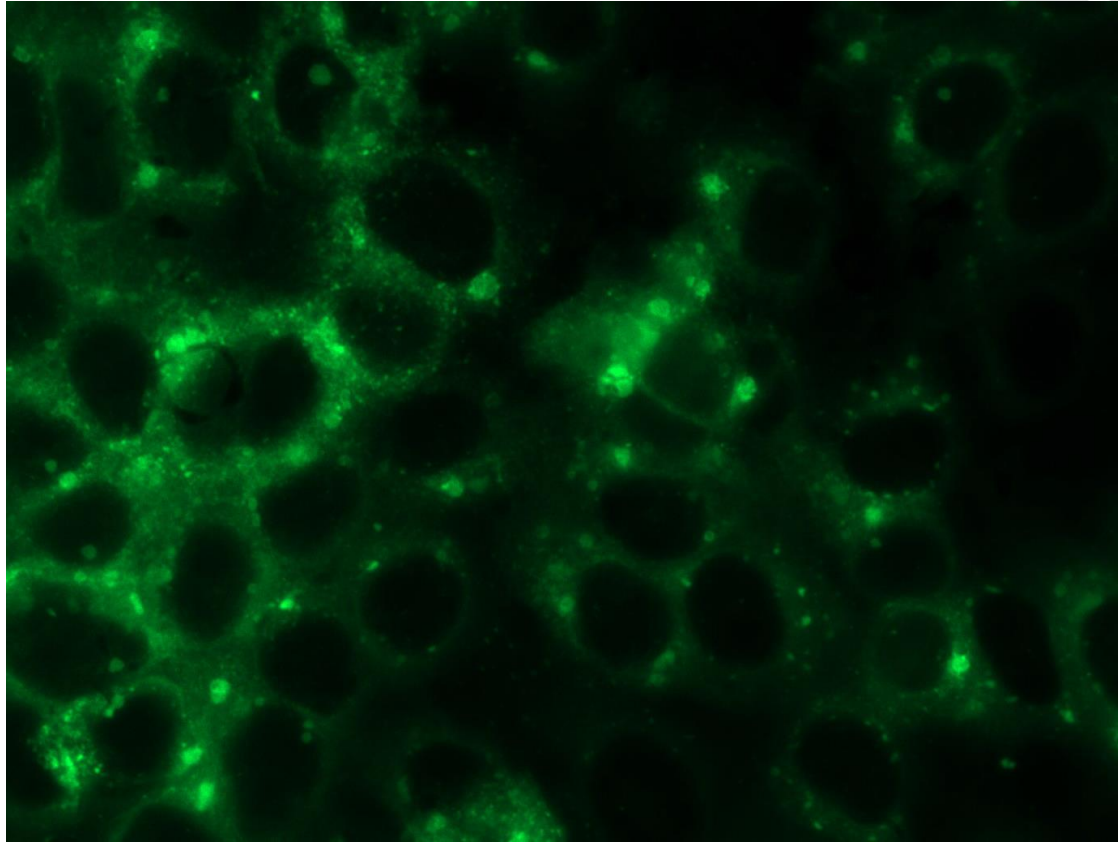


Substrato cellulare L 929



*Bartonella henselae* in  
substrato cellulare L 929

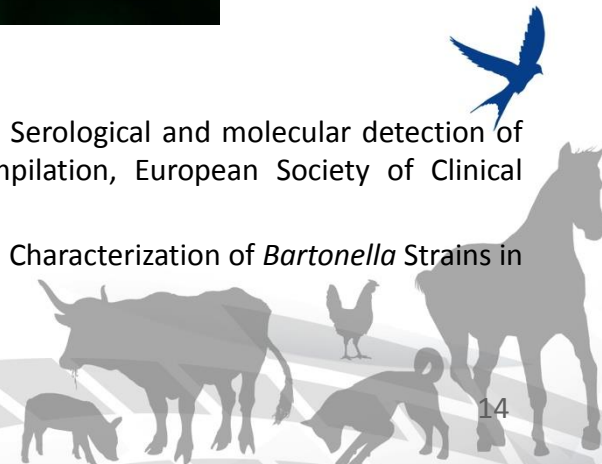




### IFI *Bartonella* spp.

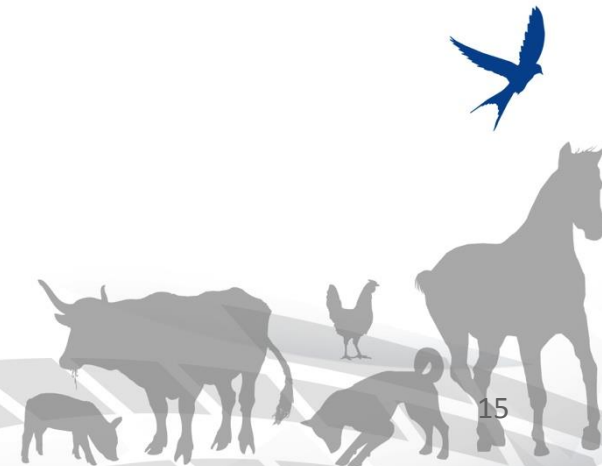
R. Zobba, G. Chessa, S. Mastrandrea, M.L. Pinna Parpaglia, C. Patta and G. Masala (2009). Serological and molecular detection of *Bartonella* spp. in humans, cats and dogs from Northern Sardinia, Italy. Journal Compilation, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 15 (Suppl. 2): 134-135.

P. Capitta, R.Zobba, G.Masala, R.Cocco, S.Tola, and M. L. Pinna Parpaglia (2010) Isolation and Characterization of *Bartonella* Strains in Cats in Italy . Transboundary and Emerging Diseases. 57: 201-204.



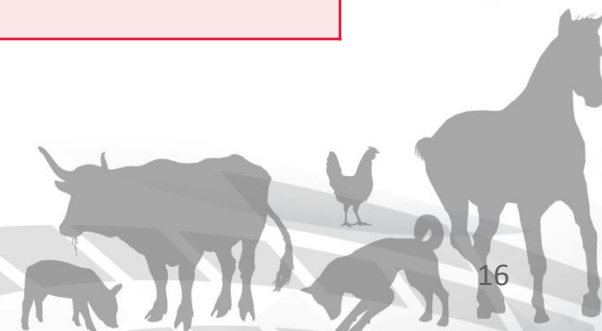
## Attività svolte:

- Allestimento vetrini e prova IFI con sieri positivi pervenuti dall'IZS Sardegna
- Prova funzionamento IFI su 18 sieri di gatto pervenuti in IZSAM per altri esami
- **Risultati**
- N. 8 positivi
- N. 10 negativi



## Protocollo per reperire sieri veri positivi e veri negativi per validazione metodo IFI

<b>Esame di laboratorio</b>	<b>Matrice</b>
<b>Esame sierologico Immunofluorescenza indiretta</b>	<b>Siero</b>
<b>Ricerca diretta (Isolamento colturale)</b>	<b>Sangue in EDTA (3-5 ml)</b>
<b>Ricerca diretta (PCR)</b>	<b>Sangue in EDTA (300µl)</b>







## Scheda Animale

### Dati generali

Dati veterinario richiedente/timbro: ..... data prelievo .....

Nome del proprietario .....

Indirizzo del proprietario .....

Numero di telefono proprietario .....

Dati soggetto:

Specie: Gatto  Cane  Nome..... Sesso:  F  M

data di nascita.....  Domestico  Randagio

Microchip .....

### Anamnesi

Eta' ..... Peso..... Ambiente di provenienza:  Urbano  Rurale

Condizioni di vita :  All'aperto  In abitazione

L'animale è stato vaccinato  SI  NO

Se si quali vaccini .....

## Scheda anamnestica animale

Convive con altre specie animali?  SI  NO

Se sì: Gatto n.  Cane n.  Criceto o altre specie n.

Ci sono stati episodi di morsi o graffi da parte di altri animali?  SI  NO

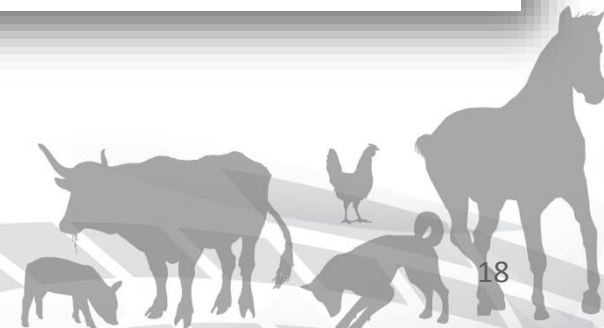
L'animale è sottoposto, regolarmente, a trattamenti per ectoparassiti, secondo prescrizione veterinaria?  SI  NO

L'animale ha eseguito negli ultimi 6 mesi o sta eseguendo terapie medicinali antibiotiche?  SI  NO

Se sì con quali antibiotici? .....

Materiale inviato..... Esame richiesto.....

Sospetto diagnostico / scopo dell'invio.....



# Protocollo Validazione

## Metodo IFI per la diagnosi della Bartonellosi nel gatto



### SCOPO:

- Validazione prova IFI per la diagnosi sierologica di Bartonellosi: processo che determina la validità del metodo per lo specifico scopo al quale è destinato

### METODOLOGIA – steps

- **Definizione veri positivi e veri negativi**
- ✓ Veri positivi (VP): sieri positivi IFI, confermati da coltura di sangue e PCR sangue ( Presenza batteriemia)
- ✓ Veri negativi (VN): sieri negativi IFI, con coltura di sangue e PCR sangue negativa ( Assenza batteriemia)

- **Campioni:**

Sieri e sangue intero (prelievo in EDTA) di gatto (dello stesso animale) scelti tra campioni pervenuti da pazienti provenienti da ASL, cliniche universitarie, ambulatori privati, studi popolazioni colonie animali..... la scheda annessa può essere indicativa



# Protocollo

## Validazione Metodo IFI per la diagnosi della Bartonellosi nel gatto



### Metodologia di prova

- Testare i campioni (siero) in IFI (ricerca di IgG) con risultato del titolo (range di diluizione: 1:40 – 1:640)

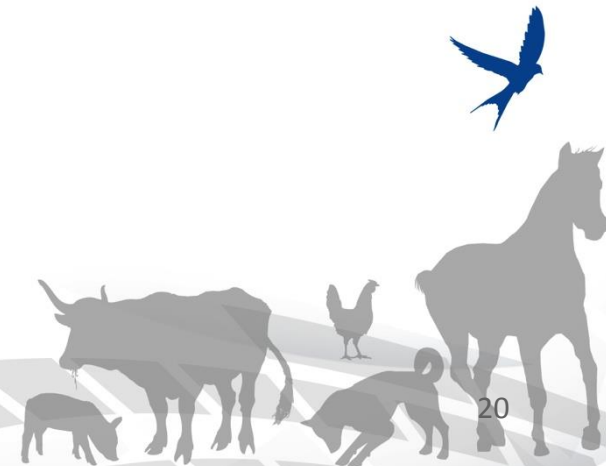
Effettuare esame colturale e PCR nei campioni di sangue

**Pannello sieri, provenienti da animali sicuramente positivi e sicuramente negativi per la malattia in esame, almeno**

- **100 veri Positivi**
- **200 veri Negativi**

### Elaborazione statistica dei risultati IFI

- **Calcolo del cut-off e Se e Sp (STAT) ROC**



# Accuratezza del metodo IFI per la diagnosi della Bartonellosi nel gatto


## Tabella 2X2 per calcolo SP, SE, PPV, NPV

N.... Campioni random pervenuti da Università (clin. medica, ostetricia), ASL e/o altro

Batteriemia (“gold standard”)		Tot N. sieri esaminato		
		PPV	NPV	
		Presenza	Assenza	
Risultati IFI				
Positivi	VP	FP	Totale sieri: (VP+FP)	
			$PPV\% = VP/(VP+FP)$ $NPV\% = VN/(VN+FN)$	
Negativi	FN	VN	Totale sieri: (FN+VN)	
Totali	(VP+FN)	(FP+VN)	(VP+FP +FN+VN)	
	$DSe\% VP/(VP+FN)$	$DSp\% VN/(FP+VN)$		

Fabbi et al. (2004). Prevalence of *Bartonella henselae* in Italian Stray Cats: Evaluation of Serology to Assess the Risk of Transmission of *Bartonella* to Humans - Journal of Clinical Microbiology - 42 (No.1), 264-268

## Accuratezza Test IFI per la diagnosi della Bartonellosi nel gatto :

- 
- Calcolare la distribuzione dei titoli (prova IFI) sierologici in gatti batteriemici e non batteriemici attraverso curve ROC (accuratezza: % di SE e di SP)
  - Calcolare l'associazione tra i risultati IFI e lo stato batteriemico del soggetto mediante Mc Nemar test
  - Calcolare il grado di accuratezza e affidabilità: Indice di concordanza Cohen's Kappa (Concordanza Risultati IFI "made in home" (predittivi) Risultati IFI commercio (veri))



# Protocollo diagnostico Screening

<b>Esame di laboratorio</b>	<b>Matrice</b>
<b>Esame sierologico (ricerca anticorpi)</b> <b>IFI, Immunoblotting</b>	<b>Siero</b>
<b>Ricerca diretta</b> <b>(Isolamento colturale )</b>	<b>Sangue in EDTA(2-3 ml)</b>
<b>Ricerca diretta</b> <b>(PCR)</b>	<b>Sangue in EDTA (300µl)</b>
<b>Parametri ematochimici</b> <b>(emocromo, esam. biochimico clinico)</b> <b>Elettroforesi</b>	<b>Sangue in EDTA, siero</b>





## Scheda Anamnestica Uomo

### Scheda Uomo

#### Dati generali

Dati Medico richiedente/timbro: ..... data prelievo .....

Nome ..... Cognome..... Data di nascita .....

Comune di nascita.....Residenza .....

N. Telefono..... Codice fiscale .....

#### Anamnesi

Età..... Peso ..... Aspetto generale .....

Anamnesi patologica remota .....

Anamnesi patologica prossima .....





## Scheda Anamnestica Uomo

Convivenza con specie animali: gatto  cane  altro .....

1. Presenza di graffi e/o morsi di gatto o cane?  SI  NO

Se SI Presenza di lesioni cutanee: pustole, vesciche, papule  SI  NO

2. Linfadenomegalia  SI  NO

3. Lesioni oculari, febbre  SI  NO

4. Altro .....

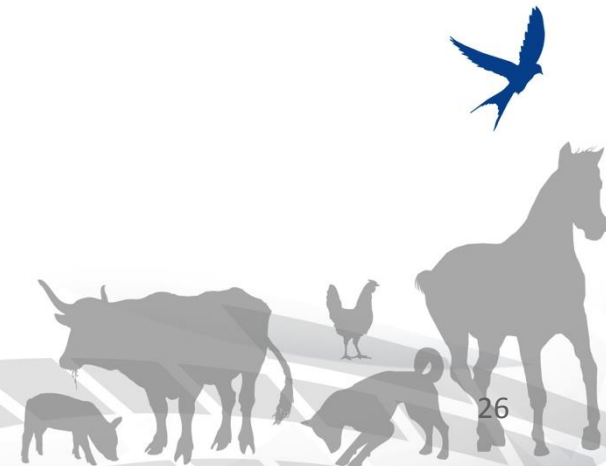
Ci sono stati episodi di presenza e/o morsi di pulci o zecche?  SI  NO

Terapie pregresse ..... Terapie in atto.....

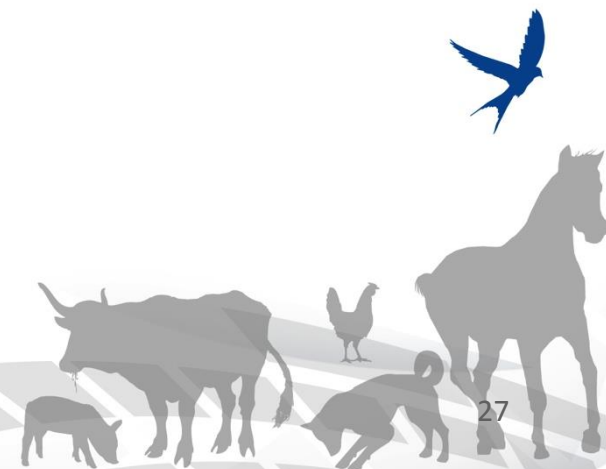
Materiale inviato ..... Esami richiesti.....

Sospetto Diagnostico /scopo dell'invio.....

- **Ricercatori universitari**
- **Medici di medicina umana (Infettivologi, pediatri.....)**
- **Medici Verinari, Ente Parco.....**
- **Statistici ed epidemiologi**



- 
- Paolo Dalla Villa (IUVENE)
  - Elisa Di Giannatale (Batteriologia)
  - Osvaldo Matteucci e Rep. Vaccini Batterici Terreni e Tecnologia
  - Luigina Di Gialleonardo (Ricerca e Sviluppo Biotecnologie)
  - Alessandra Leone (Virologia)
  - Liana Teodori (Virologia)
  - Anna Rita D'Angelo (Microbiologia Diagnostica)
  - Giovanni DiTeodoro (Microbiologia Diagnostica)
  - Andrea Di Provvido (Microbiologia Diagnostica)
  - Daniele Giansante (Sez. Pescara)
  - Anna Conte (Covepi)
  - Paola Di Giuseppe (Comunicazione Istituzionale)





IZSAM G. CAPORALE  
TERAMO

GRAZIE !!!

