

Titolo del Progetto
A.M.B.R.A. – Kit for *Brucella Abortus* e *B. Melitensis* nano-Biosensing RAPid detection

Soggetti Attuatori

PARTNER	TIPOLOGIA	RUOLO	COMPETENZE MESSE A SISTEMA
COSVITEC	PMI	Capofila	Microbiologia, coltura e caratterizzazione di batteriofagi, competenze tecnico/scientifiche e ingegneristiche, brevettizzazione e trasferimento tecnologico
IZSM	OdR pubblico	OdR Co-proponente	Microbiologia, coltura e caratterizzazione di batteriofagi, biologia molecolare, statistica
ICIB-CNR	OdR pubblico	OdR Co-proponente	Nanofabbricazione, Spettroscopia, Caratterizzazioni Ottiche

L'obiettivo principale, perseguito nell'ambito del progetto "Ambra", è basato sull'utilizzazione della tecnica SPR per la realizzazione di uno strumento per rilevare e quantificare la presenza di *B. abortus* e *B. melitensis* sia in acqua che in matrici complesse come il latte.

Il progetto A.M.B.R.A. si propone di mettere a punto un sistema diagnostico efficace, ready to use, portatile e rapido, capace di offrire un valido supporto ad alcune fondamentali azioni di prevenzione del rischio legate alla diagnosi di presenza di patogeni, nel caso specifico *Brucella*, nel latte, destinato al consumo diretto e/o alla trasformazione.

Le principali problematiche tecnico-scientifiche da risolvere per conseguire l'obiettivo del presente progetto sono riconducibili a:

- **realizzazione** di un biosensore per la ricerca di *Brucella* spp. in campioni alimentari e biologici.
- **ottimizzazione** del kit diagnostico per l'applicazione dell'analisi proposta a matrici complesse

L'obiettivo da conseguire è la realizzazione di un biosensore per la ricerca di *Brucella* spp. in campioni alimentari e biologici. Uno dei problemi principali, che l'esperienza fin qui accumulata suggerisce dovrà essere risolto per il raggiungimento dell'obiettivo, consiste nella **funzionalizzazione** del biosensore. Tutto il sistema dovrà lavorare con molta precisione ed ogni singolo elemento dovrà essere controllato e quindi diversamente settato. Infatti, le piattaforme di biosensing possono essere sottoposte a trattamenti con specifiche sostanze chimiche in grado di aumentare la capacità del nano-biosensore di legare la molecola o cellula target, aumentando di conseguenza la sensibilità e la specificità di detection. Il processo di funzionalizzazione però potrebbe dar luogo a problemi legati al mancato legame tra la piattaforma di biosensing e i batteriofagi, deputati al riconoscimento specifico delle cellule di *Brucella*. Ancora, il legame tra il batteriofago e la piattaforma potrebbe diminuire l'affinità del fago stesso per la cellula target, a causa della possibilità che i siti di riconoscimento responsabili dell'interazione fago-batterio possano venire materialmente coperti o nascosti in seguito all'attacco sulla piattaforma. Problematiche di questo tipo potranno essere risolte utilizzando molecole diverse per la funzionalizzazione del nano-biosensore, ad esempio zuccheri, come destrosio e saccarosio, e amminoacidi, come cisteina e cisteamina, e valutando poi l'effetto delle diverse molecole nella funzionalizzazione della superficie in oro del biosensore e nella conseguente variazione dell'affinità di legame tra oro e batteriofago e, successivamente, tra batteriofago e batterio target.

Un altro eventuale problema di natura tecnica che potrebbe insorgere nella ottimizzazione del kit diagnostico per l'applicazione dell'analisi proposta a matrici complesse, deriva dal possibile effetto negativo sull'interazione batteriofago-batterio target svolto dalle macromolecole naturalmente

presenti nelle matrici biologiche, come grassi e proteine. In particolare, in matrici come il latte crudo, i globuli di grasso sono quelli che potrebbero interferire maggiormente con la sensibilità del kit diagnostico. In tal senso si provvederà ad effettuare delle prove che includano sistemi semplici di omogeneizzazione del latte (passaggio attraverso l'orificio di un ago da siringa) e delle prove di aggiunta al campione di basse dosi di detergenti finalizzati alla risoluzione del problema.

La principale problematica tecnologico-industriale da risolvere per conseguire l'obiettivo del presente progetto è riconducibile alla **validazione** del kit diagnostico sviluppato. In particolare, la fase di validazione del kit diagnostico sviluppato sarà finalizzata ad ottenere dati circa la robustezza del biosensore, la ripetibilità, la riproducibilità e la accuratezza diagnostica. Al tal fine verrà predisposta una campagna di test su campioni reali analizzati anche mediante tecniche convenzionali e materiali di riferimento certificati.

Risultati attesi:

- Sviluppo di materiali metallici nanostrutturati
- Progettazione e realizzazione di un trasduttore ottico SPR portatile
- Funzionalizzazione con sonde specie-specifiche del chip e detection di brucella in campioni artificialmente contaminati

Soluzioni identificate:

- riduzione dei tempi di analisi rispetto al metodo colturale
- Introduzione di una nuova metodologia (mediante biochip a trasduzione ottica) per l'analisi ambientali
- Innovazione ed ottimizzazione dei tempi di quali-quantificazione di *Brucella*