

Identificazione delle spore fungine aerodisperse tramite PCR Real Time

Dott.ssa F. Borney

Attività microbiologia

Alimenti

Depuratori e acque superficiali

Analisi microbiologiche varie matrici

Acque destinate al consumo umano

Controllo aria indoor e superfici

Biomonitoraggio (Diatomee)

Monitoraggio aerobiologico

Ecotossicologia

Endotossine

Altre attività



Aerobiologia e inquinamento

Aerobiologia

disciplina scientifica che si occupa del **trasporto** degli **organismi aerodiffusi** e dei suoi effetti in **ambienti confinati e aperti**

Le particelle studiate includono polveri, fumi, radionuclidi e pesticidi, **spore** e **frammenti di funghi**, alghe, protozoi, spore di felci e muschi, **pollini**, frammenti vegetali, piccoli semi, insetti e altra microfauna (dimensioni da 1 millesimo di micron a 1000 micron)

Le particelle **biologiche** sono **presenti in atmosfera** **singolarmente**, come **aggregati** o **aderenti** ad altre **particelle** o **goccioline** (bioaerosol!)

Aerobiologia e inquinamento

I **microrganismi aerodiffusi** hanno, alla stessa stregua degli inquinanti chimici classicamente misurati, **potenziali effetti nocivi** sulla salute degli individui.

Qualità aria outdoor



Monitoraggio aerobiologico
giornaliero



Qualità aria indoor



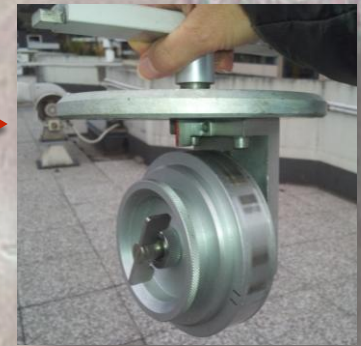
Monitoraggio
dell'aria in
ambienti di vita e
di lavoro

Monitoraggio
dell'aria in
ambienti ad alto
rischio (sale
operatorie)

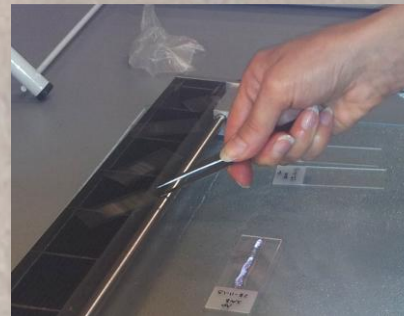


Monitoraggio aerobiologico giornaliero

L'aria da analizzare viene **prelevata** da una **pompa aspirante** (10 l/min – 7 g) e diretta sulla **superficie di campionamento** (nastro cosparso di silicone) sulla quale le particelle presenti si depositano per **impatto**



Il **nastro** è processato (**tagliato e colorato**) esaminato al **microscopio ottico** per l'**identificazione** ed il **conteggio** delle particelle



Monitoraggio aerobiologico giornaliero

Campo sanitario

informazioni utili nella diagnostica, clinica, terapia, ricerca e prevenzione di **patologie allergiche respiratorie**

Calendario pollinico di **Aosta (St. Christophe)** (2000-2015)

| | gen | feb | mar | apr | mag | giu | lug | ago | set | ott | nov | dic |
|---------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| POLLINI | | | | | | | | | | | | |
| Betulaceae (Alnus) | | | | | | | | | | | | |
| Betulaceae (Betula) | | | | | | | | | | | | |
| Compositae (Artemisia/Ambrosia) | | | | | | | | | | | | |
| Corylaceae (Corylus avellana) | | | | | | | | | | | | |
| Cupressaceae/Taxaceae | | | | | | | | | | | | |
| Gramineae | | | | | | | | | | | | |
| Oleaceae (Fraxinus) | | | | | | | | | | | | |
| Urticaceae | | | | | | | | | | | | |
| SPORE FUNGINE | | | | | | | | | | | | |
| Alternaria | | | | | | | | | | | | |

Legenda concentrazione: assente-molto bassa bassa media alta

stazione di rilevamento non attiva



Peronospora della vite



Campo ambientale

rileva gli impatti sulla flora dei **cambiamenti climatici**

monitora la diffusione di determinati **parassiti** delle piante

monitora la diffusione di **specie aliene** invasive sul territorio

valuta la **biodiversità** di specie vegetali

integra il monitoraggio della **qualità dell'aria**

Qualità dell'aria indoor

Campionamento
attivo



Campionamento
passivo



A seconda del tipo di germe che si deve ricercare, si utilizza un **terreno culturale** diverso



Lieviti e muffe

← Per esempio →

Legionella



Qualità dell'aria indoor

Limiti diversi a seconda degli ambienti

| Categoria di inquinamento microbiologico (batterica) | Case (UFC/m ³) | Ambienti non industriali (UFC/m ³) |
|--|----------------------------|--|
| Molto bassa | < 100 | < 50 |
| Bassa | < 500 | < 100 |
| Intermedia | < 2500 | < 500 |
| Alta | < 10000 | < 2000 |
| Molto alta | > 10000 | > 2000 |

Valori di carica batterica e valutazione della qualità dell'aria (European Collaborative Action, 1993) - **campionamento attivo**

| Categoria di inquinamento microbiologico (miceti) | Case (UFC/m ³) | Ambienti non industriali (UFC/m ³) |
|---|----------------------------|--|
| Molto bassa | < 50 | < 25 |
| Bassa | < 200 | < 100 |
| Intermedia | < 1000 | < 500 |
| Alta | < 10000 | < 2000 |
| Molto alta | > 10000 | > 2000 |

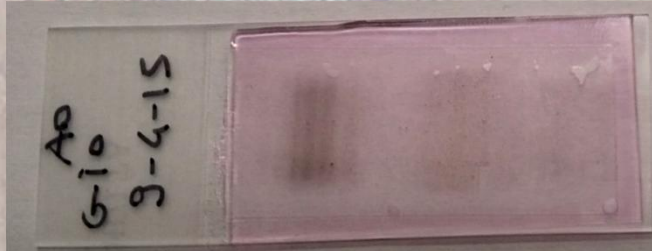
Valori di carica batterica e valutazione della qualità dell'aria (European Collaborative Action, 1993) - **campionamento attivo**

| Tipologia di ambiente | (UFC/piastra) |
|---|---------------|
| Ambienti ad altissimo rischio | |
| Ultra <i>clean room</i> , isolamento protettivo, sale operatorie per protesi auricolari, alcune lavorazioni dell'industria elettronica e farmaceutica | 5 |
| Ambienti ad alto rischio | |
| Clean room sale operatorie per chirurgia generale, rianimazione, dialisi, alcune lavorazioni dell'industria elettronica e farmaceutica, laboratori di microbiologia | 25 |
| Ambienti a medio rischio | |
| Ambulatori, laboratori, industrie alimentari, cucine, ristoranti, opifici | 50 |
| Ambienti a basso rischio | |
| Corsie d'ospedali, servizi, uffici | 75 |

Valori limite IMA (UFC/piastra) - **campionamento passivo**

Limiti esami microscopico e colturale

Esame microscopico



Richiede **personale altamente specializzato**

E' possibile giungere **solo all'identificazione del genere**

Esame colturale

Sottostima inevitabilmente la **biodiversità** presente in quanto solo il **17%** dei **funghi** conosciuti può crescere su piastra e molti di questi producono un micelio sterile

Non individua la presenza di **funghi non coltivabili**, che tuttavia possono produrre spore allergeniche

Crea un **bias** tra l'identificazione di spore fungine **a crescita veloce** e quelle **a crescita lenta**



Richiede un **terreno colturale** adatto alla crescita di **tutti i miceti** (non esiste)

PCR vantaggi

I metodi basati sulla PCR Real Time

offrono la possibilità di **rilevare e quantificare** simultaneamente il **DNA** di una specie microbica in un'**unica reazione** (no manipolazioni post-PCR)



rilevano la presenza di microrganismi **indipendentemente** dalla loro **coltivabilità e vitalità**

presentano **ridotti tempi analitici**

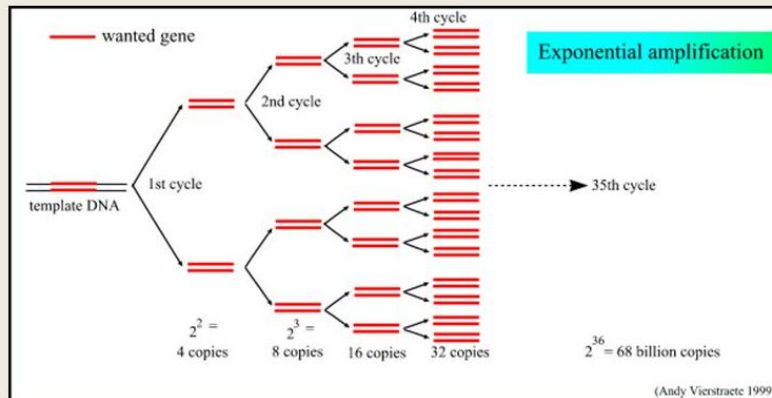
sono caratterizzati da **elevata sensibilità, specificità e ampio range dinamico**

PCR (Polymerase Chain Reaction)

Ideata e messa a punto (1983) da **Kary B. Mullis**
(Premio Nobel 1993)

basata sui principi della
duplicazione del DNA

Polymerase Chain Reaction (PCR)



tecnica enzimatica che consente
di amplificare in vitro una
regione specifica (bersaglio) di
DNA

↓
permette di ottenere una
quantità di acido nucleico
misurabile e caratterizzabile

andamento **esponenziale** della reazione
1 molecole di DNA → milioni di copie di DNA
tecnica estremamente **specific**a e **sensibile**

Il DNA amplificato viene poi rilevato mediante i mezzi più disparati

PCR (Estrazione DNA)

Lisi delle membrane

Chimica

Meccanica

Enzimatica

Termica

**Estrazione e
purificazione del
DNA**

solventi organici
fenolo/cloroformio;
adsorbimento su gel di silice

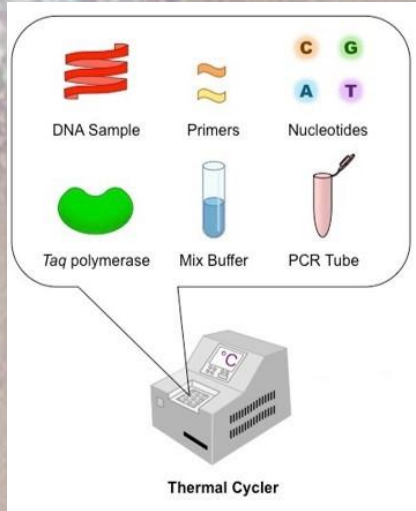
**Precipitazione del
DNA**

alcol etilico o
isopropanolo

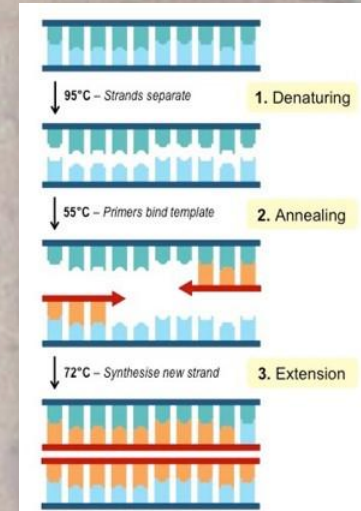


PCR fasi

Componenti della miscela di reazione



Fasi



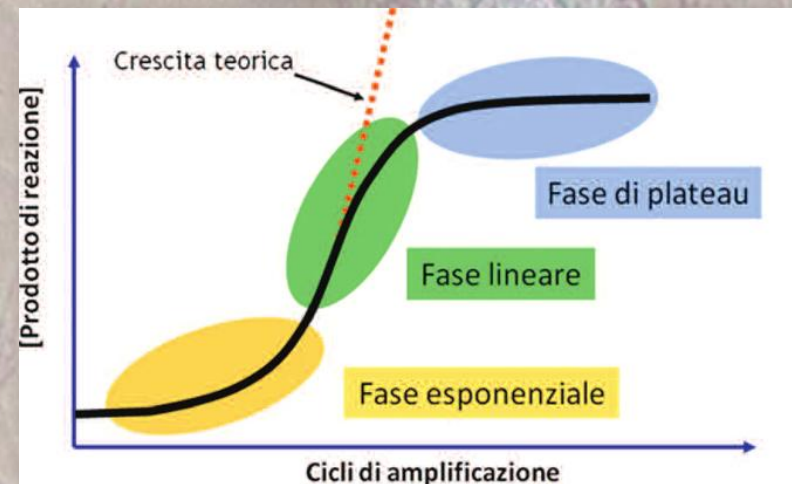
Il processo di duplicazione **non** ha una resa del **100%**

Quantità dei reagenti

Limitato da

Reannealing dei filamenti

Attività della Taq polimerasi

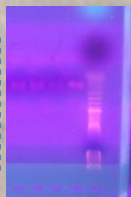


PCR End Point e PCR Real Time

PCR End Point

Amplificazione nel termociclatore

Un' aliquota sottoposta a **elettroforesi** su gel di agarosio per verifica



Lunghezza
dell'amplificato

Quantità di
amplificato

L'assenza di
frammenti aspecifici

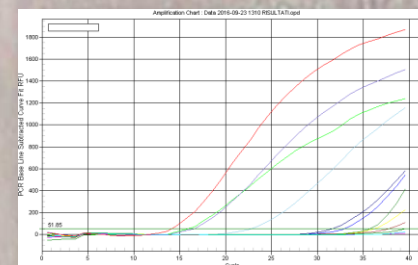
non automatizzata; bassa precisione e sensibilità; range dinamico limitato;
processamento post PCR (elevato rischio di contaminazione)



PCR Real Time

Rileva la **fluorescenza** associata all'**amplificazione**

Misura l'amplificazione in **tempo reale** durante la **fase esponenziale** della PCR



risultati molto **accurati**;
il **processo** di quantificazione è **automatizzato** e permette un range dinamico molto ampio

Chimiche PCR Real Time

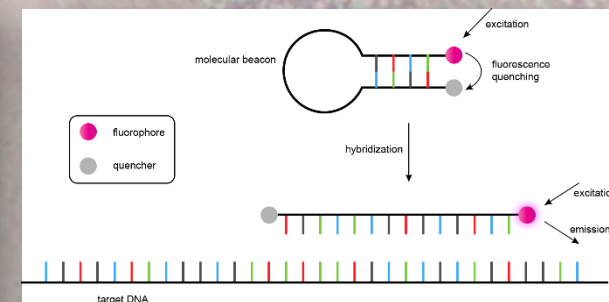
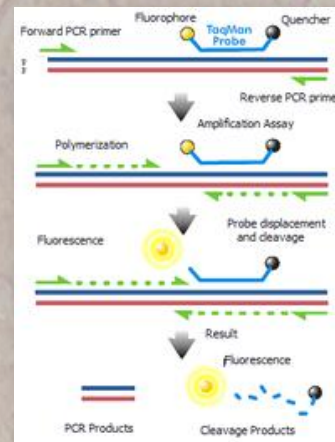
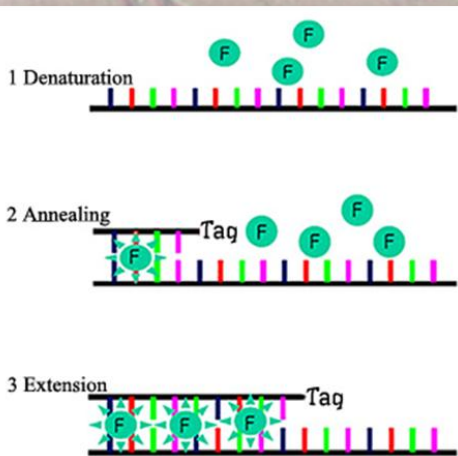
La fluorescenza è generata per effetto di diversi tipi di **reazioni chimiche** basate su

legame di **coloranti fluorescenti** che si intercalano in maniera **aspecifica** al dsDNA (SYBR Green)

ibridazione con sonde specifiche per il frammento di interesse, marcate con **molecole fluorescenti**

dual-labeled
come la **TaqMan**

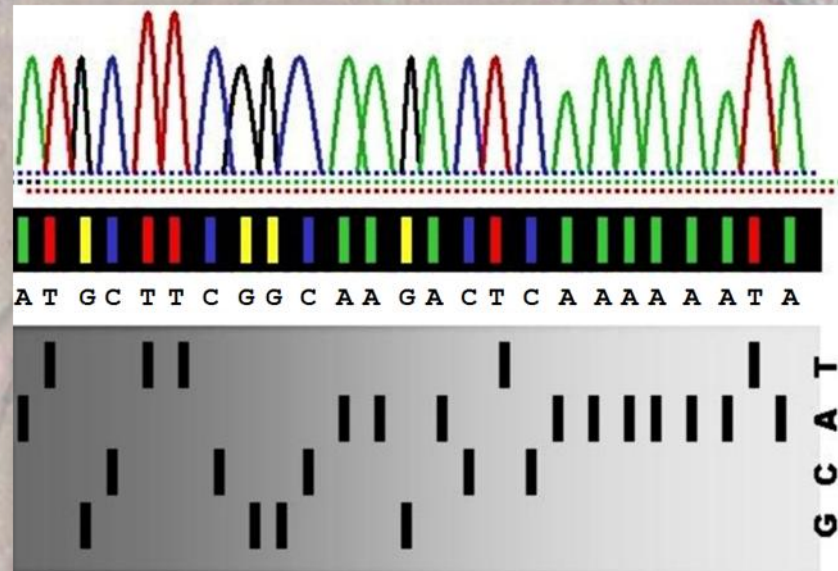
Molecular Beacon



Sequenziamento

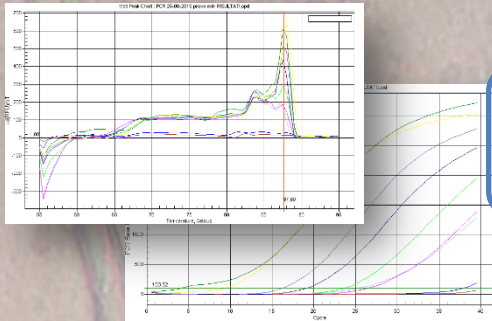
Processo per la
determinazione **dell'esatta
struttura primaria** di un
biopolimero

Nel caso del DNA serve a
mettere in fila le basi
(A,C,G,T) che costituiscono
il frammento di DNA in
analisi, in modo da poterlo
**leggere propriamente ed
analizzare**



Sequenziamento

Produzione di **database**

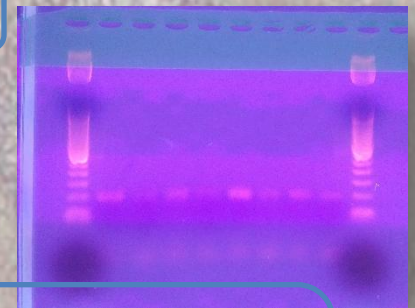


Sequenziamento
genomi



Identificazione di
microrganismi e loro
tipizzazione

Studi **epidemiologici**



Studio della
biodiversità



Metagenomica

Produzione della conoscenza necessaria
per la **manipolazione di geni** (cura di
malattie genetiche e tumori)

Sequenziamento

Metodo enzimatico **Sanger** (premio Nobel 1958 e 1980)

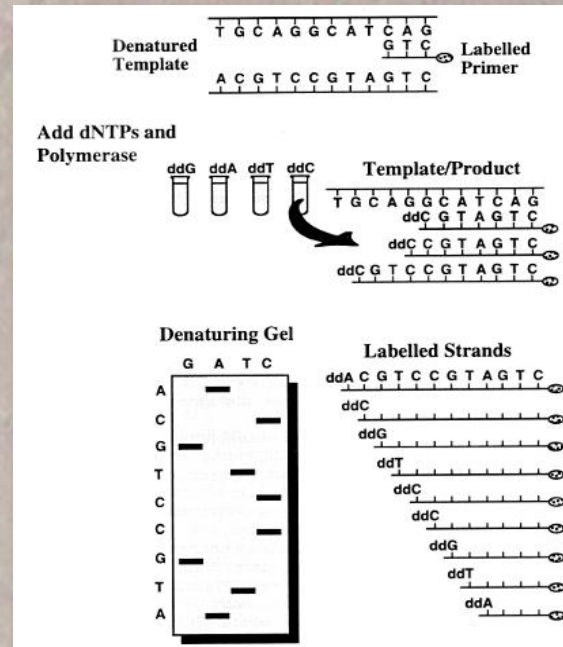
impiego di **nucleotidi terminatori** (ddNTP) di **catena** legati a coloranti
fluorescenti

sintesi filamento
complementare DNA

miscela di filamenti
di diversa lunghezza

elettroforesi

frammenti vengono
ordinati in base alla
loro **lunghezza**



La **disposizione** dei **frammenti** svela la **sequenza**
dei nucleotidi e la stringa del DNA stampo

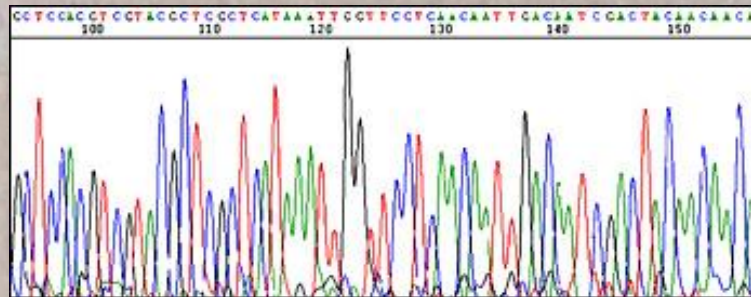
Sequenziamento

Sequenziatori automatici - Elettroforesi capillare

Ogni ddNTP è associato a un **fluoroforo diverso**

I **frammenti** neosintetizzati di lunghezza differente sono **separati** tramite **elettroforesi capillare** e i diversi colori sono **rilevati** per mezzo di un **raggio laser**

Sequenza del DNA



La **reazione** di sintesi avviene **contemporaneamente** per tutti i nucleotidi in un'unica **provetta**

dedotta in base al **colore** di ciascun frammento di DNA neosintetizzato

convertita nella **sequenza complementare** del DNA stampo, tramite l'utilizzo di software dedicati

I risultati ottenuti devono essere analizzati (**analisi bioinformatica**)

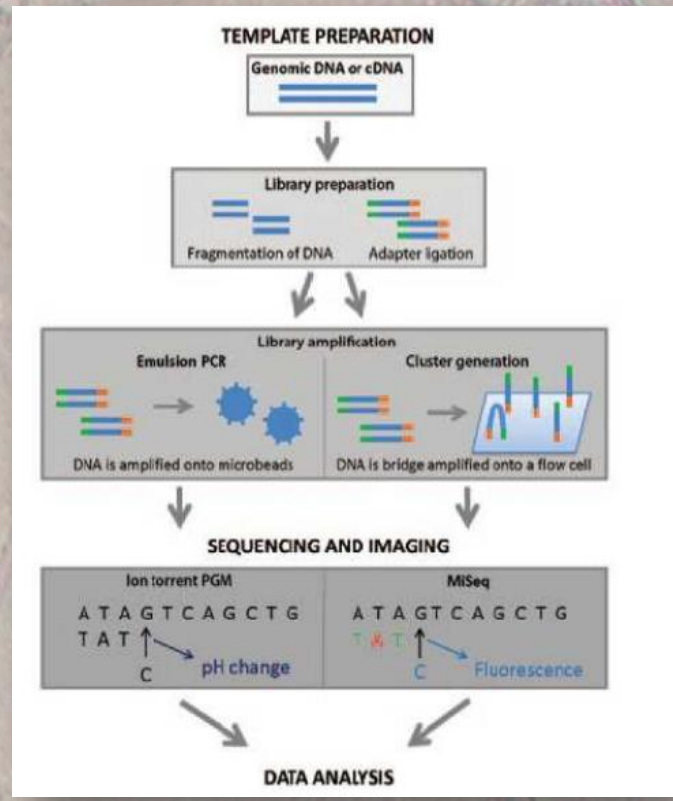


Sequenziamento (Next generation)

template **immobilizzato** su superficie o supporto solido

L'**immobilizzazione** di **molecole** spazialmente separate permette di **eseguire simultaneamente** migliaia o milioni di reazioni di sequenziamento

diversi tipi di sequenziatori NGS
Tutti i metodi sono accomunati da **quattro fasi**



Principale vantaggio: **produzione** di un volume **enorme** di dati

costi estremamente più **bassi**

tempi estremamente più **rapidi**

Tecniche molecolari applicate al monitoraggio aerobiologico



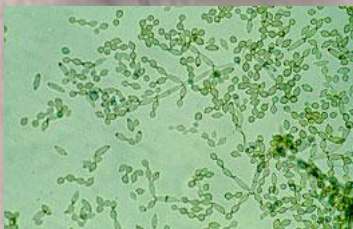
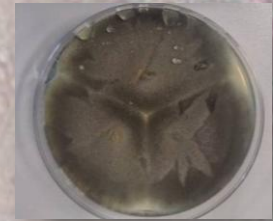
Lavoro svolto presso il laboratorio di microbiologia dell'ARPA Valle d'Aosta, nell'ambito di un **progetto di tesi** (Scuola di Specializzazione in Microbiologia e Virologia dell'Università di Torino)

Determinazione quali-quantitativa di **pollini** e **spore fungine** aerodisperse (generi *Alternaria* e *Cladosporium*), tramite l'**amplificazione** del **DNA target** con metodiche di biologia molecolare (PCR Real Time)

Perché *Alternaria* e *Cladosporium*?

L'esposizione a spore di ***Alternaria*** é una delle principali **cause** di **reazioni allergiche** quali asma, congiuntivite, rinite e dermatiti. Per questo motivo é importante il suo costante monitoraggio.

Presenta un **elevato polimorfismo** tra le forme piú mature e quelle piú giovani, non sempre facilmente riconoscibili. Ciò porta, probabilmente, a **sottostimare** la **concentrazione** effettiva di spore in aria

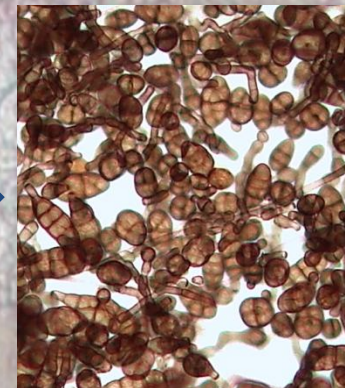
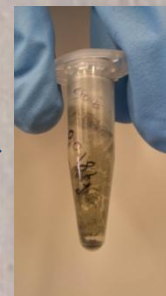


Il genere ***Cladosporium*** é costituito da circa 60 specie, tra le quali molte sono **patogene** per le **piante**, altre provocano **allergie** e indebolimento del sistema immunitario nell'uomo.

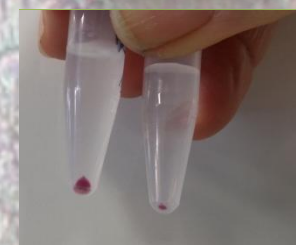
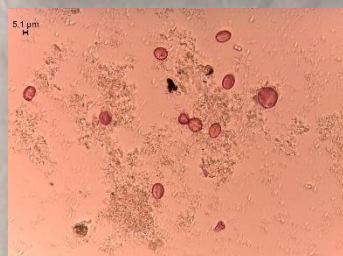
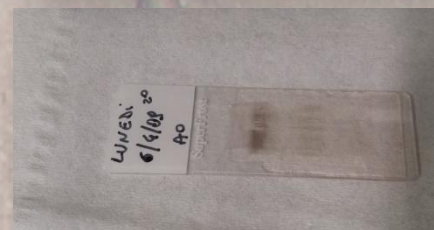
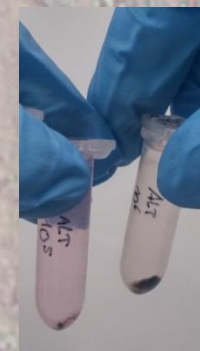
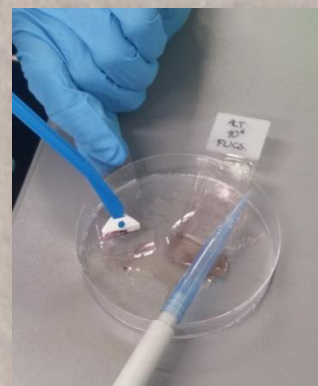
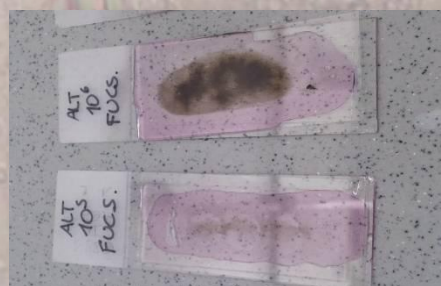
I **conidi** sono facilmente riconoscibili su vetrino, tuttavia le **piccole dimensioni** e la **concentrazione elevata** in cui si trovano durante il periodo di rilascio, ne rendono difficoltoso il conteggio e la quantificazione precisa.

Raccolta delle spore da colonie di muffe cresciute su piastra Petri

Otteniamo da ciascuna piastra una sospensione pari a circa 10^7 spore/ml per *Alternaria* e a circa 10^8 spore/ml per *Cladosporium*



Raccolta delle spore da vetrini di monitoraggio



Vetrino di
monitoraggio
aerobiologico

Visione al
microscopio ottico

Pulizia del vetrino
con Cell Scraper

Pollini e spore
raccolti in
provetta

Estrazione del DNA

Metodo di estrazione basato sull'utilizzo del CTAB
(POS VIR 031 INT rev.1 del 11/05/2011, IZSLT)

Lisi cellulare

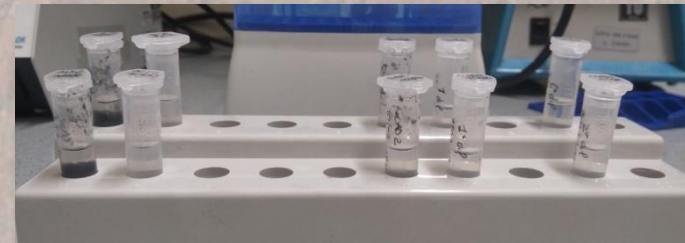
Purificazione del DNA

Precipitazione del DNA

Lavaggio del DNA

Risospensione del DNA

**Valutazione quali-quantitativa del
DNA estratto (spettrofotometro)**



Estrazione del DNA da spore

Per le spore è necessario effettuare un **pre-trattamento** di tipo **meccanico** (biglie di vetro) per la rottura della parete cellulare

Sono stati testati diversi
protocolli

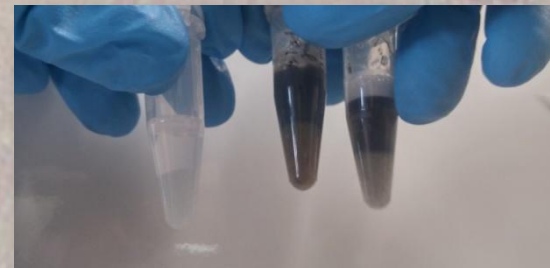
Dean T.R. et
al. 2004

Pashley C. H.
et al. 2012

Yamamoto N.
et al. 2010

Il **protocollo finale** scelto:

Pre-trattamento (Pashley C. H. et al. 2012)
Estrazione e purificazione del DNA con
CTAB



Amplificazione DNA tramite Real-time PCR

Primers disegnati per la verifica della presenza di **DNA fungino**

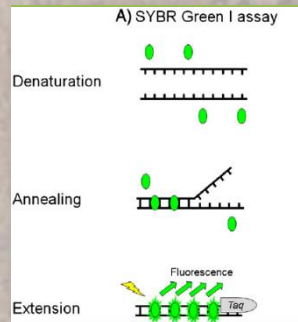
ITS (ITS1 e ITS4)

(ITS=Internal Transcribed Spacer rDNA. White et al. 1990; Gardes & Bruns 1993)

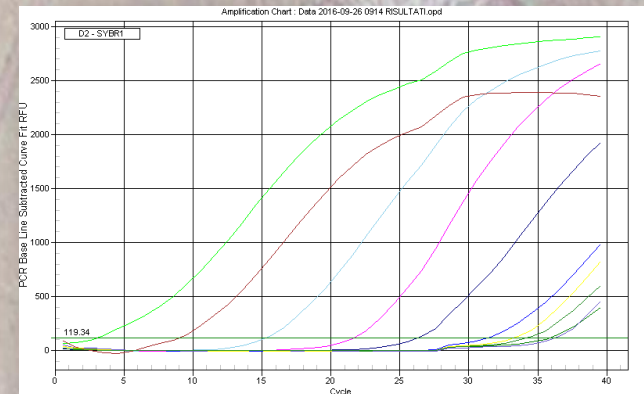
Primers disegnati per la rilevazione di **DNA** caratteristico del **genere**

ALT (*Alternaria spp.*) (ITS. Crespo-Sempere et al. 2013).

CLAD (*Cladosporium spp.*) (SSU = Small Sub Unit rDNA. Qing-Yin Zeng et al. 2006)



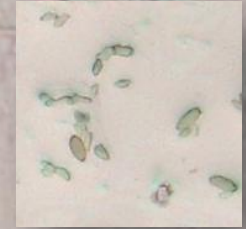
Excitation light SYBR Green I dye



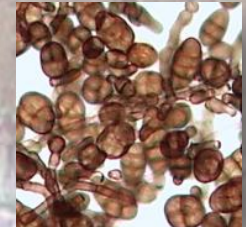
Chimica utilizzata per la rilevazione dell'amplificato → **SYBR Green I**

Risultati

***Cladosporium* spp.** → Il metodo, ha dimostrato buona efficienza, specificità, riproducibilità e sensibilità (**10² spore/reazione**)



***Alternaria* spp.** → sono state evidenziate alcune **criticità** nella fase di **estrazione** e **purificazione** dell'acido nucleico. Le condizioni utilizzate per *Cladosporium* spp non sembrano adeguate a **spore di grandi dimensioni** (Yamamoto N. et al. 2010).



E' anche possibile che lo **stato fisiologico** dei conidi influenzi l'efficienza di estrazione del DNA (Andersen B. et al. 2006)

L'**applicabilità** del metodo sui vetrini del monitoraggio aerobiologico, dopo colorazione con fucsina, **non è stata dimostrata.**



Studio biodiversità su vetrini del monitoraggio aerobiologico



"Development of NGS meta-barcoding for the characterization of aerobiological samples"

Progetto finanziato dall' Università di Trieste dal Finanziamento per la Ricerca di Ateneo, FRA 2016, assegnato alla Dr.ssa Lucia Muggia, afferente al Dipartimento di Scienze della Vita.

A screenshot of a PLOS ONE article page. The page title is 'DNA metabarcoding uncovers fungal diversity of mixed airborne samples in Italy'. The authors listed are Elisa Banchi, Claudio Gennaro Ametrano, David Stanković, Pierluigi Verardo, Olga Moretti, Francesca Gabrielli, Stefania Lazzarin, Maria Francesca Borney, Francesca Tassan, Mauro Tretiach, Alberto Pallavicini, and Lucia Muggia. The article is published in March 20, 2018. The page shows 6 saves, 1 citation, 1,332 views, and 2 shares.

| | |
|------------|------------|
| 6 Save | 1 Citation |
| 1,332 View | 2 Share |

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0194489>

Studio biodiversità su vetrini del monitoraggio aerobiologico

Campionamento

Estrazione DNA

Prima PCR Real time (Amplificazione del DNA estratto target ITS2)

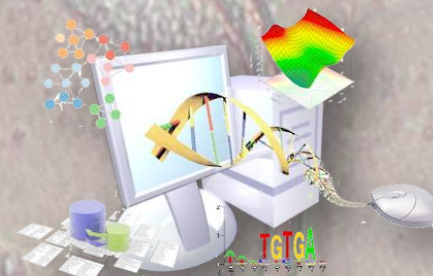
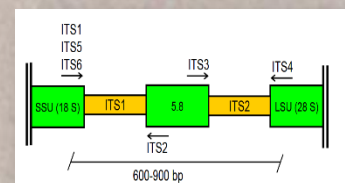
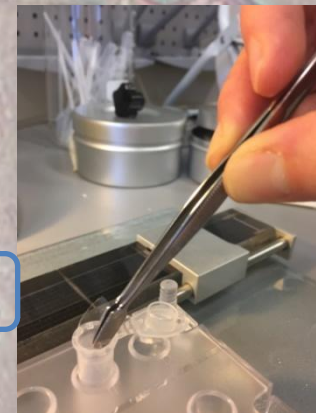
Seconda PCR Real time (**Switch PCR**
attacco adattatori e barcodes per PCR
multiplex = **library**)

Controllo qualità e lunghezza ampliconi
(elettroforesi su gel di agarosio)

Preparazione di pool in concentrazione equimolare

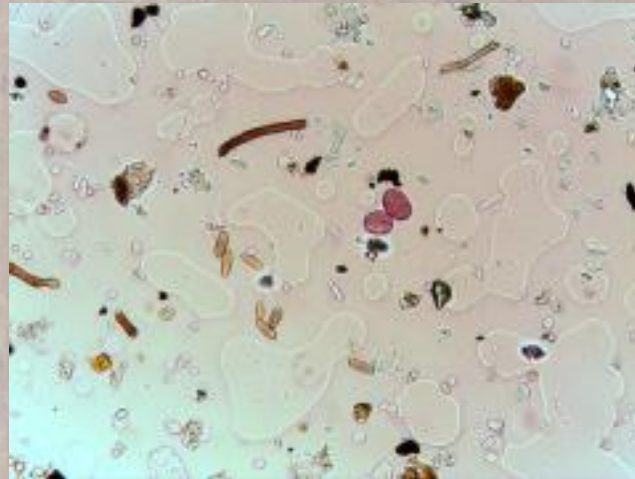
Sequenziamento (Ion Torrent) 400 bp

Analisi **bioinformatica** dei risultati



Studio biodiversità su vetrini del monitoraggio aerobiologico

Il numero dei **taxa** **identificati** con il DNA *metabarcoding* è **10 volte più grande** di quello identificato con l'analisi microscopica (238 vs. 22 generi)



Aumento della **sensibilità** del biomonitoraggio aerobiologico e della **conoscenza** della **biodiversità** fungina nell'aria

La standardizzazione della metodica applicata potrà diventare un **utile strumento** per il **monitoraggio** delle **spore** fungine **patogene** e della loro distribuzione in tempi brevi e in maniera altamente **precisa** e **riproducibile**

Rilevazione di spore fitopatogene su vetrini del monitoraggio aerobiologico

Smart Monitoring of Airborne pathogens – supporting Risk based plant health surveillance (SMART Surveillance)

European Food Safety Authority (EFSA)

obiettivo principale quello di **sviluppare** approcci aerobiologici per **supportare** la **sorveglianza** (risk based surveillance) su due patogeni aerodispersi

Guignardia citricarpa
colpisce le coltivazioni di agrumi (citrus black spot)



Hymenoscyphus fraxineus
determina la moria del frassino maggiore (ash dieback)



Grazie per l'attenzione