

# Tutto ebbe inizio con il..... Regolamento Europeo (EC) No 260/2003

...che consente, in caso di focolaio di *scrapie*, di escludere dall'abbattimento gli ovini geneticamente resistenti all'infezione (precedentemente, era obbligatorio lo *stampig out*)



resistenti

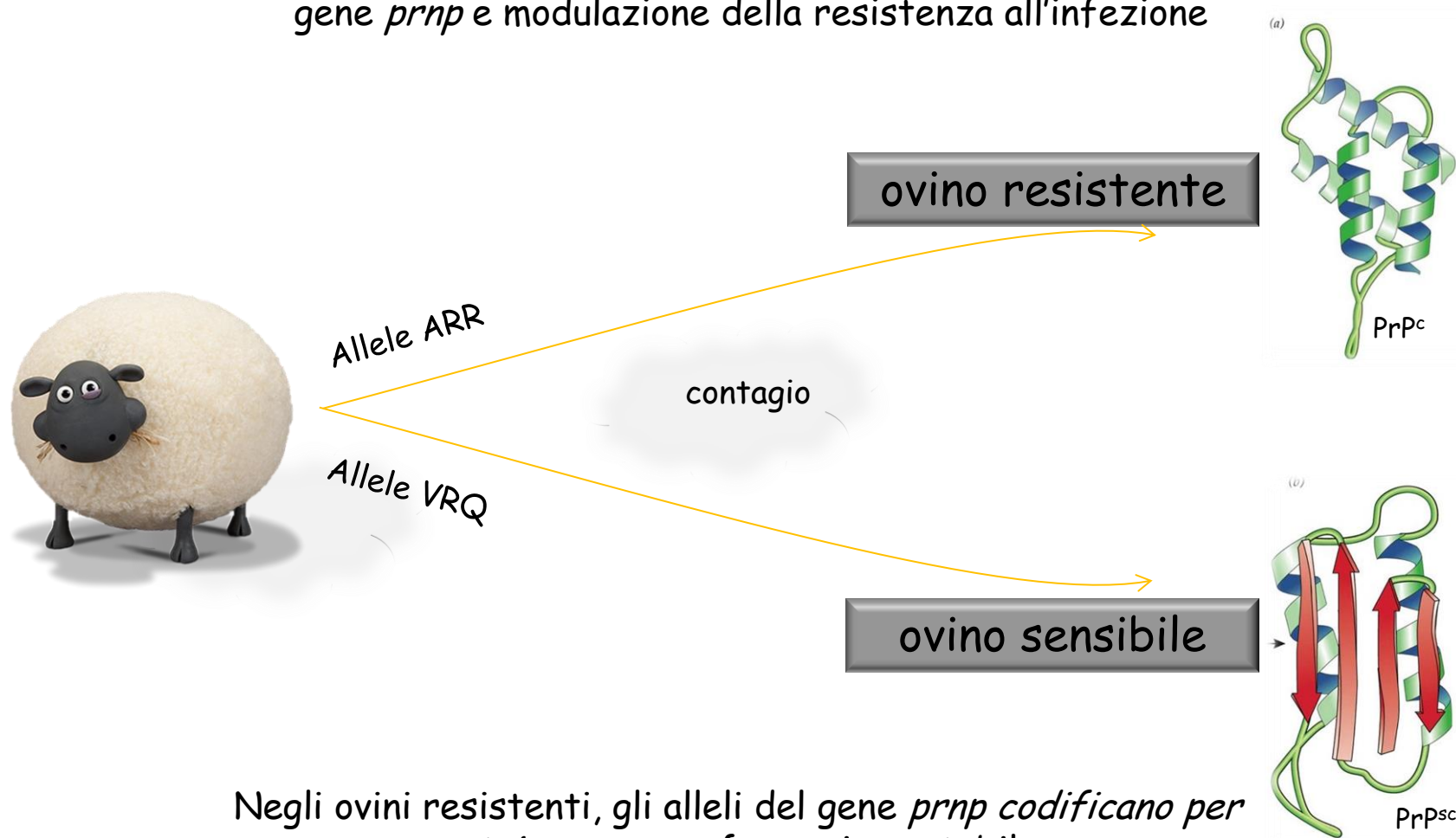


sensibili



# Cosa significa «geneticamente resistenti»?

Il dato epidemiologico evidenzia un'associazione tra varianti genetiche (alleli) del gene *prnp* e modulazione della resistenza all'infezione



Negli ovini resistenti, gli alleli del gene *prnp* codificano per proteine con «conformazione stabile»

Diagram illustrating the structure of a B cell receptor gene, showing the V (Variable) and D (Diversity) segments, and the J (Joining) segment. The gene is flanked by 5' and 3' ends. The V segment is 136 bp, the D segment is 154 bp, and the J segment is 171 bp. The V segment contains a variable region (V) and a constant region (A). The D segment contains a variable region (H) and a constant region (R). The J segment contains a variable region (H) and a constant region (K). A grey arrow points to the right, labeled "alleli".

# Allele paterno

	ARQ	ARR	ARH	ARK	AHQ	VRQ
ARQ	ARQ/ARQ					
ARR	ARQ/ARR	ARR/ARR				
ARH	ARQ/ARH	ARR/ARH	ARH/ARH			
ARK	ARQ/ARK	ARR/ARK	ARH/ARK	ARK/ARK		
AHQ	ARQ/AHQ	ARR/AHQ	ARH/AHQ	ARK/AHQ	AHQ/AHQ	
VRQ	ARQ/VRQ	ARR/VRQ	ARH/VRQ	ARK/VRQ	AHQ/VRQ	VRQ/VRQ

V<sup>136</sup>R<sup>154</sup>Q<sup>171</sup>

genotipi





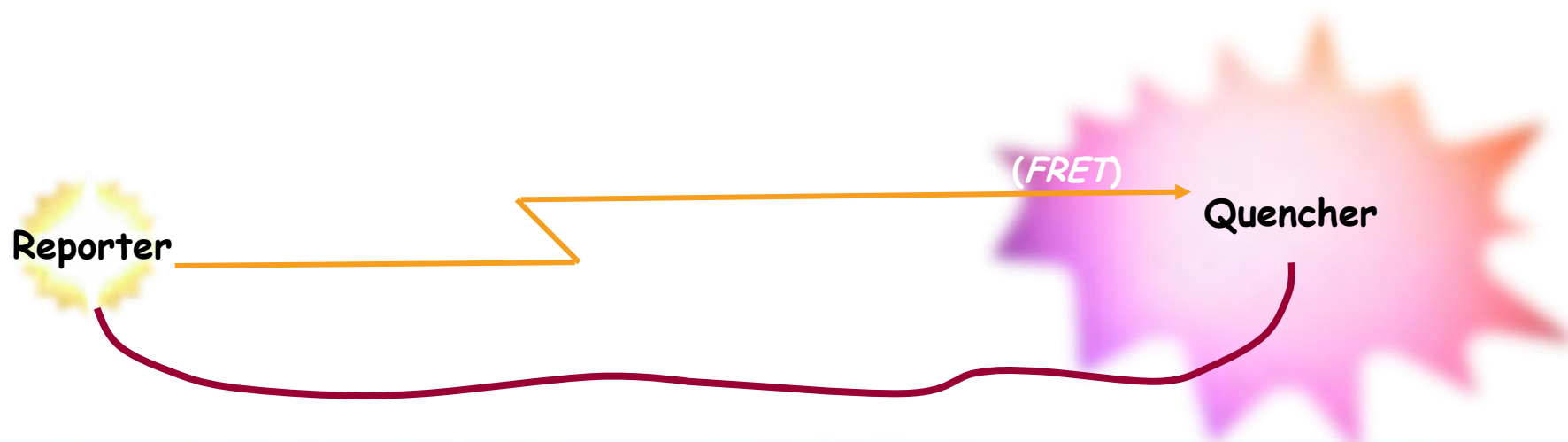
- **Sequenziamento DNA**
  - dato analitico «assoluto» (sequenza DNA)
  - protocolli molto elaborati  $\Rightarrow$  bassa produttività
  - costi molto elevati
- **Primer extension**
  - dato analitico «assoluto» (sequenza DNA)
  - protocolli molto elaborati  $\Rightarrow$  bassa produttività
  - costi molto elevati
- **Pirosequenziamento**
  - dato analitico «assoluto» (sequenza DNA)
  - protocolli abbastanza elaborati  $\Rightarrow$  media produttività
  - costi abbastanza contenuti
- **PCR Real Time**
  - protocolli semplici e robusti  $\Rightarrow$  elevata produttività
  - costi contenuti
  - «sensibile» a mutazioni impreviste nella regione bersaglio



# PCR Real-Time con chimica TaqMan®

(un reporter, come FAM e VIC, ed un quencher)

- sfrutta l'attività esonucleasica 5' → 3' della Taq polimerasi





Istituto Nazionale di Fisica Nucleare  
Sezione di Roma  
del Lazio e della Toscana M. Aldighi

# PCR Real-Time con chimica TaqMan®

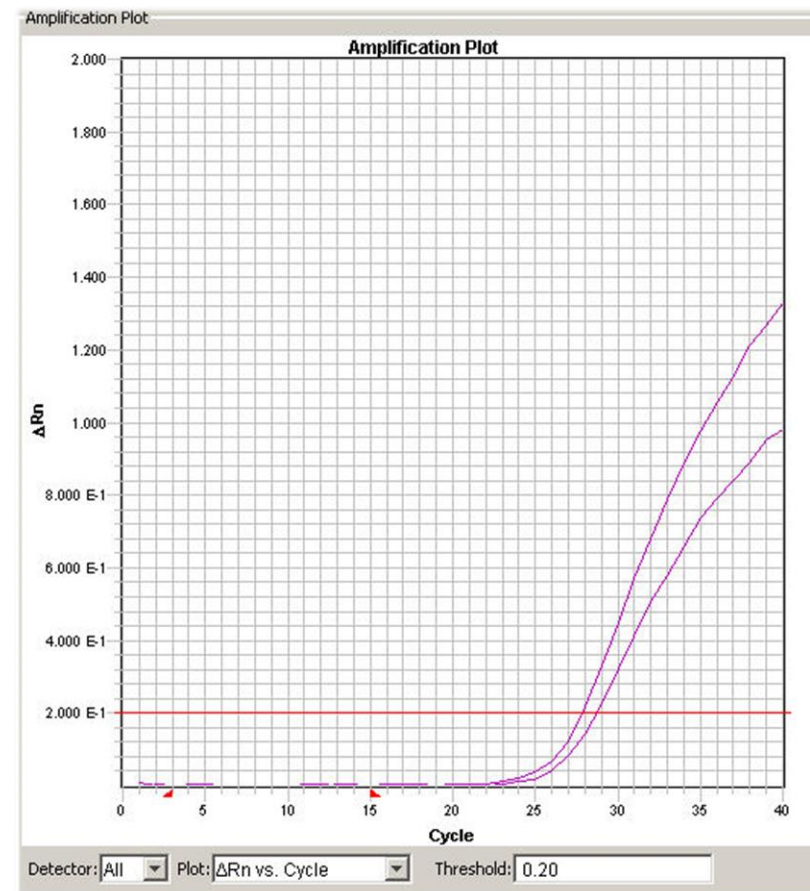
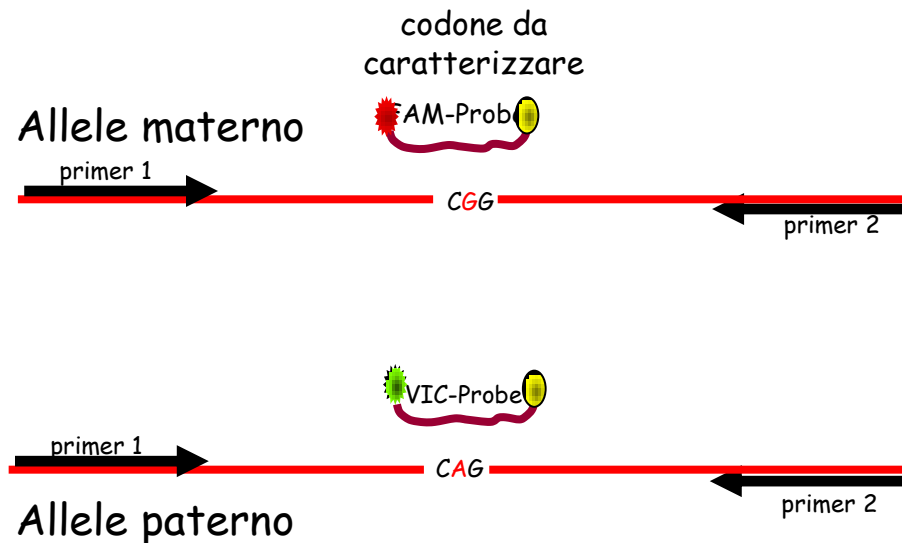
Reporter

Quencher





# Applicazione della tecnologia TaqMan<sup>®</sup>: saggio di «discriminazione allelica»



Le sonde sono di tipo MGB (*Minor Groove Binder*), molto più specifiche rispetto alle «classiche» TaqMan





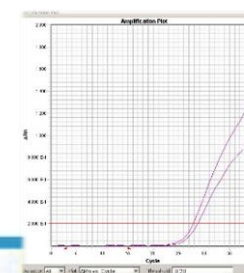
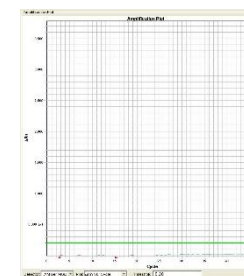
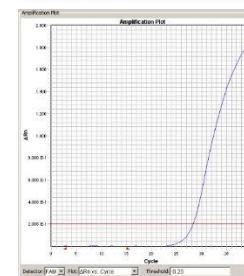
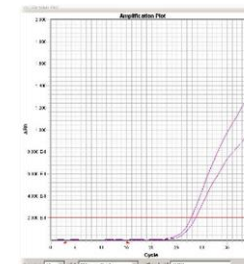
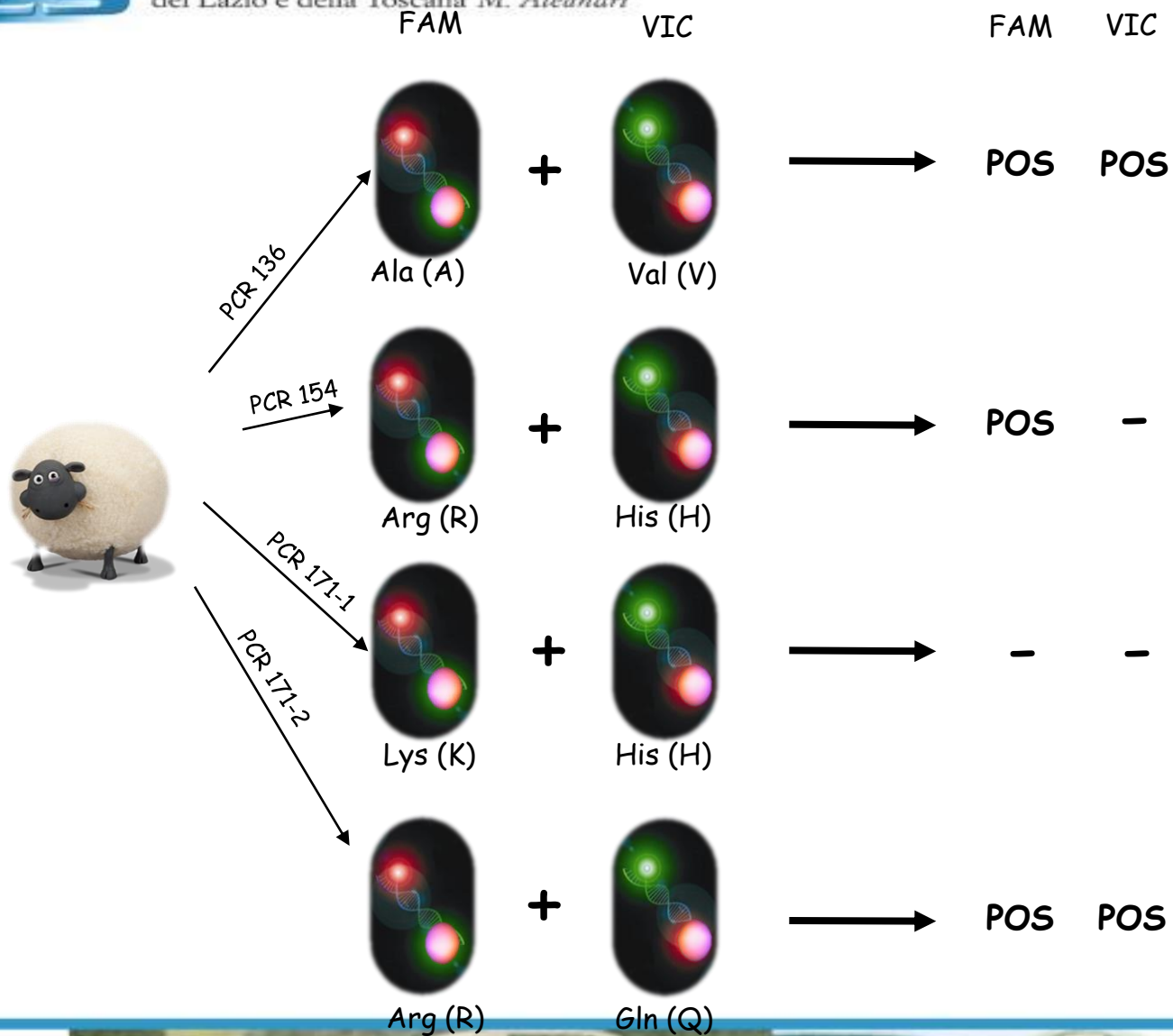
# Caratterizzazione dei codoni 136 154 e 171: saggio di «discriminazione allelica»

Per ciascun campione sono allestite 4 diverse reazioni di PCR, ciascuna dedicata ad una coppia di codoni

	sonda 1 (reporter: FAM)	sonda 2 (reporter: VIC)
1 PCR codone 136	Alanina	Valina
2 PCR codone 154	Arginina	Istidina
3 PCR 1 codone 171	Lisina	Istidina
4 PCR 2 codone 171	Arginina	Glutamina









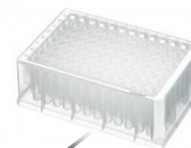
Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

# Schema del flusso di lavoro



Sangue con anticoagulante

Trasferimento dei campioni in piastre  
a 96 pozzetti ed estrazione del DNA



Allestimento di quattro piastre di  
amplificazione "Real Time"



136 (A/V)



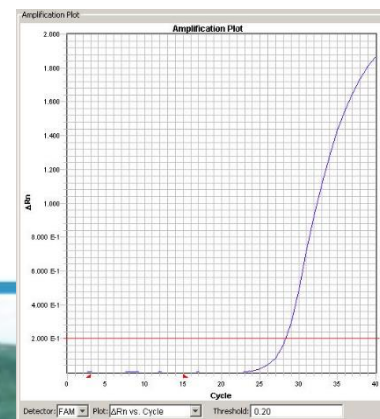
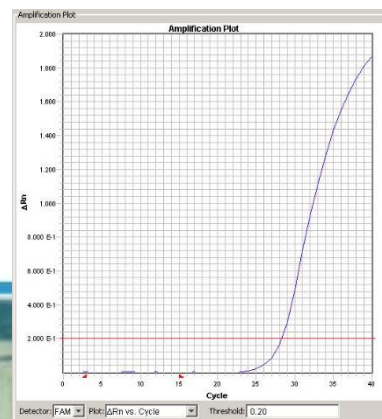
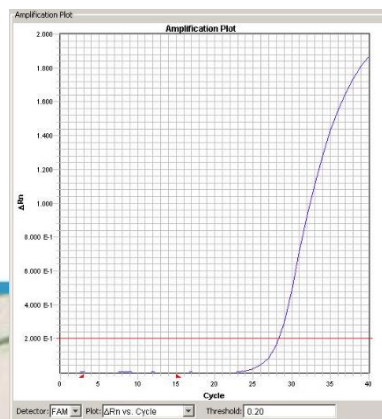
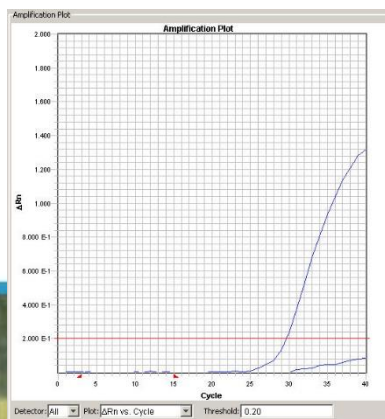
154 (R/H)



171-1 (K/H)



171-2 (R/Q)







Foglio di lavoro per l' caratterizzazione dei codoni 136, 141, 154 e 171 del gene *prnp* ovino

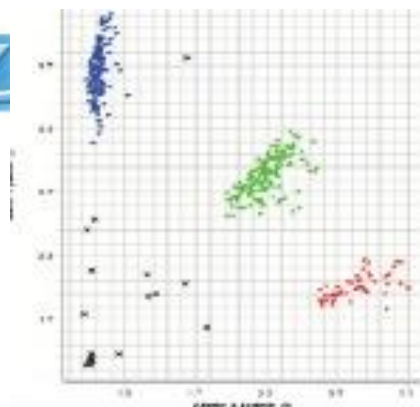
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
A	425 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	649 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	CTRL 136 AV 154 RH 171 RQH 141 FL	532 136 XX 154 XH 171 RQH 141 FL	533 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	725 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	849 136 XX 154 XH 171 RQH 141 FL	930 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	936 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	979 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	775 136 XX 154 XH 171 RQH 141 FL	583 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL
B	989 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	582 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	367 136 XX 154 XH 171 RQH 141 FL	615 136 XX 154 XH 171 RQH 141 FL	676 136 XX 154 XH 171 RQH 141 FL	788 136 XX 154 XH 171 RQH 141 FL	845 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	538 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	862 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	914 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	709 136 XX 154 XH 171 RQH 141 FL	830 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL
C	933 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	650 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	946 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	647 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	480 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	786 136 XX 154 XH 171 RQH 141 FL	884 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	536 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	622 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	986 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	826 136 XX 154 XH 171 RQH 141 FL	646 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL
D	554 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	653 136 XX 154 XH 171 RQH 141 FL	659 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	640 136 XX 154 XH 171 RQH 141 FL	589 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	805 136 XX 154 XH 171 RQH 141 FL	651 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	926 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	529 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	487 136 XX 154 XH 171 RQH 141 FL	556 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	413 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL
E	523 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	583 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	918 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	971 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	963 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	7003 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	992 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	754 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	629 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	489 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	513 136 XX 154 XH 171 RQH 141 FL	CTRL 136 AV 154 RH 171 RQH 141 FL
F	640 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	928 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	935 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	855 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	913 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	883 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	912 136 XX 154 XH 171 RQH 141 FL	927 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	7006 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	934 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	565 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	CTRL 136 AV 154 RH 171 RQH 141 FL
G	504 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	711 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	925 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	576 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	7001 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	677 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	915 136 XX 154 XH 171 RQH 141 FL	350 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	919 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	809 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	720 136 XX 154 XH 171 RQH 141 FL	CTRL 136 AV 154 RH 171 RQH 141 FL
H	864 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	879 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	785 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	868 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	969 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	CTRL 136 AV 154 RH 171 RQH 141 FL	936 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	816 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	847 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	543 136 XV 154 XH 171 RQH 141 FL	648 136 XX 154 XH 171 RQH 141 FL	CTRL 136 AV 154 RH 171 RQH 141 FL



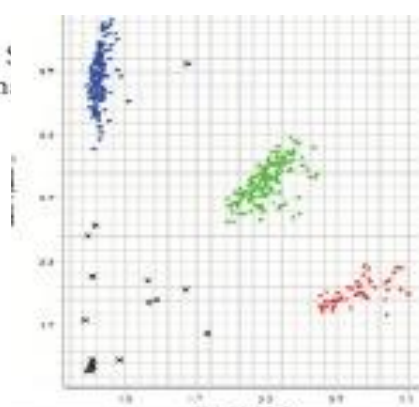
Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



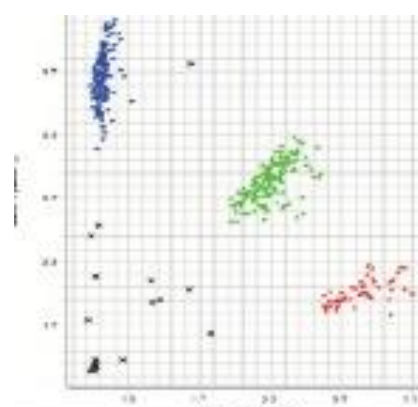




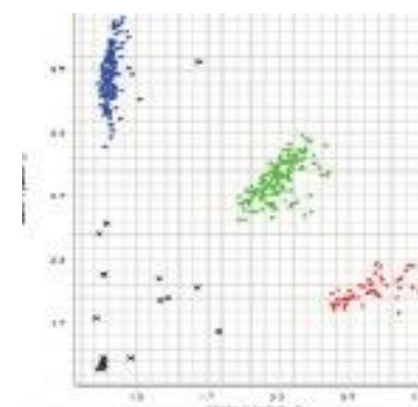
Saggio  
codone 136



Saggio  
codone 154



Saggio  
codone 171-1



Saggio  
codone 171-2



- Elaborazione dei genotipi;
- associazione del genotipo al campione;
- esportazione nel SIL

referto





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*





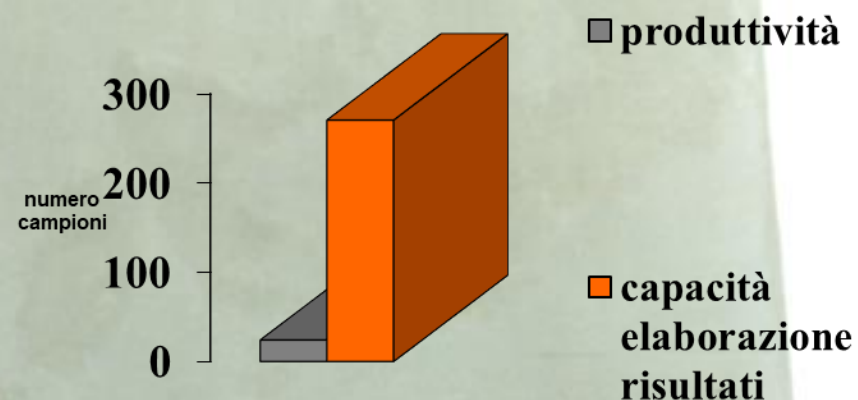
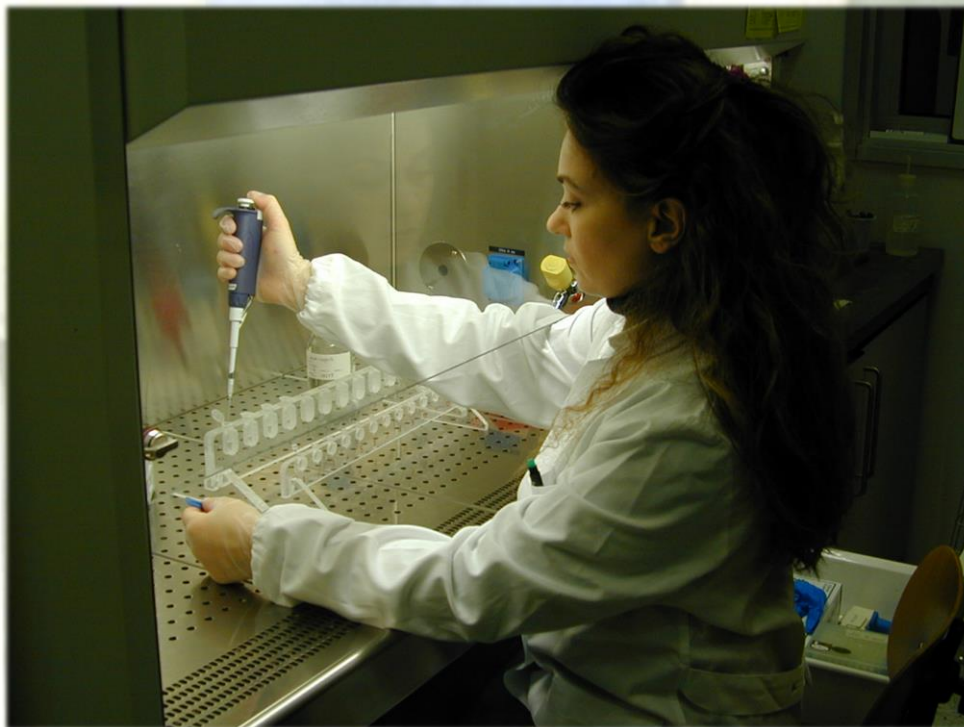
Nel corso degli anni, la produttività del laboratorio  
è stata incrementata grazie a:

- adeguamento della dotazione tecnologica
- introduzione di nuove chimiche
- informatizzazione dell'elaborazione  
dei risultati di PCR RealTime





# Nel 2003: produttività pari a circa 24-36 campioni/giorno



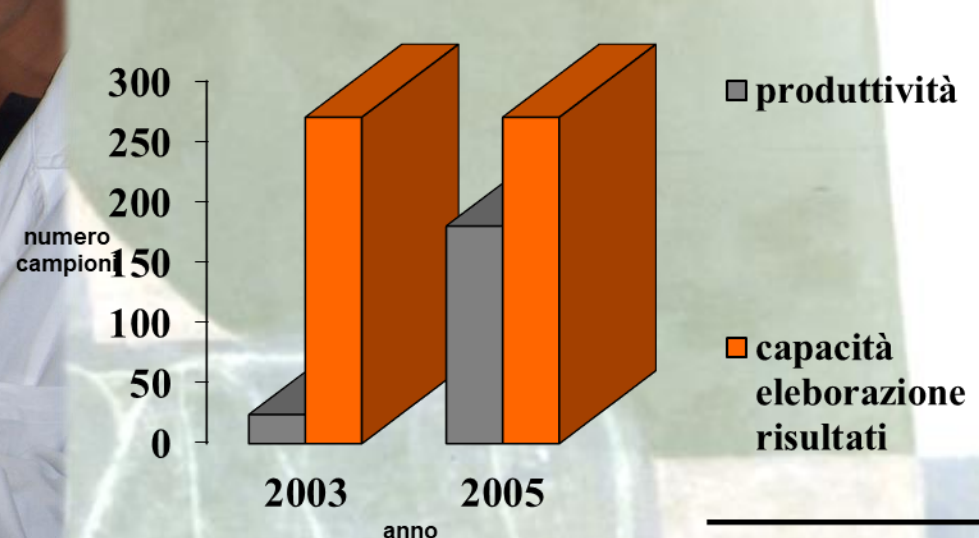
Prove allestita senza alcuna automazione, lavorando i campioni in singolo, sia per l'estrazione del DNA sia per l'allestimento delle reazioni di PCR. Elaborazione dei risultati: manuale





# Nel 2005: produttività incrementata a circa 180 campioni/giorno

Introducendo un estrattore di acidi nucleici "semiautomatico" nel formato "96 pozzetti"

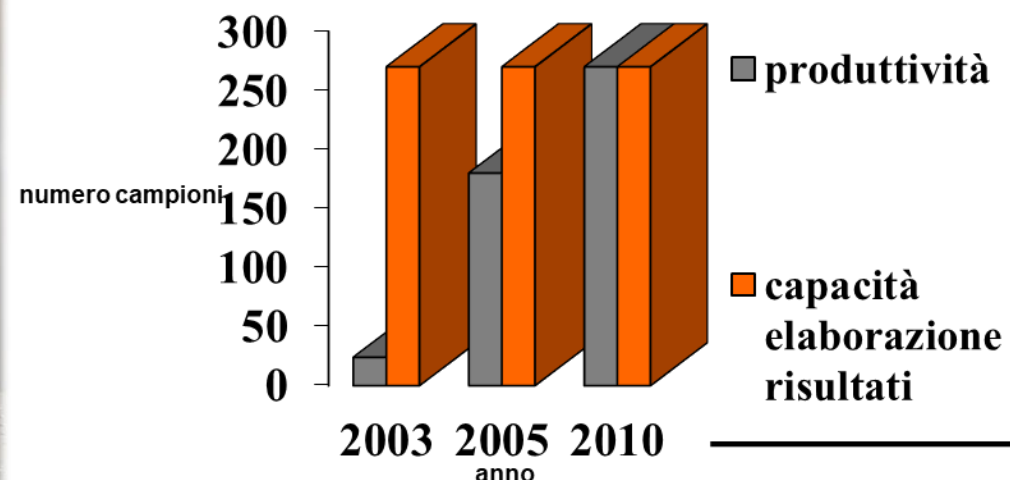




Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

# Nel 2010: produttività incrementata a circa 270 campioni/giorno

Introducendo dei "liquid handler" e la chimica "fast" per  
l'esecuzione delle reazioni di PCR Real Time.

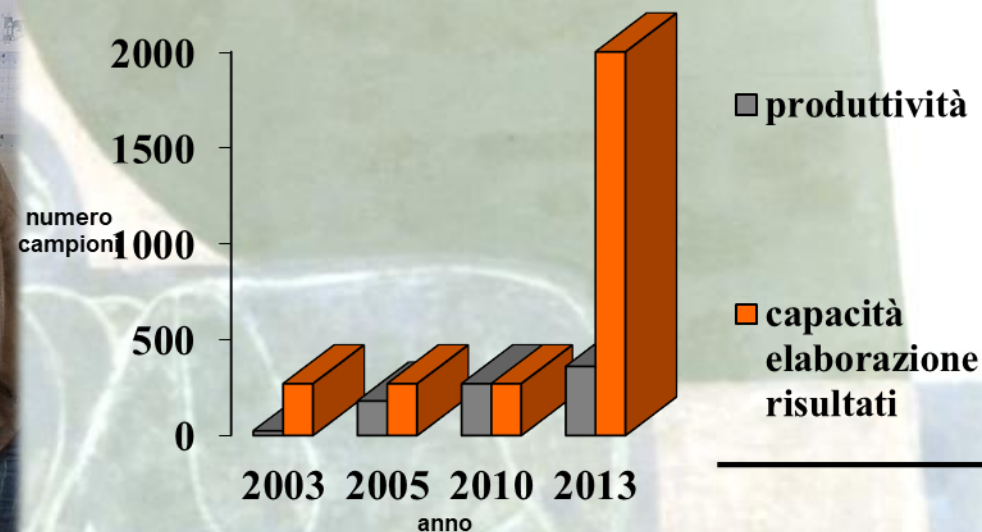






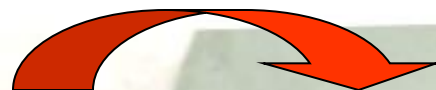
# Dal 2013: produttività 360 campioni/giorno ma con «potenziale informatico» superiore

Introducendo l'elaborazione informatica dei risultati

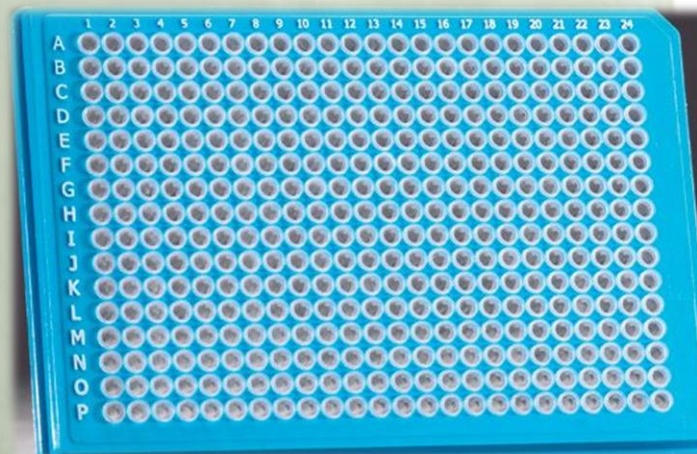
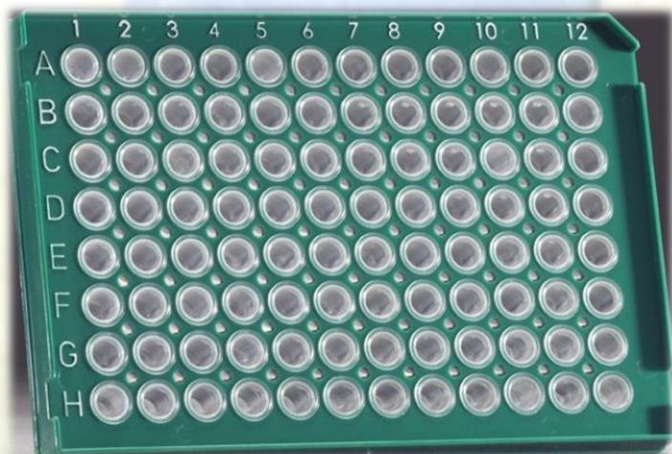




da 96 pozzetti



a 384 pozzetti



Un semplice «upgrade» dell'amplificatore *Real Time*  
consentirà di gestire fino a 1500 campioni/giorno (6000 PCR!)

