

# 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

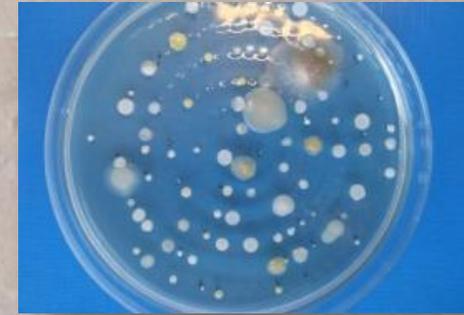
monitora la diffusione di **specie aliene** invasive sul territorio

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 <sup>3</sup> )	Ambienti non industriali (UFC/m <sup>3</sup> )
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 <sup>3</sup> )	Ambienti non industriali (UFC/m <sup>3</sup> )
Molto bassa	< 50	< 25
Bassa	< 200	< 100
Intermedia	< 1000	< 500
Alta	< 10000	< 2000
Molto alta	> 10000	> 2000

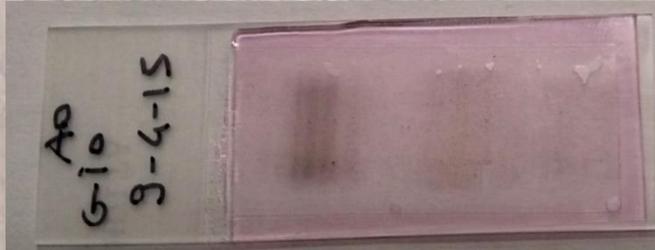
Valori di carica batterica e valutazione della qualità dell'aria (European Collaborative Action, 1993) - **campionamento attivo**

Tipologia di ambiente	(UFC/piastra)
<b>Ambienti ad altissimo rischio</b>	
Ultra <i>clean room</i> , isolamento protettivo, sale operatorie per protesi auricolari, alcune lavorazioni dell'industria elettronica e farmaceutica	5
<b>Ambienti ad alto rischio</b>	
Clean room sale operatorie per chirurgia generale, rianimazione, dialisi, alcune lavorazioni dell'industria elettronica e farmaceutica, laboratori di microbiologia	25
<b>Ambienti a medio rischio</b>	
Ambulatori, laboratori, industrie alimentari, cucine, ristoranti, opifici	50
<b>Ambienti a basso rischio</b>	
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 micorganismi **indipendentemente** dalla loro **coltivabilità e vitalità**

presentano **ridotti tempi analitici**

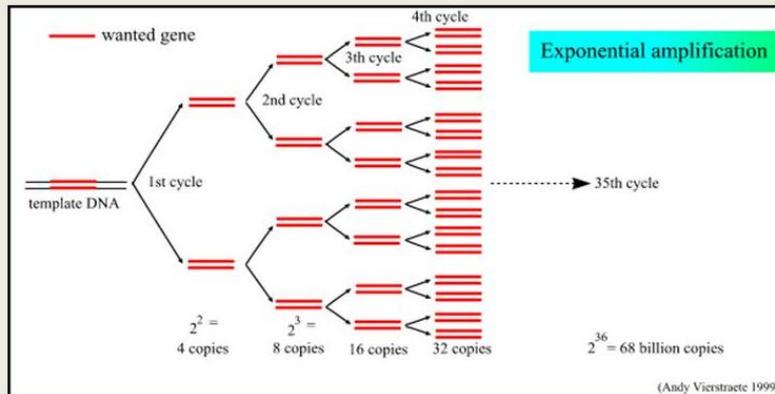
sono caratterizzati da **elevata sensibilità, specificità e ampio range dinamico**

# 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

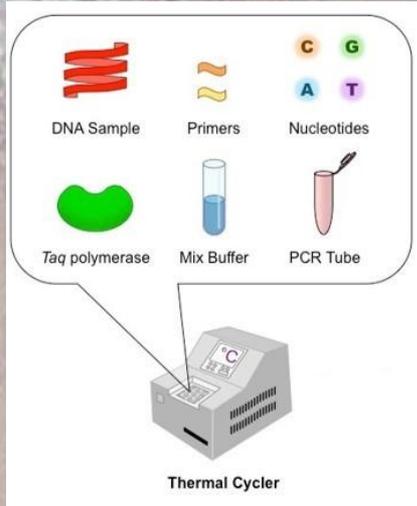
**Precipitazione del  
DNA**

alcol etilico o  
isopropanolo

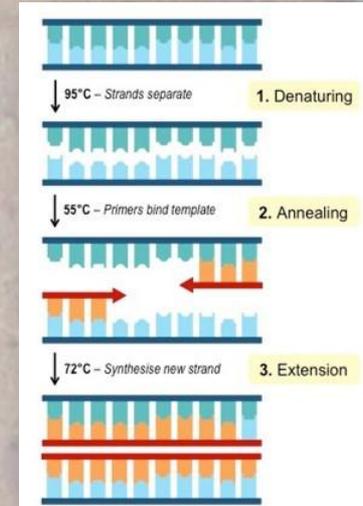


# PCR fasi

## Componenti della miscela di reazione



## Fasi



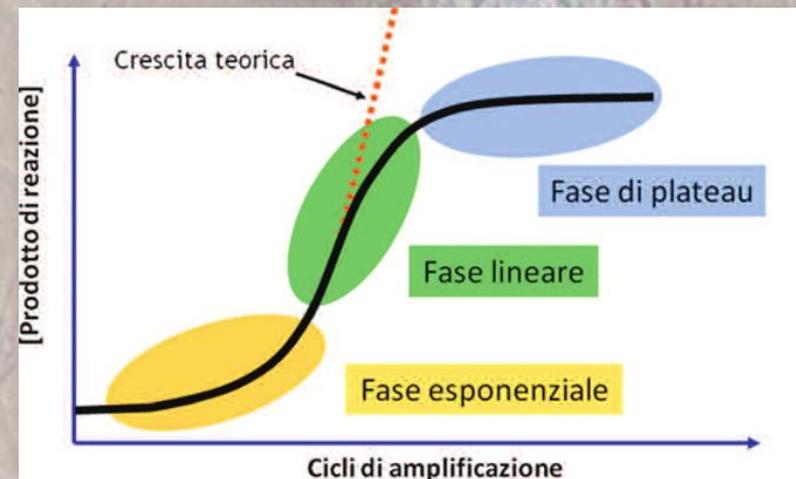
Il processo di duplicazione **non** ha una resa del **100%**

Quantità dei reagenti

Limitato da

Reannealing dei filamenti

Attività della Taq polimerasi

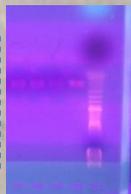


# PCR End Point e PCR Real Time

## 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

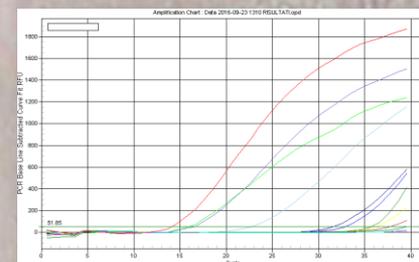
**non automatizzata**; bassa precisione e sensibilità; range dinamico limitato;  
**processamento post PCR** (elevato rischio di contaminazione)



## 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

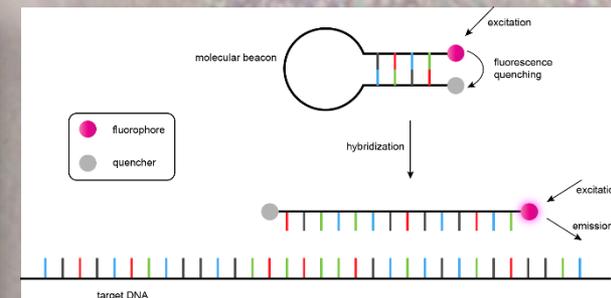
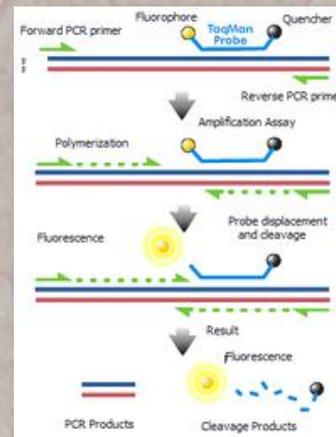
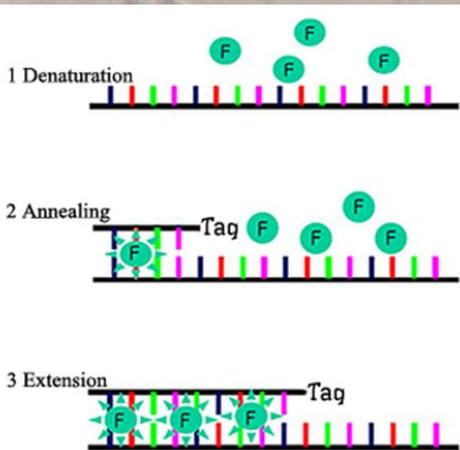
La fluorescenza è generata per effetto di diversi tipi di **reazioni chimiche** basate su

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**

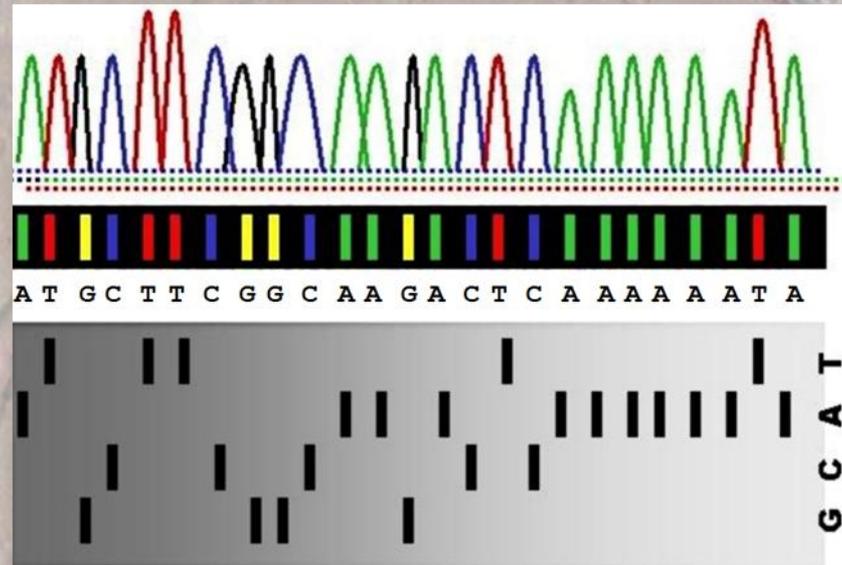
**Molecular Beacon**



# Sequenziamento

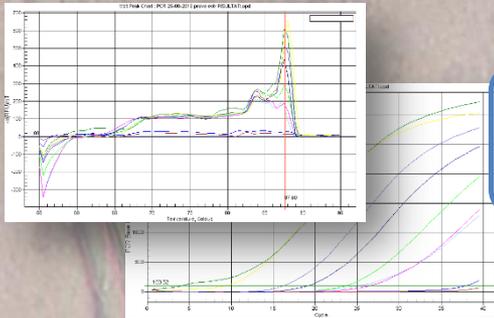
Processo per la  
determinazione **dell'esatta  
struttura primaria** di un  
biopolimero

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**

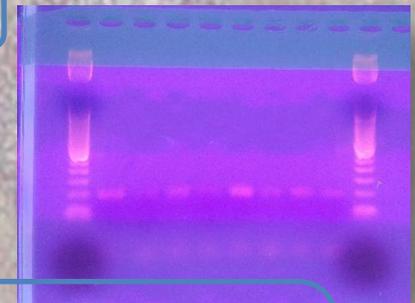


Sequenziamento  
genomi



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)



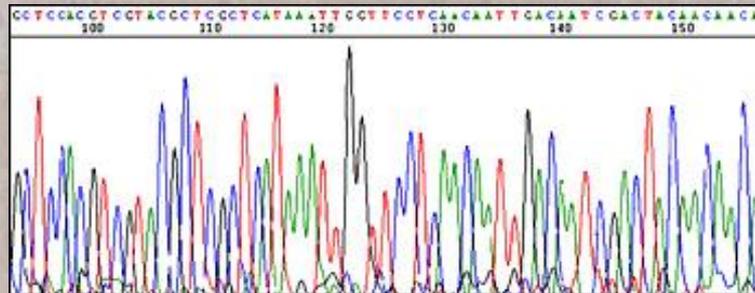
# Sequenziamento

## 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**)

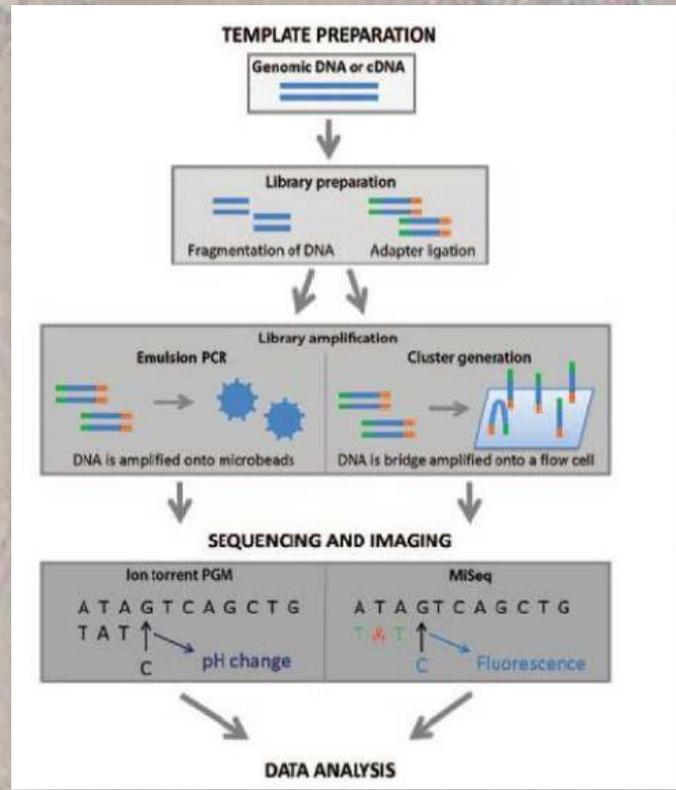


# Sequenziamento (Next generation)

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



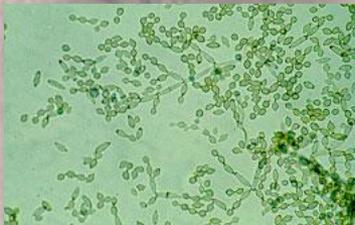
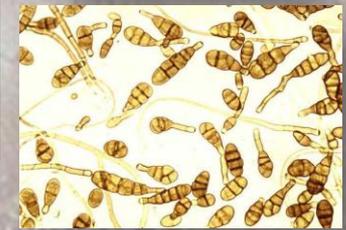
Lavoro svolto presso il laboratorio di microbiologia dell'ARPA Valle d'Aosta, nell'ambito di un **progetto di tesi** (Scuola di Specializzazione in Microbiologia e Virologia dell'Università di Torino)

**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 più mature e quelle più giovani, non sempre facilmente riconoscibili. Ciò porta, probabilmente, a **sottostimare** la **concentrazione** effettiva di spore in aria

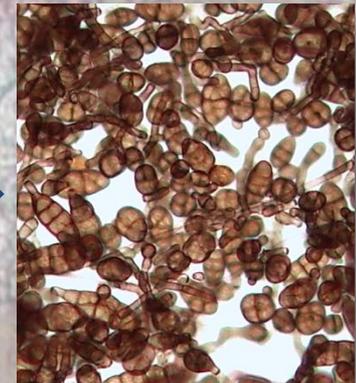


Il genere ***Cladosporium*** é costituito da circa 60 specie, tra le quali molte sono **patogene** per le **piante**, altre provocano **allergie** e indebolimento del sistema immunitario nell'uomo.

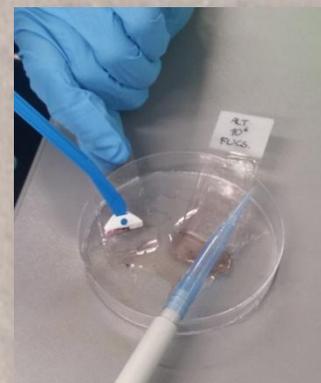
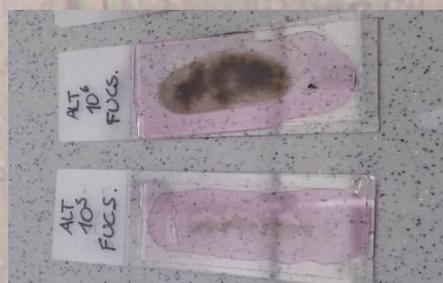
I **conidi** sono facilmente riconoscibili su vetrino, tuttavia le **piccole dimensioni** e la **concentrazione elevata** in cui si trovano durante il periodo di rilascio, ne rendono difficoltoso il conteggio e la quantificazione precisa.

# 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**

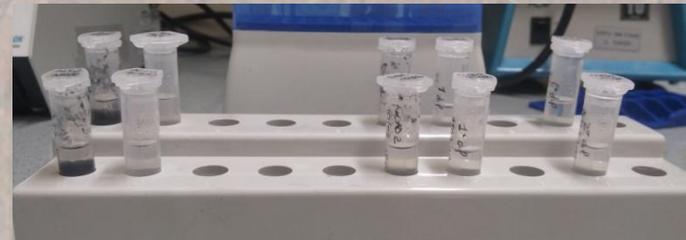
**Purificazione del DNA**

**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**

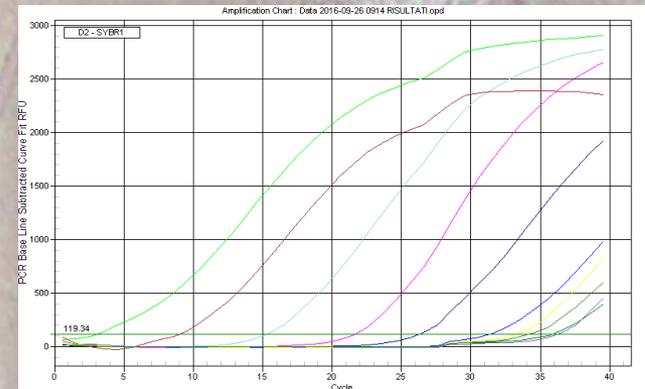
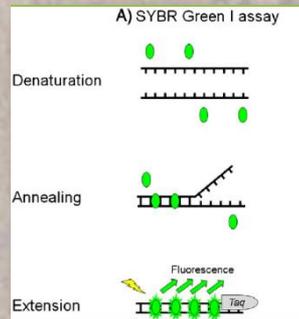
**ITS** (ITS1 e ITS4)

(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).

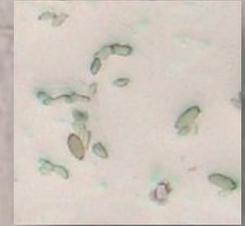
**CLAD** (*Cladosporium spp.*) (SSU = Small Sub Unit rDNA. Qing-Yin Zeng et al. 2006)



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

# Risultati

***Cladosporium* spp.** → Il metodo, ha dimostrato buona efficienza, specificità, riproducibilità e sensibilità (**10<sup>2</sup> 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)

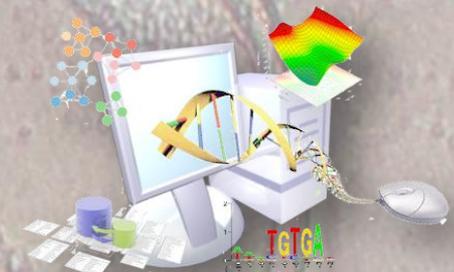
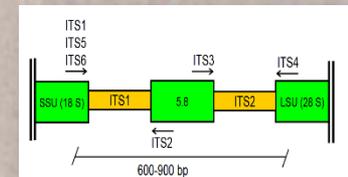
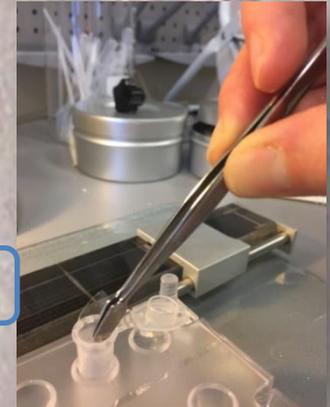
Seconda PCR Real time (**Switch PCR**  
attacco adattatori e barcodes per PCR  
multiplex = **library**)

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

Preparazione di pool in concentrazione equimolare

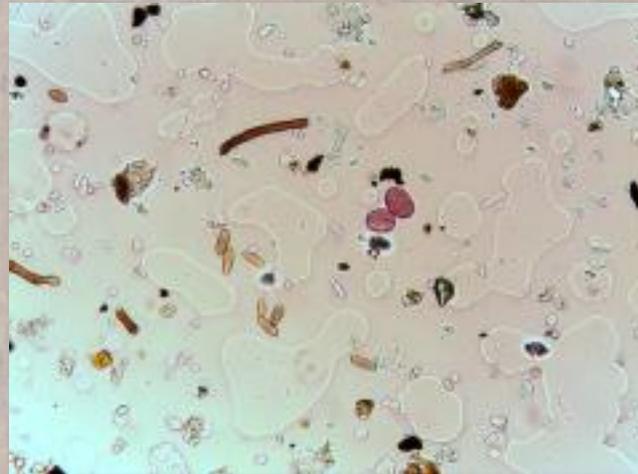
**Sequenziamento** (Ion Torrent) 400 bp

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