



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



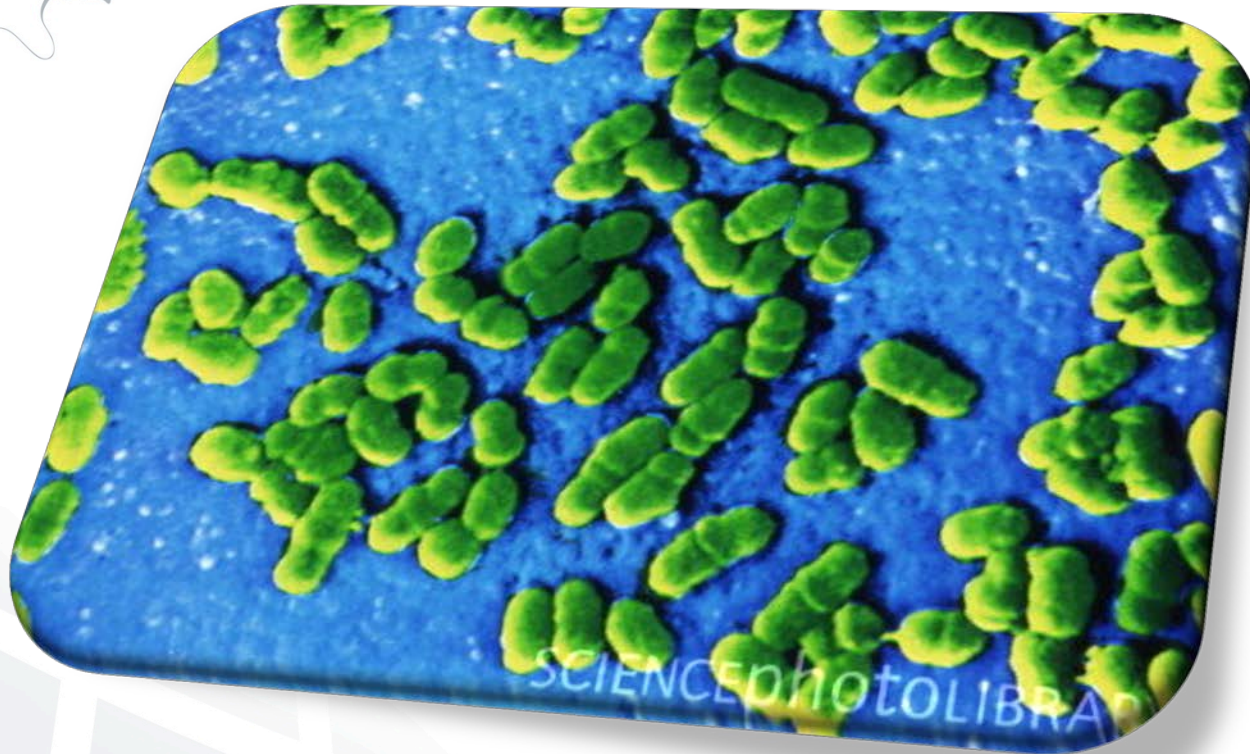


ISTITUTO G. CAPORALE  
TERAMO



CRN Brucellosi

Centro di Referenza Nazionale



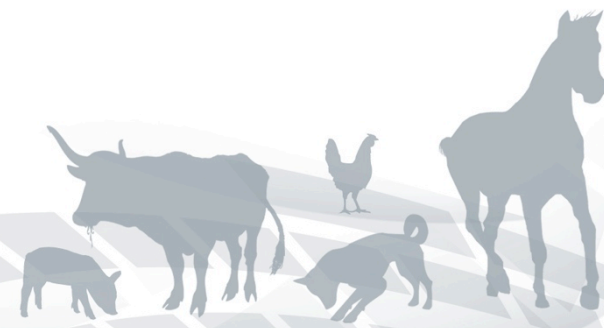
*Brucella* sp.

**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)



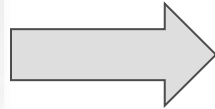
MicroLab STARlet Robotic workstation – Hamilton



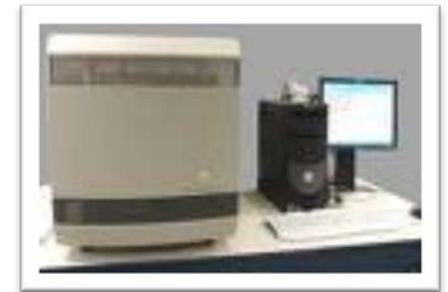
# Flusso di lavoro



Estrazione del DNA



Master mix



PCR real-time



## □ Efficienza del metodo

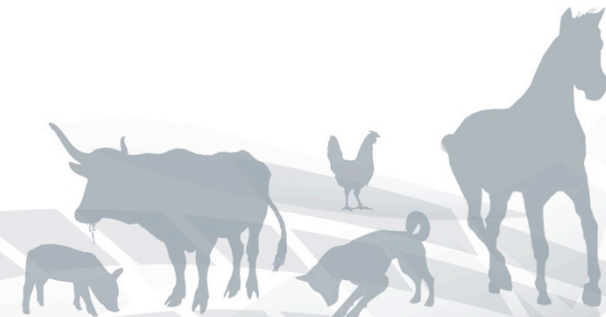
6 diluizioni scalari  
da 2958 GE a 2,3 GE (4 replicati/diluizione)

Rette di calibrazione derivate:

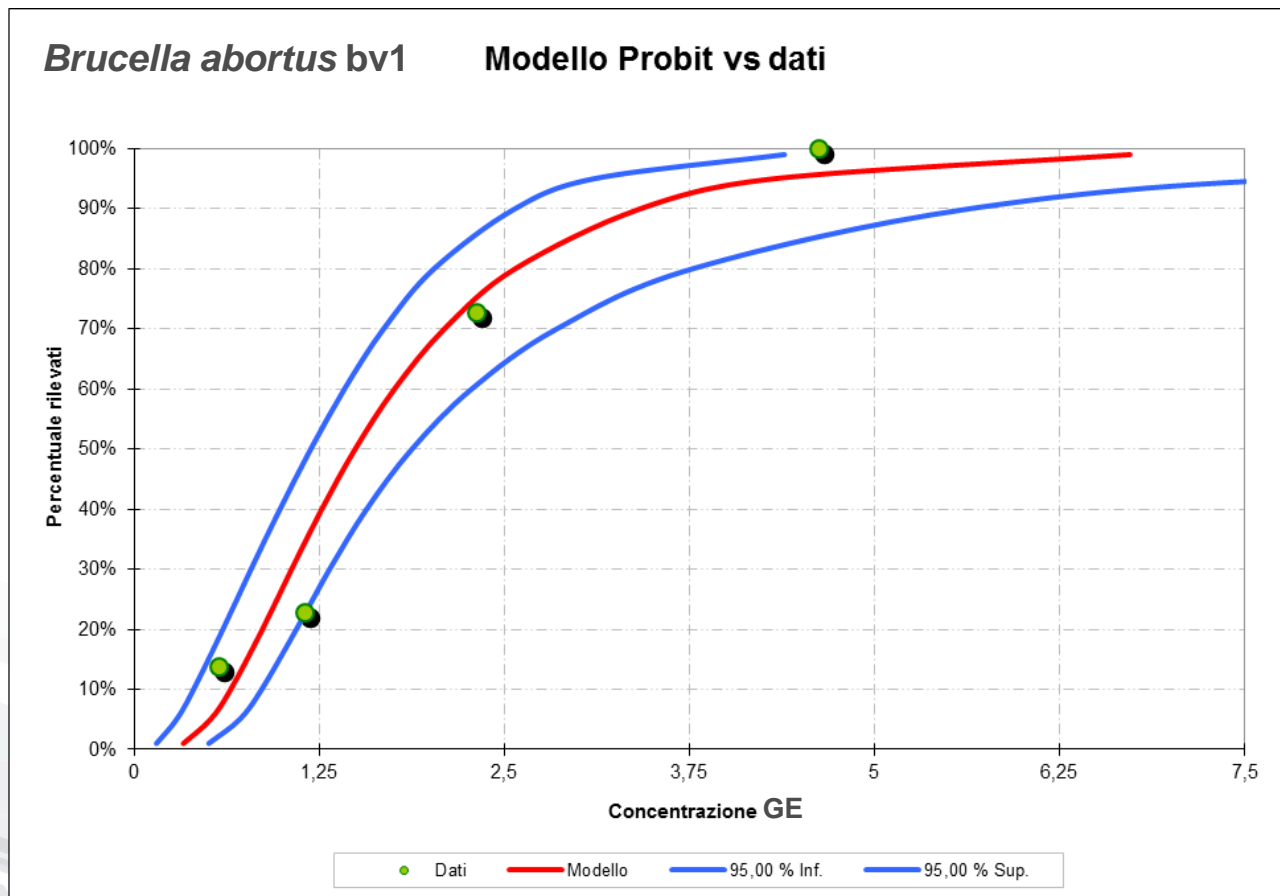
$R^2$  tra 0,99 e 1

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

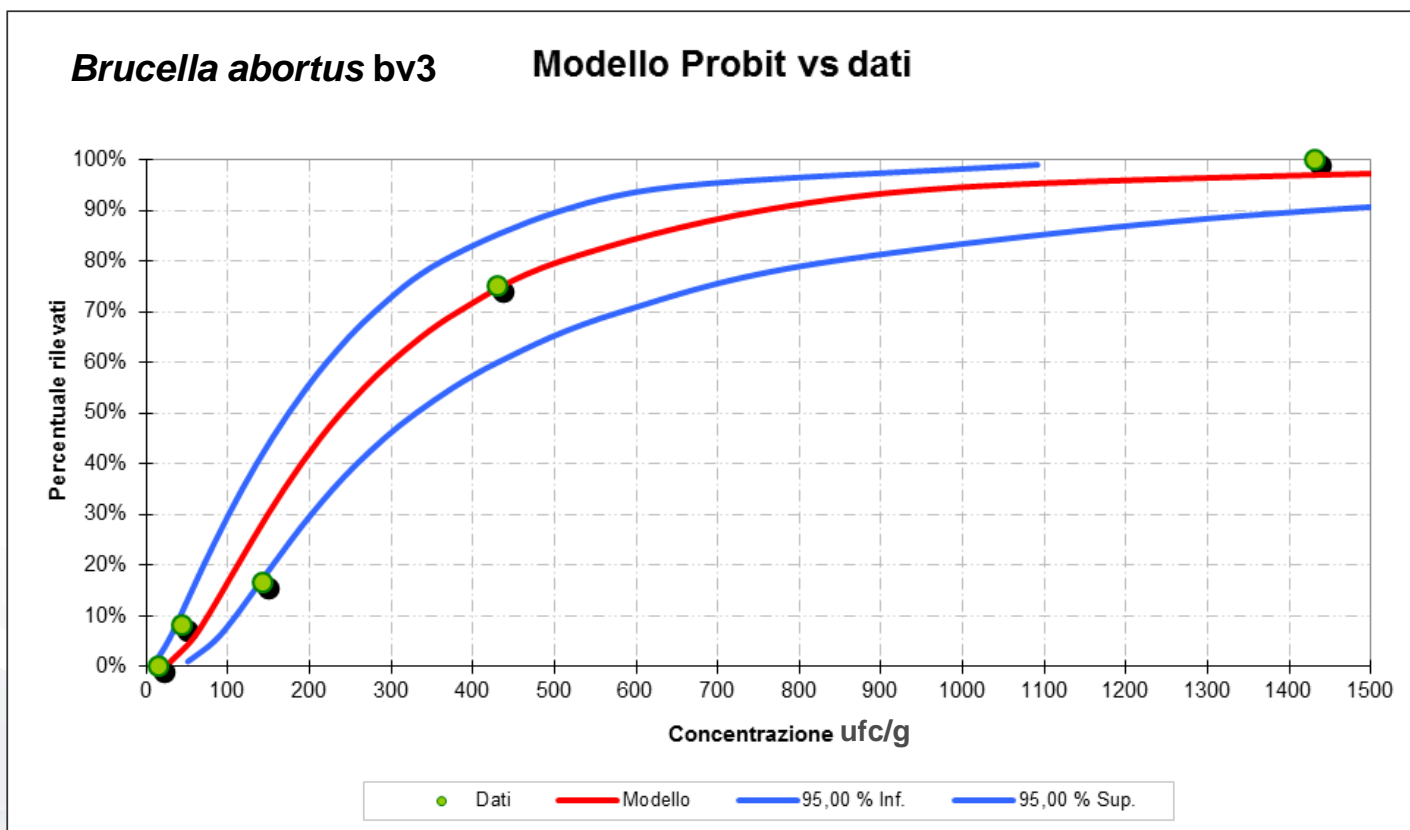
} Efficienza >98%



## ☐ 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

