



ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO



CRN Brucellosi

Centro di Riferenza Nazionale

SVILUPPO DI UN SISTEMA DIAGNOSTICO MOLECOLARE 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



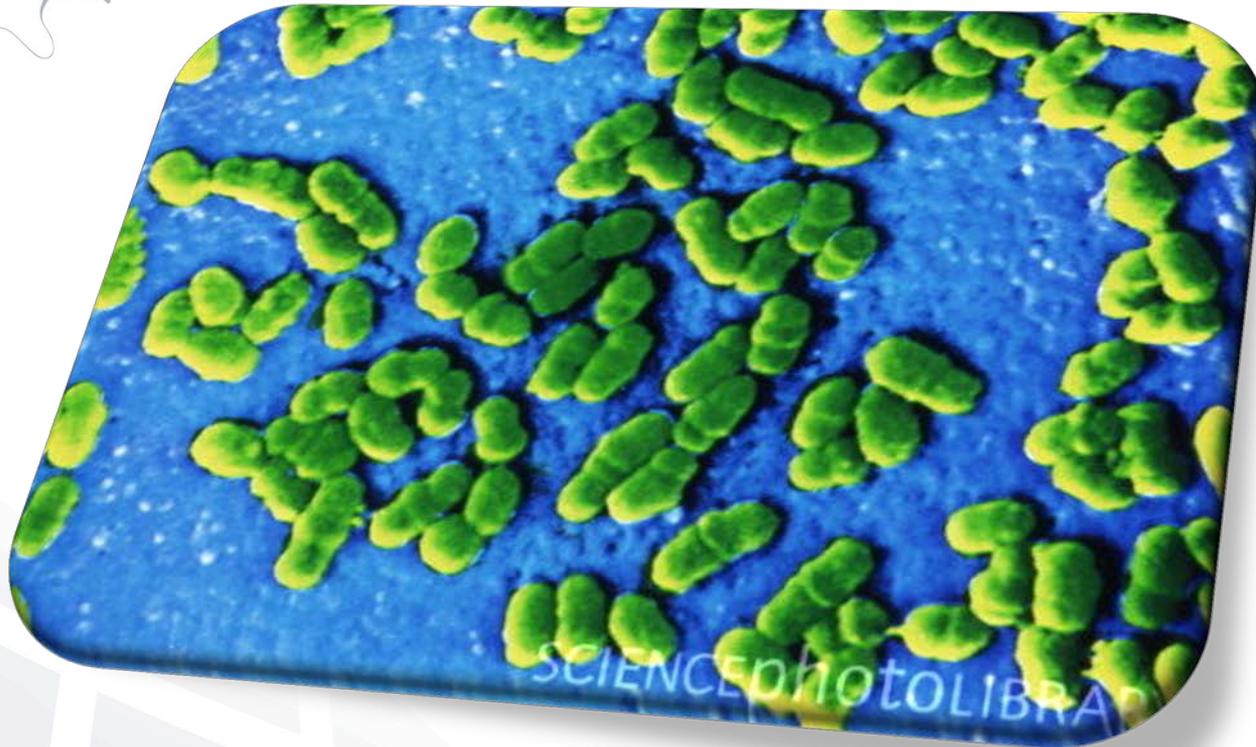


ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO



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

Vantaggi:

- Possibilità di quantificare con precisione
- Non viene influenzata da amplificazioni aspecifiche
- Nessun trattamento dei prodotti PCR dopo la reazione (basso rischio di contaminazione)
- rapidità (40 cicli da circa 30 minuti a 2 ore)
- ampio intervallo dinamico (> 7 logaritmi)
- limite di rilevazione di pochi genomi equivalenti (GE) (0,01pg di DNA)
- sensibilità, specificità e riproducibilità molto elevate
- facilmente automatizzabile (analisi di un numero elevato di campioni)
- non più costosa della PCR



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)



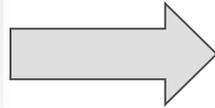
MicroLab STARlet Robotic workstation – Hamilton



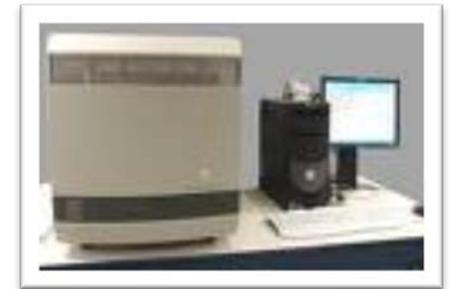
Flusso di lavoro



Estrazione del DNA



Master mix



PCR real-time



□ Efficienza del metodo

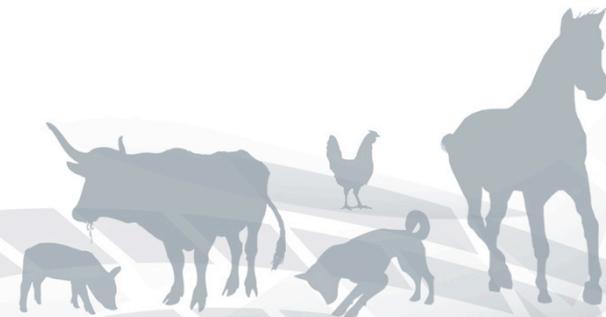
6 diluizioni scalari
da 2958 GE a 2,3 GE (4 replicati/diluizione)

Rette di calibrazione derivate:

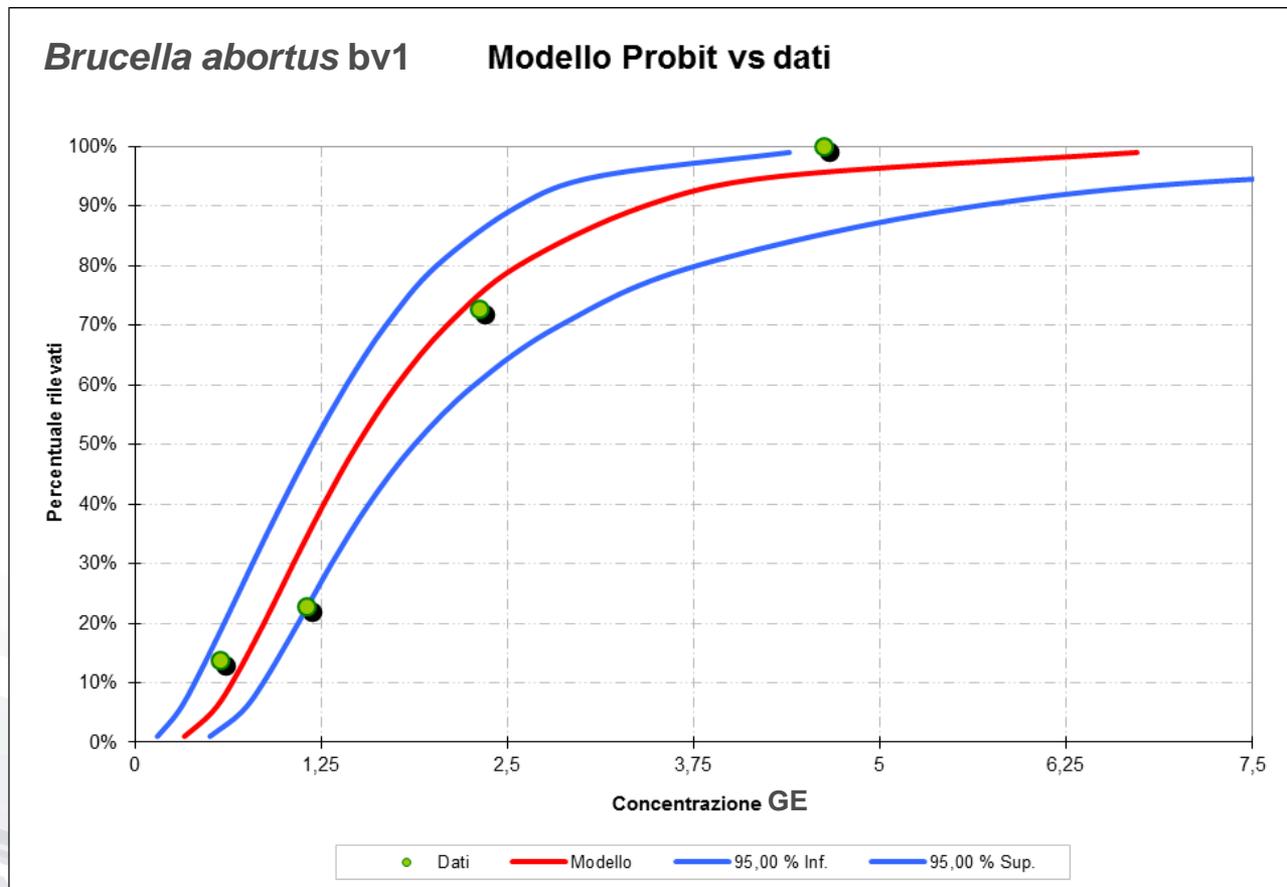
R^2 tra 0,99 e 1

Coefficiente angolare tra -3,14 e -3,37

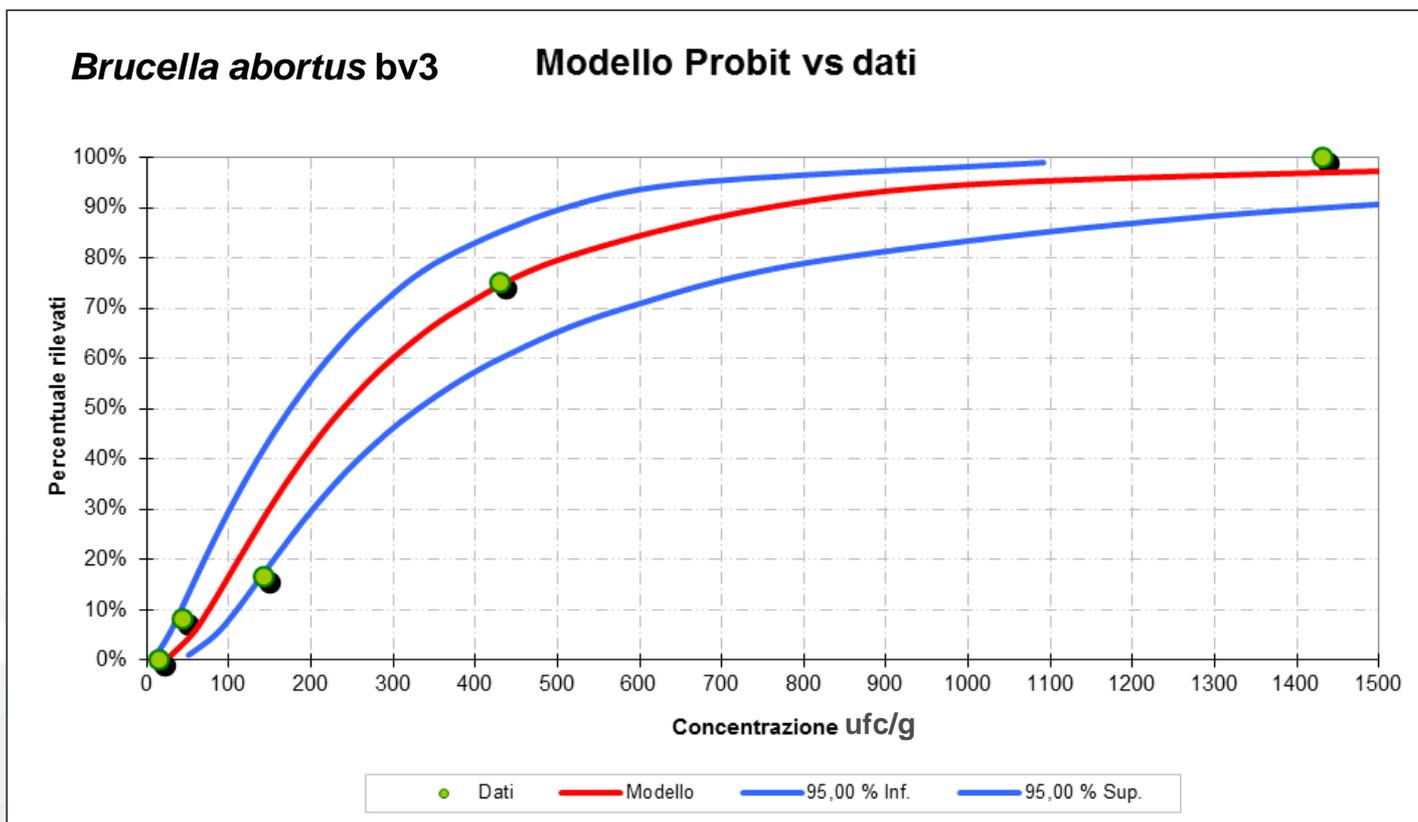
} Efficienza >98%



☐ Sensibilità analitica



☐ Sensibilità diagnostica



Validazione

Specificità analitica



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



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)





ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO



CRN Brucellosi

Centro di Riferenza Nazionale

Grazie per l'attenzione

