



ISTITUTO G. CAPORALE  
TERAMO



**CRN Brucellosi**

Centro di Referenza Nazionale

SVILUPPO E VALIDAZIONE DI UN METODO PCR REAL-TIME PER  
LA RILEVAZIONE DI *BRUCELLA* spp. IN CAMPIONI BIOLOGICI

Massimo Ancora



## PROGETTO DI RICERCA:

**Sviluppo di un sistema diagnostico per la rilevazione, concentrazione e caratterizzazione di *Brucella* da campioni biologici**

## FINANZIAMENTO:

Ministero della Salute,  
Dipartimento per la Sanità Pubblica Veterinaria,  
la Nutrizione e la Sicurezza degli Alimenti



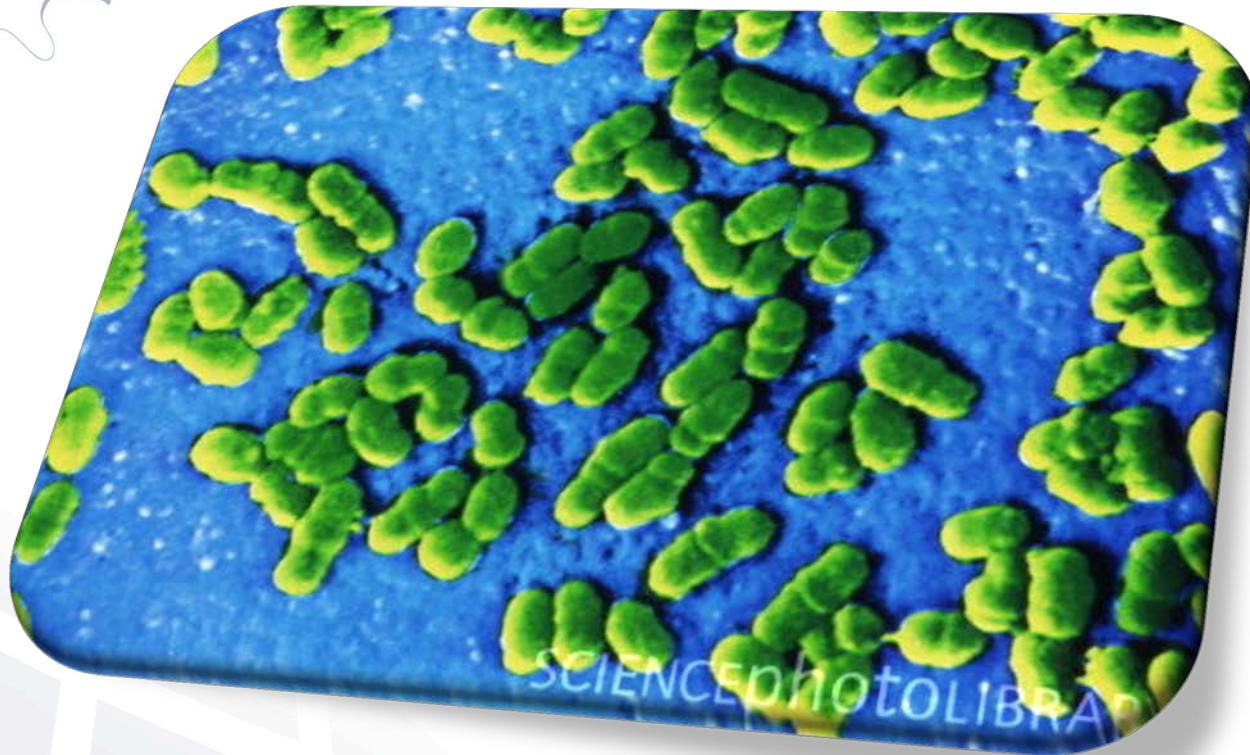


ISTITUTO G. CAPORALE  
TERAMO



CRN Brucellosi

Centro di Referenza Nazionale



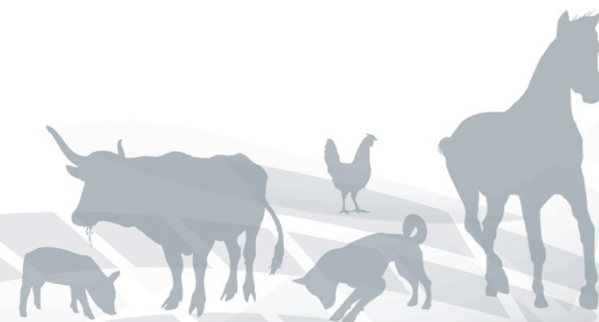
*Brucella* sp.

**Gram –**

**Immobile**

**Aerobio**

**Asporigeno**







ISTITUTO G. CAPORALE  
TERAMO

# **Brucella: un importante agente zoonotico**

 **CRN Brucellosi**  
Centro di Riferenza Nazionale



# Bioterrorismo



# Scopo della Ricerca

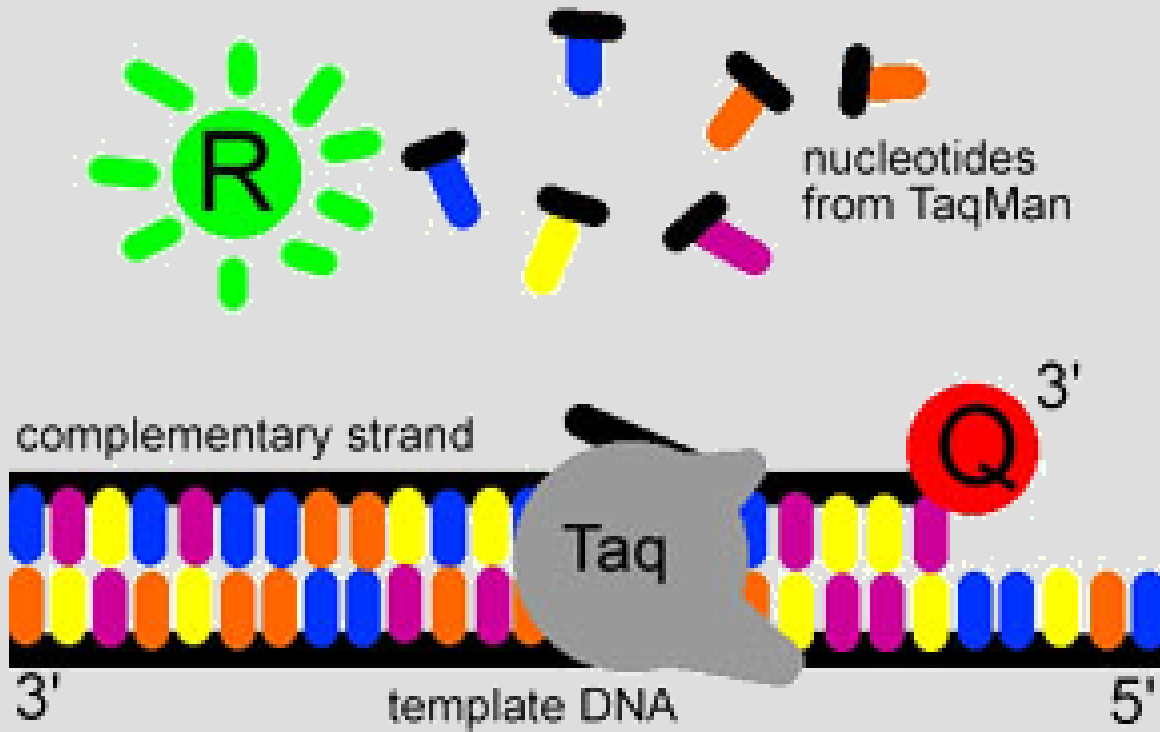
Sviluppare e validare un rapido e affidabile sistema  
diagnostico per la diagnosi di  
*Brucella* spp. da campioni biologici





# Materiali e Metodi

## PCR real time



# Controllo interno di amplificazione (IAC)



ISTITUTO G. CAPORALE  
TERAMO

CRN Brucellosi  
Centro di Riferenza Nazionale

Sequenza probe  
*Acetil CoA carbossilasi*

ctaataactgc

acctccaagcttactg

actgattatgcacgggtt

acctccaagcttatgc

Sequenza  
*Brassica rapa esculenta*

Sequenza primer *Brucella*



No multiplex

Stessi primers

Maggiore sensibilità e specificità





# Automazione

Maxwell® 16 Cell DNA purification kit (Promega)



MicroLab STARlet Robotic workstation – Hamilton





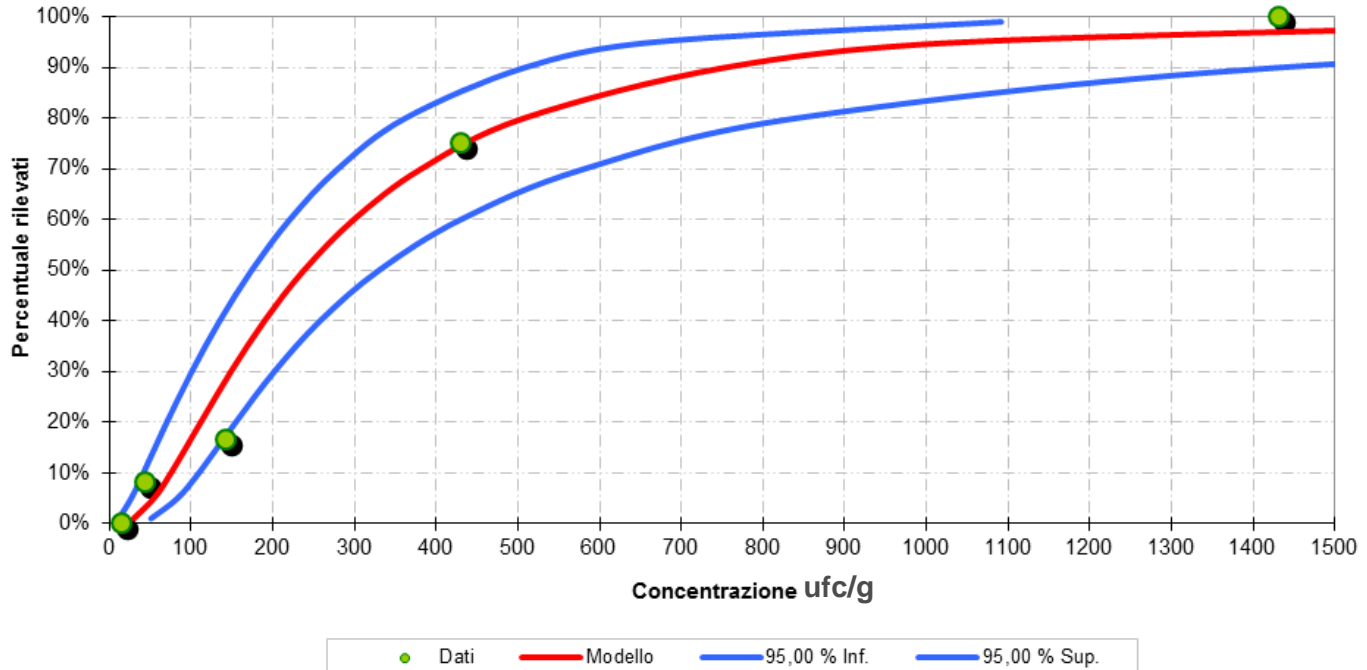
ISTITUTO G. CAPORALE  
TERAMO

# Validazione

CRN Brucellosi  
Centro di Referenza Nazionale

*Brucella abortus* bv4      Modello Probit vs dati

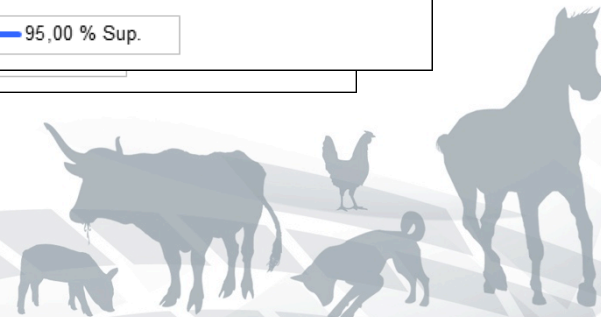
*Brucella abortus* bv3      Modello Probit vs dati



6 diluiz  
da 2958

Rette d  
R<sup>2</sup> tra  
Coeffici

3%



# Confronto con altri metodi

vs. Bogdanovich *et al.*  
(2004)

< **Efficienza**

< **Sensibilità**

< **Specificità**

vs. Probert *et al.*  
(2004)

< **Sensibilità**

**No IAC**



# Campioni di campo

42 bovini sieropositivi



192 campioni totali



41 campioni positivi  
PCR real-time





# Output



Royal Holloway

Brucellosis  
2008



Delegates at the  
Brucellosis 2008 Conference

Cammà C., Ancora M., Polci A., Di Provvido A., Di Giannatale E., Alessiani A., Lelli R. 2008. Development of a RealTime PCR method with an internal amplification control for high throughput detection of *Brucella* spp. Brucellosis 2008 International Research Conference. Royal Holloway College, University of London, UK, 10-13 September 2008, p.171

Di Provvido A., Ancora M., Cammà C., Catalani M., Scacchia M., Lelli R. 2008. Evaluation of RealTime PCR for a rapid diagnosis of *Brucella* spp. in cattle tissues. Brucellosis 2008 International Research Conference. Royal Holloway College, University of London, UK, 10-13 September 2008, p. 174



# Applicazioni

## Immediata

Diagnosi precoce e specifica per la tutela della salute pubblica

## Future

Kit diagnostico commerciale

Utilizzo presso il CVL, Windhoek (Namibia)  
NAPHL, Asmara (Eritrea)



# Grazie per l'attenzione

