



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO

SCUOLA DI SPECIALIZZAZIONE IN MICROBIOLOGIA E
VIROLOGIA

TESI DI SPECIALIZZAZIONE

**Tecniche molecolari applicate al monitoraggio aerobiologico:
ricerca dei conidi di *Alternaria* e *Cladosporium*.**

Direttore Prof.ssa **Rossana CAVALLO**

Co-Relatore Prof.ssa **Vivian TULLIO**

Dott.ssa **M. Francesca BORNEY**

Presentata dalla Dott.ssa

Cristina GYPPAZ

A.A. 2015/2016

SOMMARIO

1	Introduzione	3
1.1	L'aerobiologia	3
1.2	I funghi	6
1.2.1	La riproduzione fungina	6
1.2.2	I propaguli riproduttivi fungini nel bioaerosol	8
1.2.3	Metodo di cattura conidi/spore outdoor.....	11
1.2.4	<i>Alternaria</i>	16
1.2.5	<i>Cladosporium</i>	20
1.2.6	Allergie ai funghi	23
1.3	Polymerase Chain Reaction (PCR).....	27
1.3.1	Glossario per interpretazione PCR.....	33
2	SCOPO DEL LAVORO	37
3	MATERIALI e METODI.....	38
3.1	Raccolta dei conidi per lo stock di riferimento	38
3.2	Raccolta conidi da vetrini veri e simulati	41
3.3	Estrazione del DNA	43
3.3.1	Confronto tra due pre-trattamenti meccanici	43
3.3.2	Confronto tra 3 tempi di rottura meccanica diversi.....	44
3.3.3	Confronto pre-trattamento a freddo del campione e stato fisiologico dei conidi.....	44
3.3.4	Scelte finali per il pre-trattamento	45
3.4	Purificazione del DNA estratto	46
3.4.4	Metodo CTAB	46
3.4.5	METODO con DNeasy plant mini kit (Qiagen, Germany).....	50
3.4.6	Calcolo dell'efficienza di estrazione	52
3.5	Amplificazione del DNA tramite Polymerase Chain Reaction (PCR).....	53
3.5.4	Strumentazione e reattivi	53
3.5.5	Protocolli di preparazione delle master-mix e concentrazioni primers utilizzati	54
3.5.6	Protocolli termici utilizzati	55
3.5.7	Analisi dei risultati di PCR.....	56
3.6	Analisi dei risultati del metodo.....	60
3.6.1	Sensibilità del metodo.....	60
3.6.2	Riproducibilità del metodo	61
3.7	Applicabilità ai vetrini di monitoraggio.....	61

4	RISULTATI e DISCUSSIONI	63
4.1	Raccolta dei conidi da vetrini e conteggio	63
4.2	Estrazione DNA	63
4.2.1	Confronto tra due pre-trattamenti meccanici	63
4.2.2	Confronto tempi di rottura meccanica	64
4.2.3	Confronto pre-trattamento a freddo del campione e stato fisiologico dei conidi	66
4.2.4	Confronto tra i diversi metodi di purificazione	68
4.2.5	Efficienza di estrazione	69
4.3	Analisi dei risultati di PCR	70
4.3.1	PCR Primers ITS	70
4.3.2	PCR Primers CLAD e ALT	71
4.3.3	Efficienza della PCR	71
4.3.4	Ripetibilità intermedia (Riproducibilità) della PCR	74
4.3.5	Sensibilità della PCR	75
4.4	Analisi dei risultati del METODO COMPLETO	76
4.4.1	Sensibilità del METODO	76
4.4.2	Riproducibilità del metodo	77
4.5	Applicazione del metodo ai vetrini di monitoraggio veri o simulati	79
5	CONCLUSIONI	81
6	BIBLIOGRAFIA	84

1 INTRODUZIONE

Il numero delle allergie fungine è in continuo aumento (Knutsen et al., 2012), così come le fitopatologie dovute ai miceti, che provocano danni all'agricoltura e alle industrie alimentari (Grube et al., 2015).

Tuttavia, malgrado la necessità sempre più pressante di isolare e caratterizzare agenti patogeni così diffusi per poter attuare le idonee strategie terapeutiche, l'identificazione precisa delle diverse specie fungine è ancora oggi affidata a tecniche analitiche oramai non più soddisfacenti.

Il riconoscimento dei miceti può essere effettuato con l'analisi diretta al microscopio ottico, che necessita di un operatore esperto. Nel caso di ricerca *outdoor*, il campionamento è svolto con appositi strumenti catturatori, che consentono di rilevare i propaguli riproduttivi fungini presenti nell'aria. Un'altra modalità, adatta in particolare per la ricerca *indoor*, prevede il campionamento diretto per deposizione su piastre Petri contenenti terreno colturale, seguito da incubazione a temperatura idonea, poi, il reisolamento delle colonie cresciute, eventuali analisi biochimiche e, infine, l'analisi microscopica delle strutture riproduttive. Oggi queste tecniche non sono più soddisfacenti, poiché sono tecniche laboriose, poco standardizzabili e con tempi di esecuzione molto lunghi, in particolar modo per quanto riguarda la coltura su piastra, i cui tempi variano da specie a specie, ma richiedono un minimo di 48h d'incubazione. Inoltre, nella maggior parte dei casi, queste metodiche non forniscono risultati accurati, poiché presentano una bassa specificità nell'identificazione della specie. Il punto di maggior criticità è tuttavia la presenza di miceti VBNC (*viable, but not culturable*) che non crescono su nessun terreno colturale.

L'utilizzo di tecniche biomolecolari permette, invece, un'identificazione rapida, specifica e caratterizzata da una maggiore sensibilità (Hospodsky et al., 2010).

1.1 L'aerobiologia

Aerobiologia è un termine che fu utilizzato per la prima volta nel 1930 per definire lo studio delle particelle biologiche presenti in aria, sia negli ambienti *indoor* sia in quelli *outdoor*, e comprende lo studio dei granuli pollinici e dei propaguli fungini aerodispersi (Pashley et al., 2012).

Il monitoraggio aerobiologico *outdoor* è condotto su più punti, distribuiti su tutto il territorio, per fornire una visione realistica delle diverse situazioni regionali. Esso consente di rilevare la presenza temporale e quantitativa dei diversi granuli pollinici e dei principali miceti d'interesse (Frenguelli, Bologna - 2013).

Le reti di monitoraggio che si occupano di aerobiologia sul territorio italiano sono:

- Rete ARPA - www.pollnet.it
- Rete AIA (Associazione Italiana Aerobiologia) - www.ilpolline.it
- Rete AAITO (Associazione Allergologi Immunologi Territoriali e Ospedialeri) - www.pollinieallergia.net

La rete internazionale di riferimento è la Rete Europea - www.polleninfo.org

In Europa il numero di catturatori presenti sul territorio è significativo, soprattutto in Francia, Germania, Italia e Spagna (Fig. 1).

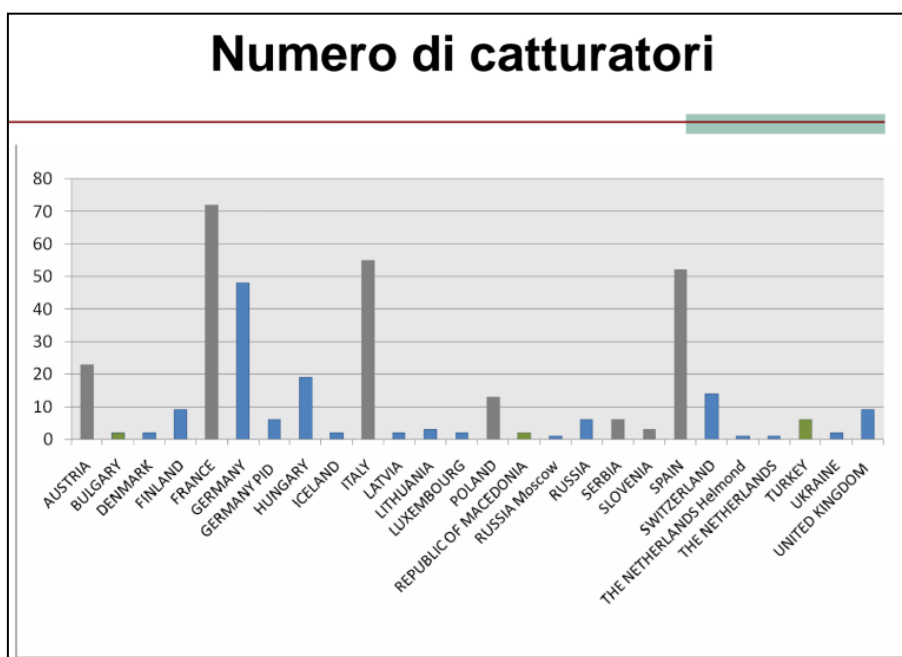


Fig. 1 Numero di catturatori, per l'analisi aerobiologica *outdoor*, presenti sul territorio internazionale. 24 febbraio 2017 – Pordenone. Giornata di studio sui POLLINI: approfondimenti di biologia molecolare, statistica, biodiversità e normativa.

In Italia, la rete POLLnet consta di 54 stazioni dislocate sul territorio in 16 Regioni (Fig.2).

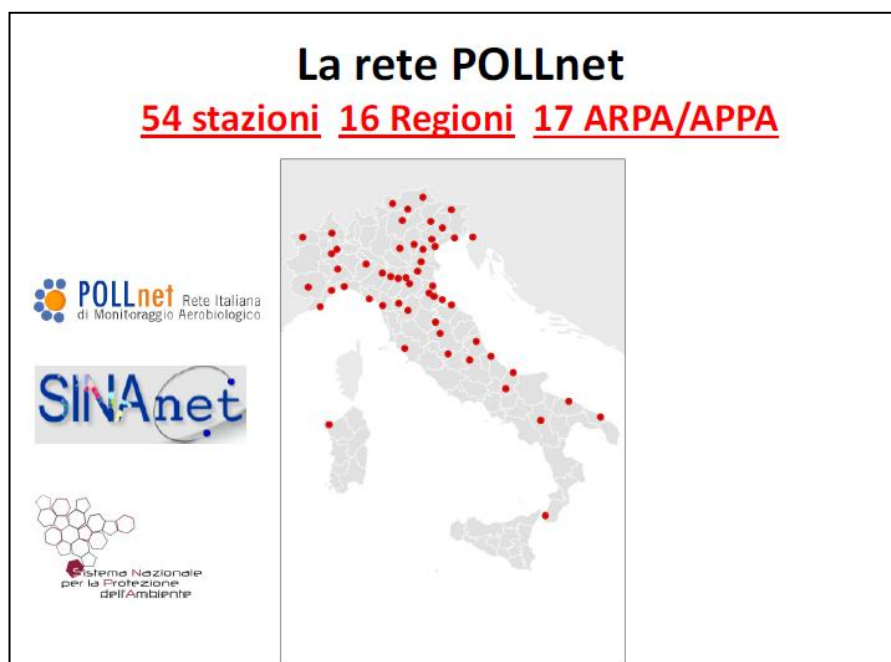


Fig. 2 Le stazioni della rete POLLnet. *Vincenzo De Gironimo – ISPRA*

L'attuale norma applicata al monitoraggio aerobiologico (UNI CEN/TS 16868:2015) prevede il riconoscimento e il conteggio al microscopio ottico dei granuli pollinici e delle spore o dei conidi fungini aerodispersi. Sono inoltre state pubblicate da ISPRA delle Linea Guida, applicate da tutti gli enti afferenti alla rete POLLnet (<http://www.isprambiente.gov.it>).

Una definizione esauriente di agenti biologici, e quindi per estensione anche di quelli aerodispersi, che possono causare patologie di vari tipo, si ritrova nel D.lgs. 81/08. Esso indica come agente biologico “qualsiasi microrganismo, anche se geneticamente modificato, coltura cellulare ed endoparassita umano che potrebbe provocare infezioni, allergie o intossicazioni”. Batteri, virus, funghi ricadono tutti all'interno di questa descrizione e sono elencati nell'allegato XLVI e classificati in tre gruppi (2, 3 e 4), sulla base dell'effetto esercitato su lavoratori sani. Parte dell'esposizione umana ad agenti biologici è dovuta ai microorganismi trasportati dall'aria, che nel loro insieme costituiscono una porzione del bioaerosol (Di Filippo, Riccardi, Pomata, 2016 -INAIL).

1.2I funghi

I funghi sono ubiquitari nell'ambiente e comunemente crescono come saprofiti su materiale organico non vivente o come agenti patogeni invasivi nel tessuto vivente. Si possono distinguere miceti unicellulari (lieviti) e pluricellulari filamentosi (muffe), che si riproducono per via asessuata (con produzione di conidi) o per via sessuata (con produzione di spore). I conidi fungini hanno struttura unicellulare o pluricellulare, si sviluppano durante diverse fasi del complesso ciclo di vita dei miceti a scopo riproduttivo e di distribuzione e, essendo resistenti a condizioni ambientali avverse, garantiscono la sopravvivenza del fungo.

Storicamente, gli isolati fungini sono stati identificati in base alle caratteristiche morfologiche della colonia prodotta su terreno di coltura idoneo e all'esame al microscopio delle strutture riproduttive che essi formano.

È risaputo che questi metodi richiedono molto tempo, fino a settimane per un'identificazione, spesso anche imprecisa. E' estremamente difficile distinguere diversi funghi, basandosi solo sulle differenze morfologiche macroscopiche e microscopiche. Ma il punto più critico di questo metodo è che non tutti gli organismi presenti in un campione ambientale sono coltivabili (Meklin et al., 2004). Quanto detto può portare a un'identificazione errata, oltre che a una sottostima del numero di organismi che costituiscono la comunità microbica (Wu et al., 2002). Tutto ciò rende indispensabile sviluppare nuovi metodi di identificazione fungina che siano veloci, altamente sensibili e specifici (Dean et al., 2005).

1.2.1 La riproduzione fungina

Nel Regno dei Funghi la riproduzione è caratterizzata dall'alternanza di fasi di riproduzione sessuale (perfetta o teleomorfica) e riproduzione asessuale (imperfetta o anamorfica).

I propaguli riproduttivi prodotti dai funghi possono perciò essere:

- sessuati (spore teleomorfiche aploidi), derivanti da divisione meiotica;
- asessuati (forme anamorfe aploidi o diploidi) detti conidi, derivanti da divisione mitotica, suddivise ulteriormente in:

- Talloconidi, formati direttamente dal tallo:
 - artroconidi
 - aleurioconidi
 - clamidoconidi (strutture di resistenza)

- Blastoconidi, prodotti da ife specializzate (“conidiofore”):
 - blastoconidi (lieviti)
 - fialoconidi
 - anelloconidi

L'uno e l'altro tipo di riproduzione sono legati essenzialmente alla germinazione delle spore o dei conidi, che sono provvisti dell'informazione genetica propria di ciascuna specie e indispensabile per ricostruire a distanza il tallo fungino originario in tutta la sua complessità. La riproduzione sessuale e il tipo di spora permette la classificazione dei miceti.

La riproduzione asessuale mediante conidiogenesi blastica (Fig. 3) è assai diffusa fra le specie fungine osservabili in laboratorio, comprese numerose ed importanti specie patogene (La Placa, 2001).

I conidi sono caratterizzate da:

- doppia parete di notevole spessore (associata a quote variabili di glucani, mannani, lipidi e proteine);
- citoplasma ricco di sostanze di riserva e povero di acqua.

La componente polisaccaridica rappresenta circa l'80% del peso secco e la componente proteica e lipidica il 10%.

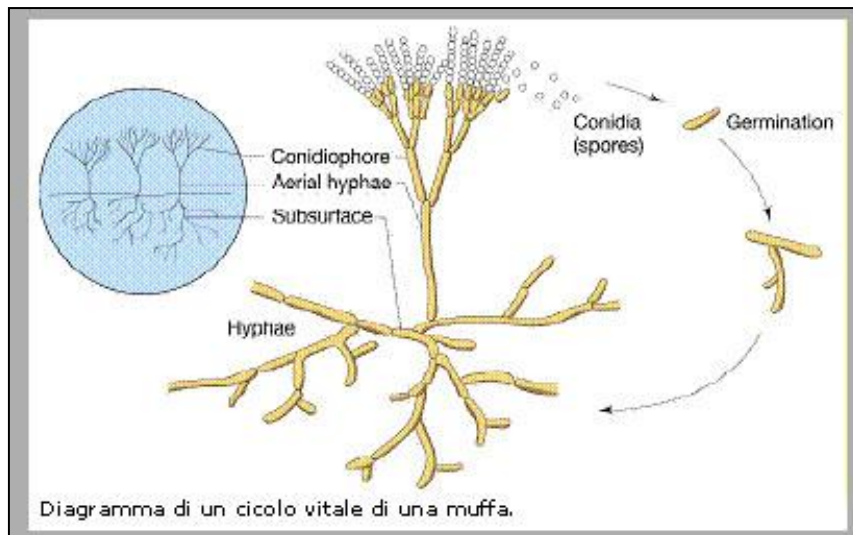


Fig. 3 Diagramma del ciclo vitale di una muffa. (www.biodeterioramento.it)

Le spore fungine possono avere svariate forme, che si mantengono costanti all'interno di una stessa classe sistematica. Questo è un importante criterio per la loro classificazione.

Le loro dimensioni sono variabili, ma in genere sono molto piccole, cosa che le rende facilmente aerotrasportabili (1-100 μm).

1.2.2 I propaguli riproduttivi fungini nel bioaerosol

Gli studi sull'aerobiologia hanno mostrato che la maggior parte dei conidi e delle spore fungine presenti nell'aria *outdoor* appartengono ai phylum Ascomycota e Basidiomycota (Fig. 4) (Knutsen et al., 2012).

Kingdom Chromista	Ascomycota	Phylum Basidiomycota
	(continued)	
Phylum Oomycota	<i>Drechslera</i>	<i>Agaricus</i>
<i>Phytophthora</i>	<i>Epicoccum</i>	<i>Calvatia</i>
<i>Plasmopara</i>	<i>Erysiphe</i>	<i>Cantharellus</i>
	<i>Eurotium</i>	<i>Cyathus</i>
Kingdom Fungi	<i>Fusarium</i>	<i>Ganoderma</i>
Phylum Ascomycota	<i>Gliocladium</i>	<i>Geastrum</i>
<i>Acremonium</i>	<i>Helminthosporium</i>	<i>Lentinus</i>
<i>Alternaria</i>	<i>Monilia</i>	<i>Pleurotus</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>Nigrospora</i>	<i>Polyporus</i>
<i>Aureobasidium</i>	<i>Neurospora</i>	<i>Psilocybe</i>
<i>Botryotrichum</i>	<i>Paecilomyces</i>	<i>Puccinia</i>
<i>Botrytis</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Rhodotorula</i>
<i>Candida</i>	<i>Phoma</i>	<i>Serpula</i>
<i>Cephalosporium</i>	<i>Pyrenochaeta</i>	<i>Sporotrichum</i>
<i>Chaetomium</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Tilletia</i>
<i>Chryso sporium</i>	<i>Scopulariopsis</i>	<i>Urocystis</i>
<i>Cladosporium</i>	<i>Stachybotrys</i>	<i>Ustilago</i>
<i>Claviceps</i>	<i>Stemphylium</i>	<i>Wallemia</i>
<i>Coniosporium</i>	<i>Torula</i>	<i>Xylobolus</i>
<i>Curvularia</i>	<i>Trichoderma</i>	
<i>Cylindrocarpon</i>	<i>Trichophyton</i>	Phylum Zygomycota
<i>Daldinia</i>	<i>Ulocladium</i>	<i>Mucor</i>
<i>Didymella</i>		<i>Rhizopus</i>

Fig. 4 Regno dei funghi. Phylum principali. (Knutsen et al., 2012)

La dispersione dei conidi avviene essenzialmente per distacco, attraverso diversi meccanismi, dal micelio da cui derivano. La loro concentrazione in aria dipende sia da fattori meteorologici, come temperatura, umidità dell'aria e velocità del vento, sia dal tipo e quantità di vegetazione che si ritrova nell'ambiente circostante (Jones et al, 2003).

Molti conidi presenti nell'aria appartengono a funghi patogeni delle piante. Il meccanismo responsabile del rilascio di questi propaguli asexuali non è ben noto; in ogni caso la luce sembra essere un fattore importante. La durata della conidiogenesi e della sporulazione, inoltre, è fortemente determinata dalla temperatura e dall'umidità, spiegando in parte come mai i conidi e le spore fungine rilevati sono soggetti a periodicità stagionale.

La maggior parte dei miceti presenta, infatti, una dipendenza stagionale con concentrazioni atmosferiche più elevate nei mesi più caldi (da aprile a ottobre). Ascospore e basidiospore richiedono, per la loro liberazione, attive precipitazioni piovose, al contrario, nel caso dei

conidi di molti tipi di deuteromiceti, il rilascio è soppresso dalle precipitazioni e dall'umidità (Elbert et al., 2007).

Ad esempio, il rilascio a secco dei conidi di *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* e specie di *Penicillium* avviene principalmente con un clima secco, caldo e ventilato. La velocità del vento richiesta per il distacco varia da fungo a fungo: da un minimo di 1,0 m/s per il distacco dalle specie di *Cladosporium*, a 0,5 m/s per le specie di *Aspergillus* e *Penicillium*. Inoltre, questi conidi possono essere dispersi facilmente e portati per lunghe distanze dal vento (Knutsen et al., 2012).

Riassumendo, in caso di temperature elevate e scarsa piovosità vi è il rilascio di “*dry spores*”, ovvero conidi di miceti la cui concentrazione atmosferica aumenta con l'elevarsi della temperatura ambientale (ad es. *Alternaria*, *Epicoccum*, *Cladosporium*). In condizioni favorevoli di umidità, vi è il rilascio di “*wet spores*”, ovvero conidi o spore di miceti la cui concentrazione atmosferica aumenta con l'elevarsi dell'umidità relativa (diversi gruppi di ascomiceti e basidiomiceti) (Enciclopedia Medica Italiana USES, 1985).

La crescita dei funghi è favorita dalla temperatura di 18-32° C, umidità relativa superiore al 65% e presenza di substrato organico, come piante, detriti di piante e suolo, legno, prodotti del legno, stoffe, alimenti. I miceti più comuni appartengono ai generi *Penicillium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Absidia*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Stachybotris*.

Il fungo può essere un patogeno che causa infezioni, un aeroallergene, o entrambe le cose insieme. Per causare infezioni nell'uomo, il micete deve essere in grado di crescere a temperatura corporea, proprietà questa comune ad un ristretto numero di specie fungine (membri dei generi *Aspergillus* e *Penicillium*). Gli allergeni fungini includono, invece, anche conidi prodotti da patogeni delle piante come *Cladosporium* e *Alternaria*.

In definitiva, mentre le infezioni possono essere causate solo da cellule fungine vitali, la componente fungina aerodispersa non ha bisogno di essere *viable* per suscitare una reazione allergica, quale ad esempio ipersensibilità allergiche respiratorie nei soggetti atopici sensibilizzati, come rinite e/o asma (Denning et al., 2014).

Le particelle in aria possono avere forme e dimensioni diverse, ma avere lo stesso comportamento fisico. Tali particelle convenzionalmente hanno lo stesso diametro

aerodinamico (d_a), cioè il diametro di una sfera di densità unitaria (1 g cm^{-3}) che ha un comportamento aerodinamico identico a quello delle particelle in questione.

Il bioaerosol generalmente presenta diametri aerodinamici variabili da 0,3 a 100 μm ; tuttavia la frazione composta da particelle con diametri da 1,0 a 10 μm , è di primaria importanza per le reazioni che può causare negli organismi viventi.

Infatti, il particolato con $d_a < 10 \mu\text{m}$, definito “frazione toracica”, supera le prime vie respiratorie, continuando a penetrare oltre la laringe. Al contrario le particelle con $d_a < 1 \mu\text{m}$ difficilmente trasportano spore fungine, che sono generalmente nell’intervallo di grandezza 2-10 μm (Di Filippo, Riccardi, Pomata, 2016 -INAIL).

1.2.3 Metodo di cattura conidi/spore outdoor

La cattura delle spore o dei conidi outdoor, come descritto in letteratura, può essere effettuata con diversi metodi:

- Campionatore ciclonico a flusso continuo (Burkard Manufacturing Co.), in base all’orientamento del vento, con portata d’aria di $16,5 \text{ L min}^{-1}$. Le particelle aerodisperse, comprese le spore fungine, sono raccolte direttamente in un tubo da microcentrifuga da 1,5 ml e conservate a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ prima dell’estrazione del DNA (Pashley et al., 2012).
- Campionatore dicotomico ad alto volume (costruito autonomamente basandosi su Solomon et al., 1983) usato per separare e raccogliere particelle di aerosol su una coppia di filtri in fibra di vetro (Pall Corporation, tipo A / A, diametro 102 mm). Il campionatore viene azionato con una pompa rotativa (Becker VT 4.25) con una portata totale di $\sim 300 \text{ L min}^{-1}$, corrispondente a un diametro nominale di taglio di $\sim 3 \mu\text{m}$ (Müller-Germann et al., 2015).

- Campionatore volumetrico (Hirst, 1952).
L'aria da analizzare viene prelevata da una pompa aspirante e diretta sulla superficie di campionamento (nastro cosparso di silicone), sulla quale le particelle presenti si depositano per impatto (UNI CEN/TS 16868:2015).

Quest'ultimo metodo di campionamento è stato scelto per lo studio, poiché previsto dalle linee guida POLLnet per l'aerobiologia e dalla norma di riferimento UNI CEN/TS 16868:2015.

Il campionatore volumetrico (Hirst, 1952) (Fig. 5) cattura, attraverso l'aspirazione di un volume d'aria costante, le particelle atmosferiche per impatto su una superficie, corrispondente alla capacità respiratoria pari a 10 l/min, ovvero 14,4 m³ in 24 ore (UNI CEN/TS 16868:2015).

Lo strumento deve essere posizionato:

- saldamente ancorato al terreno,
- con la fenditura posta ad almeno 1 m di altezza dal livello del pavimento,
- lontano da ostacoli che alterino la circolazione atmosferica,
- sulla sommità di edifici (15/20 m dal suolo).



Fig. 5 Campionatore volumetrico (Hirst) posizionato sul tetto dell'ARPA VdA.

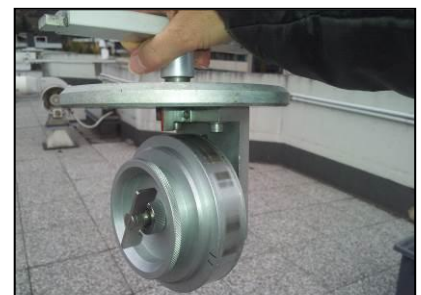


Fig. 6 Tamburo campionatore

E' preferibile privilegiare zone lontane da parchi pubblici e da fonti di emissioni industriali. In queste condizioni il campionatore rappresenta la distribuzione delle particelle biologiche in un'area di circa 20 Km di raggio (Cecchi, 2013).

Il Tamburo campionatore (Fig. 6) è un componente sul quale viene posizionato il nastro di campionamento, opportunamente siliconato, per permettere l'adesione delle particelle aspirate. Questo viene inserito sulla testa del campionatore, dotata di un orologio. Il

dispositivo di avanzamento della superficie fa ruotare il tamburo ad una velocità costante di 2 mm/h. La Fenditura di aspirazione (Fig. 7) permette l'ingresso dell'aria che va ad impattare sul nastro.

Il nastro di campionamento viene cambiato una volta alla settimana.

Il nastro utilizzato per il campionamento viene opportunamente tagliato in 7 pezzi, corrispondenti alle giornate della settimana monitorate (48mm = 24 ore) (Fig. 8).

Ogni porzione di nastro viene messo su un vetrino portaoggetti e identificato con data e luogo del prelievo.



Fig. 7 Fenditura di aspirazione

Sul nastro vengono messe 4-5 gocce di un colorante in gel (fucsina basica).

La fucsina viene assorbita dalle componenti della parete del polline, che assumerà una colorazione rosa. I conidi/spore fungini, invece, non assorbono la fucsina, pertanto non si colorano e mantengono la loro colorazione naturale: alcuni più brunastri, altri incolore.

Si procede, quindi, al conteggio dei granuli pollinici e dei conidi/spore fungini e, contemporaneamente, al loro riconoscimento tassonomico (Fig. 9).

I dati dei conteggi sono inseriti nel software di gestione dati POLLnet come valori del conteggio di particelle per ogni tipologia. La conversione in concentrazione di particelle per m³ è effettuata, registrata ed archiviata nel software stesso. Attraverso questo software viene elaborato il bollettino pollinico, pubblicato ogni settimana sul sito POLLnet e sul sito di ARPA VdA (Fig. 10).



Fig. 8 Taglio del nastro



Fig. 9 Conidi di *Cladosporium* spp. e pollini di Castagno al microscopio ottico (400X).

Il numero di pollini e spore contati è moltiplicato per un fattore di conversione (CF), che tiene conto del volume di aria campionato, della superficie di campionamento e del diametro del campo visivo del microscopio utilizzato, secondo la seguente formula:

$$CF = \frac{S(\text{totale campionata})}{S(\text{analizzata})} \times \frac{1}{V} = \frac{L \times l}{L \times d \times N} \times \frac{1}{V} = \frac{1}{d \times N} \times \frac{1}{V}$$

$$\text{Concentrazione di conidi/spore fungine o pollini} = n \times CF$$

Dove:

S = Superficie (mm²)

V = Volume di aria aspirata ($V = D \times t$) (m³)

D = flusso dell'aria campionata (l/min o m³/unità di tempo)

t = Durata del periodo di campionamento

L = lunghezza della linea di lettura (mm)

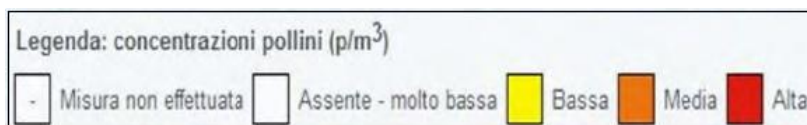
l = larghezza della linea di lettura (mm)

d = diametro del campo del microscopio (mm)

N = numero di strisce lette

n = numero di pollini o conidi/spore fungine identificati sulla superficie analizzata

Le concentrazioni sono visualizzate in quattro classi:



Si sottolinea che le quattro classi di concentrazione non corrispondono ai livelli di "rischio allergia". La valutazione fa riferimento alla quantità di polline o di conidi/spore delle varie specie/famiglie nell'aria e non fornisce indicazioni sulle concentrazioni polliniche "soglia" scatenanti una reazione allergica.

Pollini							
Valori giornalieri	1/05/2017	2/05/2017	3/05/2017	4/05/2017	5/05/2017	6/05/2017	7/05/2017
BETULACEAE (Betula)	0.5	4.4	1	0	4.4	2.4	1.5
CUPRESSACEAE/TAXACEAE	0	0.5	0.5	0	2.4	2.4	34
FAGACEAE (Quercus)	6.8	5.3	7.3	5.3	12.2	9.7	10.2
GRAMINEAE	2.4	1	3.4	3.4	11.2	13.6	5.3
OLEACEAE (Fraxinus)	1.9	1.5	1	0.5	1	1.5	0.5
PINACEAE	17.5	19.4	12.6	13.1	38.4	20.4	80.7
PLANTAGINACEAE	1	0.5	1	0	1	0	1
POLYGONACEAE	0.5	1.5	1.5	1.5	5.8	0.5	1.9
Spore							
Valori giornalieri	1/05/2017	2/05/2017	3/05/2017	4/05/2017	5/05/2017	6/05/2017	7/05/2017
ALTERNARIA	4.4	1.9	10.7	17.5	20.9	7.8	13.1

Fig. 10 Esempio di bollettino aerobiologico pubblicato sul sito di ARPA VdA.

1.2.4 *Alternaria*

I conidi del genere *Alternaria* sono diventati uno dei principali costituenti dell'aria in tutti i Paesi del globo. Essi provocano infezioni fitopatogene, ma, se inalati dall'uomo, possono anche essere causa di gravi allergie.

Alternaria è un genere di funghi demaziacei che appartiene al Phylum *Ascomycota* (www.mycobank.org). Essa causa un tipo di muffa nera, grigio, verdastra, polverosa (Fig. 11), che appartiene alla Classe *Dothideomycetes*. E' un micete ubiquitario, che cresce in tutte le zone climatiche, ma la maggior produzione di conidi è stata osservata ad una temperatura compresa tra 22°C e 28°C (Kasprzyk et al., 2015).



Fig. 11 Colonie di *Alternaria* spp. su terreno Sabouraud dextrose agar, a 10 giorni di crescita, a Temp. = 22°C

Basandosi solo sulla morfologia, Simmons (2008) divide il genere *Alternaria* in 276 specie che furono descritte in dettaglio dopo un'identificazione microscopica. Più recentemente, Woudenberg et al. (2013) utilizzarono dati ottenuti dal sequenziamento di diversi frammenti del DNA nucleare e altri fattori, per ridefinire l'identificazione delle specie. Su queste basi *Alternaria complex species* contiene 24 cluster interni e i generi *Allewia*, *Brachycladium*, *Chlastospora*, *Chmelia*, *Crivellia*, *Embellisia*, *Lewia*, *Nimbya*, *Sinomyces*, *Teretispora*,

Ulocladium, *Undifilum* e *Ybotromyces* sono stati proposti come sinonimi di *Alternaria* (Kasprzyk et al., 2015).

La maggior parte delle specie di *Alternaria* è patogena obbligata o facoltativa, ma ci possono essere anche delle specie saprofiti o endofite, isolate dall'acqua o da substrati come suolo, piante, materiale organico, tessile, plastico o legno. Dal punto di vista fitopatologico questi miceti causano gravi danni economici all'agricoltura: infettano patate, colza e cereali (semi e tuberi). La sporulazione di *Alternaria* porta al deterioramento dei prodotti dell'agricoltura, ma anche del cibo, durante il trasporto e la conservazione (Humpherson-Jones, 1989; Escuredo et al., 2011). Nei confronti dell'ospite il patogeno generalmente presenta comportamento necrotrofico. I sintomi che causa sono macchie fogliari dovute alle lesioni necrotiche concentriche (Fig. 12); lesioni e striature necrotiche su fusto; macchie necrotiche e lesioni su infruttescenze (Fig.13); mancata germinazione, avvizzimento delle plantule (Franco, Trieste, 2016).



Fig. 12 Macchie fogliari dovute alle lesioni necrotiche concentriche da infezione da *Alternaria* spp. (www.bayergarden.it)



Fig. 13 Macchie necrotiche e lesioni su pomodori da infezione da *Alternaria* spp. (www.arpae.it)

L'esposizione ad *Alternaria* è anche una delle principali cause di reazioni allergiche quali asma, congiuntivite, rinite, rinosinusite, oltre a polmonite da ipersensibilità, micosi broncopolmonare, infezioni cutanee e dermatiti. Inoltre, l'*Alternaria* attiva il sistema immunitario innato e aumenta l'infiammazione polmonare indotta anche da altri allergeni, come le *Poaceae* (Kim, 2014). Sono stati identificati almeno 10 tipi di allergeni di *Alternaria*,

ma il più dannoso e frequentemente riportato in letteratura è *Alt a1*, una glicoproteina di 31 kDa.

E' stato stimato che una percentuale compresa tra il 12% e il 42% delle persone atopiche sono sensibili ai funghi (Knutsen et al., 2012) e circa il 70% dei pazienti sono sensibili alla presenza di conidi di *Alternaria* nell'aria (D'Amato e Spieksma, 1995; Sanchez and Bush, 2001). La frequenza della positività ai prick-test varia da Stato a Stato: Knutsen et al. (2012) riportano il 12.9% dei cittadini statunitensi tra i 6 e i 59 anni. Circa il 3% della popolazione Portoghese soffre di allergia ad *Alternaria* e *Cladosporium*, mentre in Spagna i dati riportano circa il 20% della popolazione (Licorish et al., 1985; D'amato et al., 1997).

In ogni caso, l'intensità della reazione allergica nei pazienti dipende dalla concentrazione dei conidi di *Alternaria* presenti in aria. Nei pazienti sensibilizzati, i sintomi di una grave allergia per via inalatoria sono solitamente registrati in presenza di circa 300 conidi di *Alternaria* per metro cubo d'aria, sia in Centro Europa che altrove (Black et al., 2000; Downs et al., 2001; Rapiejko et al., 2004).

Diverse condizioni geo-meteorologiche condizionano la concentrazione di conidi presenti in aria (Oliveira et al., 2009; Maya-Manzano et al., 2012; Sabariego et al., 2012). Nel centro e ovest Europa, la concentrazione di conidi di *Alternaria* è maggiore rispetto al nord Europa. Aumenta gradualmente da metà aprile e raggiunge un'alta o medio alta concentrazione fino a metà settembre, ma il periodo con la maggior concentrazione è solitamente tra luglio e agosto (Nikkels et al., 1996; Kasprzyk I. et al., 2004; Mikaliūnaitė et al., 2009).

Il clima è un altro fattore che influenza fortemente la distribuzione dei conidi. Vi è una correlazione positiva tra la deposizione dei conidi e il bel tempo e l'alta temperatura ed una correlazione negativa con l'umidità e la pioggia (Rapiejko et al., 2004; Oliveira et al., 2009; Sabariego et al., 2012). Pertanto, basandosi sulle condizioni climatiche richieste, il genere *Alternaria* è stato classificato tra le specie fungine che producono "dry spores".

Ciò descritto, è possibile capire perché è importante il suo monitoraggio. La morfologia dei conidi è caratteristica (Fig. 14): forma fusoidale, obclavata, clavata, piriforme o ellissoidale, muriformi: settati trasversalmente e longitudinalmente, con un rostro apicale più o meno sviluppato. Le dimensioni sono circa 20–63 μm x 9–18 μm (*A. alternata*). Tuttavia presenta un elevato polimorfismo tra le forme più mature e quelle più giovani (Fig. 15), le quali sono facilmente confondibili con altre spore/conidi fungini, particolarità che porta probabilmente a sottostimare la concentrazione effettiva di conidi in aria.



Fig. 14 Conidi di *Alternaria* spp. (400X)

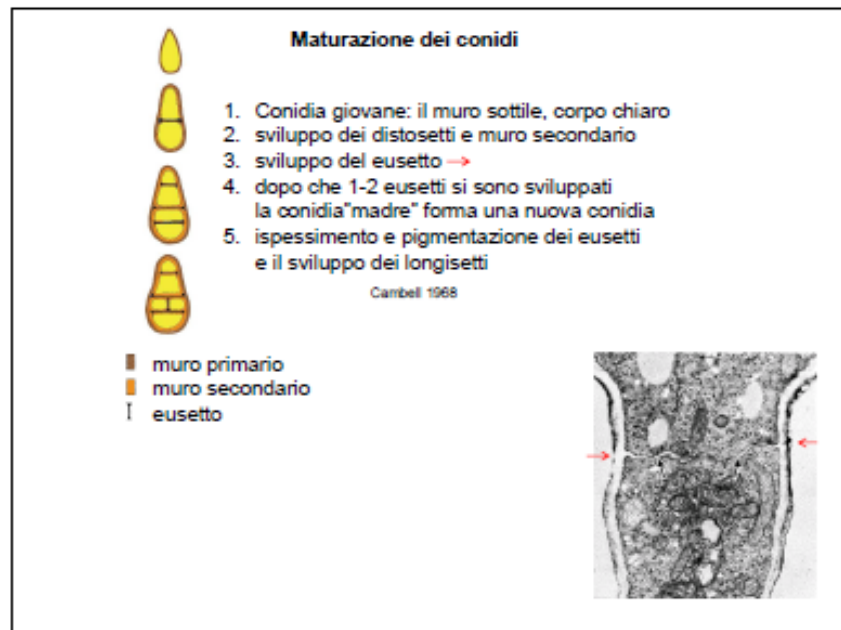


Fig. 15 Maturazione dei conidi di *Alternaria*. (Magyar, Trieste, 2016)

Le più importanti specie possono essere distinte in (Magyar, Trieste, 2016):

- Dal punto di vista allergologico:

- *A. alternata*

-Dal punto di vista fitopatologico (in Italia):

- *A. porri*
- *A. solani*
- *A. dauci*
- *A. zinniae*
- *A. brassicae*
- *A. cucumerina*
- *A. macrospora*
- *A. dianthi*
- *A. dianthicola*
- *A. circinans*
- *A. tenuis*
- *A. citri*

1.2.5 *Cladosporium*

Cladosporium è uno dei più comuni funghi ritrovati negli ambienti *indoor* e *outdoor*. L'abbondanza dei suoi conidi è dovuta principalmente alla loro abilità di crescita su una vasta gamma di substrati (ad esempio piante, legno, articoli in pelle e alimenti). Il picco massimo di 10^5 spore/m³ è stato osservato nell'ambiente agricolo outdoor.

Il genere *Cladosporium* consiste di circa 60 specie, di cui la maggior parte sono fitopatogene, mentre altre sono allergeniche per l'uomo. Un'esposizione prolungata ad alte concentrazioni di *Cladosporium* può indebolire il sistema immunitario, permettendo la concomitante infezione dell'ospite da parte di batteri opportunisti e virus. L'asma è il sintomo più frequente (Zeng et al., 2005).

Questo micete è comunemente conosciuto come muffa nera. Produce un pigmento nero che lo protegge dalla luce ultravioletta. Questa caratteristica, così come la sua crescita veloce, è probabilmente responsabile della sua presenza e abbondanza nell'ambiente. Le colonie si presentano vellutate, friabili, da verde-oliva a marroni-olivastre (Fig. 16). Il lato opposto è verde scuro. Ha una temperatura ottimale di crescita compresa tra 18 e 28°C. I conidi si presentano in lunghe catene ramificate, che nascono dal conidioforo. Il conidio più giovane è in cima alla catena (www.biodeterioramento.it).



Fig. 16 Colonie di *Cladosporium* spp. su terreno Sabouraud dextrose agar, a 10 giorni di crescita, a Temp. = 22°C

Cladosporium è facilmente riconoscibile su vetrino, ma le piccole dimensioni e la concentrazione elevata (10^5 spore/m³ in *outdoor*) in cui si può trovare durante il suo periodo di rilascio, ne rende difficoltoso il conteggio e la quantificazione precisa (Zeng et al., 2005).

La morfologia dei conidi (Fig. 17) presenta conidi, spesso ramificati in catene, mono-bi o tri-cellulari, ellissoidali o cilindrici, a parete viscosa, leggermente echinati e brunastri. Le dimensioni variano da 20-40 µm x 8-10 µm, ma possono essere anche molto più piccoli.

I conidi delle specie di *Cladosporium* sono rilasciati sia durante le condizioni di clima umido che di

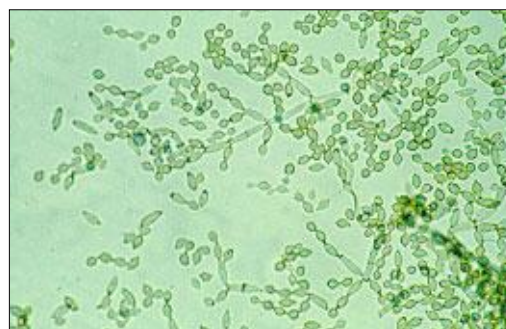


Fig. 17 Conidi di *Cladosporium* spp. (200X)

clima secco e sono dispersi dalla pioggia, di conseguenza la loro presenza *outdoor* tende ad aumentare con un clima caldo e durante i temporali. La loro presenza è abbondante in tutto il mondo, rappresentando la specie dominante in ogni area, specialmente nei climi temperati. *C. herbarum* è molto frequentemente negli ambienti *outdoor* e *indoor* ed è la maggiore fonte di allergeni inalanti (Knutsen et al., 2012).

Alcune specie sono patogene e portano a volte a gravi malattie. In particolare, determinano infezioni quando entrano a contatto con piccoli tagli o abrasioni sulla pelle. Un'esposizione prolungata può indebolire il sistema immunitario, permettendo a batteri opportunisti e virus di determinare l'infezione. A questo micete sono stati attribuiti composti organici volatili, prodotti in alcuni stadi del ciclo vitale. Sono abbondanti in estate, mentre diminuiscono in inverno. E' molto comune su piante in decomposizione, piante legnose, cibo, suolo, dipinti, tessili, cuoio.

La capacità di sporulare facilmente, rende questo fungo uno dei più importanti allergeni per via aerea. Insieme ad *Alternaria*, è una delle più comuni cause di asma.

Poche specie causano infezioni micotiche dovute alla presenza di ife settate. Inoltre, può causare infezioni agli occhi e alla pelle, come la cromoblastomicosi, infezione cronica localizzata della pelle e tessuto sottocutaneo. Le lesioni da cromoblastomicosi sono ulcerate e coperte di croste. Può anche determinare infezioni della cornea e micetomi, che coinvolgono il tessuto cutaneo e sottocutaneo.

Cladosporium produce le tossine cladosporina ed emodina, entrambe molto poco tossiche.

Le specie che si ritrovano in ambienti chiusi possono essere diverse rispetto a quelle presenti all'aperto.

La classificazione tassonomica di *Cladosporium* non è ancora stata completata in maniera esauriente, tuttavia la maggior parte degli isolati da aria e habitat umani sono riferiti a tre specie, distinguibili per le seguenti caratteristiche chiave:

1. conidi spesso quasi sferici - *C. sphaerospermum*
2. conidi lisci - *C. cladosporioides*
3. conidi verrucosi - *C. herbarum*

1.2.6 Allergie ai funghi

I funghi allergenici più studiati sono produttori di conidi anamorfi (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium* e specie di *Penicillium*). I conidi prodotti asessualmente rappresentano dal 30% al 60% dei conidi/spore presenti *outdoor*, la parte restante comprende le Ascospore e Basidiospore sessuali (Katotomichelakis et al., 2016).

L'esposizione ai funghi presenti in aria può avvenire sia in ambienti *outdoor* che *indoor*. Le spore/conidi sono solitamente presenti outdoor nell'arco di tutto l'anno, frequentemente superando il numero dei pollini, in base alla presenza dei fattori ambientali come acqua, nutrienti, temperatura e vento.

L'inalazione dei conidi delle specie di *Penicillium* in quantità comparabili a quelle di un'esposizione naturale, può indurre, come risposta immediata o ritardata, asma nelle persone sensibili (Knutsen et al., 2012). Tuttavia, le specie appartenenti al genere *Penicillium* si ritrovano prevalentemente negli ambienti *indoor*.

La maggior parte dei funghi possiede allergeni multipli e variegati, che possono essere prodotti metabolici secreti all'esterno dell'organismo, oppure componenti citoplasmatici e strutturali, rilasciati durante la lisi della cellula fungina.

Nelle specie di *Cladosporium* sono stati caratterizzati 10 allergeni di cui 8 da *C. herbarum* (*Cla h 1* – *Cla h 8*). Solo uno dei 10 è un allergene presente nei conidi (*Cla h HCh-1*), i restanti appartengono alle ife. Le specie di *Alternaria* possiedono sia antigeni metabolici, che strutturali, capaci di causare allergie. Il database IUIS (International Union of Immunological Societies) riconosce 9 allergeni delle specie di *Alternaria*, tra i quali *Alt a 1* è il più significativo.

L'allergia ai funghi è legata alle spore/conidi dispersi in aria che, dopo essere stati inalati, vengono a contatto con le strutture del sistema immunitario e ne inducono la risposta che, nella maggior parte dei soggetti, è un meccanismo di difesa asintomatica.

In soggetti predisposti, al contrario, si verifica la sensibilizzazione allergica e l'inalazione delle spore/conidi può provocare disturbi anche gravi. I sintomi più importanti sono quelli della rinocongiuntivite allergica e dell'asma bronchiale (Fig. 18) (Marcer, 2012).

Rinocongiuntivite allergica	Asma bronchiale
Starnuti	Mancanza di respiro improvviso, fame d'aria
Naso che cola	Tosse secca e stizzosa, persistente
Naso chiuso	Sibili al torace durante la respirazione
Prurito al naso, gola, palato	
Congiuntivite (lacrimazione, occhi rossi, prurito agli occhi)	

Fig. 18 Sintomi delle principali allergie da inalazione di spore/conidi.
(Marcer, 2012).

Sia la rinocongiuntivite che l'asma sono legate ad un'allergia mediata da una particolare classe di anticorpi: le Immunoglobuline E (IgE), che possono essere ricercate e dosate nel siero del paziente per dimostrare la sensibilizzazione allergica.

In casi fortunatamente non frequenti, si verificano patologie legate ad una vera e propria colonizzazione da parte dei funghi, che si moltiplicano in determinati organi, ad esempio:

- **Sinusite allergica da funghi:** il fungo, quasi sempre del genere *Aspergillus*, si insedia e prolifera all'interno delle cavità dei seni paranasali. Opportuni accertamenti radiologici e microbiologici consentono la diagnosi. Spesso è necessario, per l'eradicazione, ricorrere ad una terapia chirurgica.
- **Aspergillosi Broncopolmonare allergica:** si verifica in soggetti affetti da asma bronchiale o fibrosi polmonare cistica, in seguito a sensibilizzazione a questi funghi, che possono essere dimostrati nel lume bronchiale dei soggetti malati.
- **Infezioni:** alcuni funghi (*Candida*, *Aspergillus*, *Criptococcus*, ecc.), possono essere causa di infezioni cutanee o mucose e, soprattutto in soggetti con compromissione delle difese immunitarie (diabete, neoplasie, terapie con farmaci immunosoppressori), anche di organi interni.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) ha definito l'esposizione ai funghi aerodispersi come un importante rischio per la salute pubblica. *Alternaria* in particolare è considerata come un fattore di rischio che può innescare l'asma sia nei bambini che negli adulti (Katotomichelakis et al., 2016).

1.2.6.1 Diagnosi

Per la rinocongiuntivite e l'asma bronchiale la diagnosi di malattia si basa sulla presenza della sintomatologia caratteristica (Fig. 18) e sulla valutazione dello specialista otorinolaringoiatra o pneumologo. Il ruolo delle spore fungine può essere dimostrato dalla positività dei test cutanei a lettura immediata (prick test) effettuati con estratti contenenti gli antigeni fungini e dalla ricerca nel siero di anticorpi IgE specifici verso gli stessi antigeni (Marcer, 2012).

1.2.6.2 Riniti Allergiche

L'incidenza delle riniti allergiche (AR) sta aumentando nella maggior parte dei paesi. AR colpiscono approssimativamente 500 milioni di persone ed è un problema di salute globale, che influenza la qualità di vita delle persone in tutte le fasce d'età.

AR può dipendere da un'ampia varietà di allergeni inalabili, come gli acari della polvere, i pollini e i funghi. Riguardo a questi ultimi, la sensibilizzazione più frequente è dovuta ad *Alternaria* e *Cladosporium*. Nei pazienti monosensibilizzati ai funghi, i sintomi di AR sono principalmente blocco e prurito nasale, che sono differenti dai sintomi predominanti nei pazienti con AR dovuta ad altri allergeni. Questi sintomi spesso assomigliano a quelli di riniti non allergiche, perciò le diagnosi sui pazienti non sono sempre corrette, producendo problemi con la terapia. Inoltre i pazienti che sono monosensibilizzati ai funghi soffrono molto più frequentemente di sinusiti croniche e asma bronchiale. Tuttavia, nei pazienti con riniti croniche con polipi, non vi è correlazione tra patologia e allergia (inclusa quella ai funghi), ma un fungo è presente nella cavità nasale.

In conclusione i pazienti con allergia ai funghi hanno un tipo di AR clinicamente più leggera; tuttavia essi hanno una maggiore predisposizione all'asma bronchiale (Kołodziejczyk and Bozek, 2016).

Le Riniti allergiche, quindi, rappresentano un prevalente, quanto sottostimato, disturbo infiammatorio della mucosa nasale in risposta agli allergeni ambientali (piante, pollini, funghi). L'intensità dei sintomi dipende dalla densità degli aeroallergeni in circolazione e dalla durata dell'esposizione. Gli studi hanno mostrato significativi cambi nella produzione, dispersione e nel contenuto allergenico di pollini e spore fungine negli ultimi decenni. Questo viene attribuito ai cambiamenti climatici che agiscono sulla fisiologia e sulla dislocazione degli organismi come piante e funghi (Katotomichelakis et al., 2016).

1.2.6.3 Il ruolo dei Cambiamenti Climatici

C'è un'inequivocabile evidenza che il clima sta cambiando. La temperatura media globale ha avuto un innalzamento di più di 0,7° C negli ultimi 100 anni. In aggiunta al surriscaldamento globale, alcune regioni, incluso il nord Europa, stanno vivendo un aumento delle piogge, mentre altre, inclusi i paesi mediterranei, sono sempre più soggette a periodi di siccità. Questi cambiamenti sono il risultato di una crescita di CO₂ nell'atmosfera e dell'effetto serra nei quali le attività antropogeniche giocano un ruolo chiave.

Tutti i fattori climatici vanno ad impattare sulla fisiologia e la distribuzione degli organismi viventi, come piante e funghi. In questo contesto, possiamo dire che i cambiamenti climatici agiscono sulla produzione di spore e funghi così come su altri eventi fenologici.

Nello stesso tempo, questi cambiamenti climatici stanno modificando i processi aerobiologici (emissione, dispersione e/o trasporto e deposizione) degli aeroallergeni (Cecchi et al.,2010).

L'effetto del cambiamento climatico sia sulle patologie allergiche in generale che sulle patologie respiratorie allergiche e non allergiche, sono recentemente stati rimessi in discussione. Tenendo in considerazione i principali fattori ambientali, che influenzano le patologie respiratorie e il loro possibile cambiamento in tale scenario, non ci si possono che aspettare effetti negativi. L'impatto dei pollini e dei propaguli fungini potrebbe essere maggiore in particolare nei confronti dei bambini, che sono i soggetti più esposti (Cecchi et al.,2010).

Gli effetti dell'innalzamento della concentrazione di CO₂ sulla produzione delle spore/conidi e la loro allergenicità, non è stato ancora spiegato con chiarezza. C'è una minima evidenza dell'incremento nella produzione di muffe, principalmente derivato sull'osservazione di dati a lungo termine.

Uno studio su Derby, UK, mostra un aumento nel conteggio dei conidi di *Alternaria* specialmente dopo il 1992. La variazione anomala delle stagioni, dovuta ai cambiamenti climatici, influenza la crescita di pollini e miceti. Questi cambiamenti meteorologici possono favorire un incremento delle spore/conidi conteggiate. Il raddoppiamento delle spore/conidi nell'aria ha provocato l'esacerbazione dell'asma, mentre un cambiamento nelle precipitazioni, con piogge più pesanti e diffuse, provoca un aumento della produzione di funghi.

Ciò nonostante, vi è una limitata evidenza clinica a supporto di questo fenomeno, sebbene la doppia esposizione all'ozono e alle spore fungine *outdoor* sia stata associata in modo significativo all'aggravarsi dei sintomi dell'asma (Cecchi et al.,2010).

1.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Come già riportato, i metodi tradizionali d'identificazione dei funghi e delle spore/conidi fungini aerodispersi sono basati sulla coltura o l'identificazione morfologica al microscopio. I metodi coltura-dipendenti sottostimano inevitabilmente la diversità e creano un grossolano errore, sovrastimando la presenza dei funghi che crescono sui generici terreni di coltura. Tra i funghi conosciuti solo il 17% possono crescere in coltura e fra questi molti producono solo micelio sterile (Tonge et al., 2014).

Il riconoscimento al microscopio non è soggetto a questo *bias*, tuttavia molte spore/conidi non possono essere distinti gli uni dagli altri in base alla loro morfologia.

I metodi tradizionali di determinazione, basati sulla microscopia e/o su tecniche colturali, presentano entrambi delle limitazioni.

Il riconoscimento microscopico richiede una formazione tecnica specifica molto onerosa, inoltre risulta piuttosto soggettivo e porta a frequenti identificazioni errate, in particolare tra le spore/conidi di piccole dimensioni, prodotti dalla maggior parte dei funghi.

I metodi colturali creano un errore sistematico d'identificazione (*bias*) spostando il dato a favore delle specie fungine a rapida crescita e presenti ad alta concentrazione. Inoltre, non c'è un terreno colturale ideale per la coltivazione di tutti i funghi. I conidi/spore non coltivabili e non vitali non possono essere rilevati, nonostante ancora mantengano le loro proprietà allergizzanti e, quindi, siano un potenziale problema di salute pubblica. Pertanto, è necessario mettere a punto tecniche migliori per monitorare l'esposizione ambientale ai funghi e ai conidi/spore fungini e sviluppare misure di prevenzione per la salute pubblica (Keswani et al., 2005).

Negli ultimi anni, per ovviare a questi problemi, sono state sviluppate tecniche alternative, basate su metodi molecolari o di riconoscimento immuno-enzimatico.

In particolare, i metodi basati sulla PCR, possono rilevare e quantificare il materiale biologico presente nei campioni di aria.

Recentemente, sono stati messi a punto numerosi metodi per rilevare i conidi/spore fungini totali e per la loro identificazione specifica. La maggior parte dei generi rilevati tramite l'analisi del DNA non è routinariamente identificata tramite la tecnica microscopica (> 75%) (Pashley et al., 2012).

La *Polymerase Chain Reaction* (PCR) è una delle tecnologie più potenti in biologia molecolare. Utilizzando la PCR, specifiche sequenze di DNA possono essere copiate e amplificate da migliaia a milioni di volte.

Nella PCR tradizionale (end-point) la rilevazione e la quantificazione delle sequenze amplificate sono effettuate alla fine dell'ultimo ciclo di amplificazione e richiedono un'analisi post-PCR (es. elettroforesi ed analisi d'immagine).

Nella PCR real-time la quantità di prodotto di amplificazione è misurato a ciascun ciclo. Ciò consente di monitorare la reazione durante la sua fase esponenziale, permettendo di determinare la quantità iniziale di DNA target con grande precisione. I vantaggi della PCR real-time includono, inoltre, un aumento del *range* dinamico, della sensibilità di rilevazione e dell'accuratezza.

La fluorescenza si genera, durante la PCR, per effetto di diverse possibili reazioni chimiche.

Le chimiche principali sono basate:

- sul legame di coloranti fluorescenti, che si intercalano in modo aspecifico tra le basi di DNA negli amplificati della reazione di PCR, come il SYBR Green;
- sull'ibridazione del DNA con sonde specifiche che possono essere:
 - TaqMan (sonde di ibridazione con idrolisi),
 - Fret (sonde di ibridazione senza idrolisi),
 - Molecular Beacons (sonde di ibridazione senza idrolisi),
 - Scorpions (sonde incorporate nei primers).

Tutte le chimiche impiegate in PCR Real-time fanno uso di fluorofori che emettono fluorescenza, se eccitati da una luce a determinate lunghezze d'onda (λ).

In particolare, si descrive di seguito la chimica del SYBR Green, in quanto è quella utilizzata nel lavoro di ricerca presentato.

Il SYBR Green I è un colorante intercalante che emette fluorescenza 200 volte più intensa se legato ad un DNA a doppia elica. E' il sistema più comune di rilevazione del DNA. L'intensità del segnale fluorescente dipende dalla quantità di *dsDNA* presente: il segnale emesso è quindi proporzionale alla concentrazione di DNA.

L'intercalante emette una bassa fluorescenza quando non legato al *dsDNA*: durante l'estensione SYBR Green I si lega al *dsDNA* e quindi il segnale aumenta. Nel corso della denaturazione l'intercalante torna in soluzione e quindi il segnale diminuisce.

La SYBR Green I assorbe luce blu ad una lunghezza d'onda (λ) di 488 nm ed emette una luce verde ad una lunghezza d'onda (λ) di 322 nm (Fig. 19).

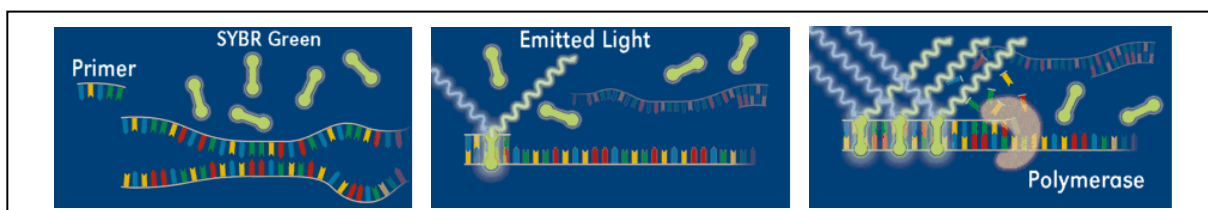


Fig. 19 Rappresentazione della dinamica della SYBR Green I. (<http://dyes.gene-quantification.info/>)

Vantaggi della metodica:

- ✓ Metodica semplice,
- ✓ Possono essere utilizzati gli stessi primers utilizzati in PCR end-point,
- ✓ Non molto costosa.

Svantaggi della metodica:

- ✗ Bassa specificità, data solo dai primer,
- ✗ La molecola fluorescente si lega aspecificamente a tutto il DNA a doppia elica (es. dimeri di primers e ampliconi aspecifici).

E' perciò necessario, per evitare la formazione di prodotti aspecifici, eseguire un buon disegno dei primers, ricercare reagenti di buona qualità e ottimizzare tutte le condizioni della reazione (concentrazione dei reattivi, protocollo termico, ecc.).

Utilizzando la SYBR GREEN è però possibile verificare la specificità della reazione di amplificazione tramite l'analisi della curva di dissociazione (*melting-curve*, vedi paragrafo 1.3.1). Questo permette di tenere sotto controllo il risultato della PCR real-time.

L'efficienza di reazione è un altro parametro che permette di verificare l'accuratezza dei risultati della PCR real-time.

Idealmente, ciascun *template* viene copiato ad ogni ciclo, nella fase esponenziale della reazione, raddoppiando il numero delle molecole: ciò corrisponde ad un'efficienza di amplificazione del 100%. Ogni deviazione dal 100% significa che è presente un potenziale errore.

Un modo per ottenere una buona efficienza di reazione è quello di amplificare delle molecole target relativamente corte: generalmente tra 60 e 200 pb.

Inoltre, ampliconi corti sono meno soggetti alle variazioni d'integrità del DNA stampo.

Il contenuto in GC dell'amplicone e la sua struttura secondaria possono essere un'altra causa dell'inaccuratezza dei dati. Idealmente, i primers devono essere disegnati per allinearsi e amplificare a contatto con una regione che contiene in media il 50 % di GC.

La specificità del DNA target è un altro importante fattore per l'accuratezza dei dati. Quando si disegnano i primers per una PCR real-time bisogna essere sicuri che il loro sito d'attacco sia unico nel genoma. Questo riduce la possibilità che il primer possa amplificare sequenze simili, situate casualmente in altri punti nel genoma del campione.

Quindi, è importante seguire queste raccomandazioni, se non ci si vuole affidare ad un software informatico, per disegnare i primers da utilizzare in una reazione di PCR real-time (lifetechnologies.com):

- Lunghezza di 18-28 nucleotidi,
- Evitare la ripetizione di nucleotide adiacenti,
- Contenuto di GC di almeno il 50%, al fine di prevenire la mancata corrispondenza con la sequenza target,
- Temperature di melting (T_m) compatibili tra i due primers (al massimo 5°C di differenza),
- Evitare sequenze complementari tra tutti i primers impiegati in una reazione.

Le regioni del DNA, in cui scegliere le sequenze da utilizzare come primers, devono essere conservate e specifiche per il target che si vuole identificare. Nello studio presentato, sono stati scelti i seguenti primers:

- ITS1 e ITS4 (White et al., 1990; Gardes & Bruns, 1993) (d'ora in poi denominati primers ITS) per la verifica della presenza di DNA fungino, in quanto va a rilevare la presenza di DNA comune a tutte le specie fungine,
- ALT4 e ALT5 (Crespo-Sempere et al., 2013) (d'ora in poi denominati primers ALT), specifici per il genere *Alternaria* spp., appartengono anch'essi alla regione ITS,
- CLAD F e CLAD R (Zeng et al., 2005) (d'ora in poi denominati primers CLAD), specifici per il genere *Cladosporium* spp., si trovano nella regione SSU.

I ribosomi degli organismi eucariotici sono formati da due subunità strutturali, 60S e 40S, costituite da frammenti di rRNA e proteine, che prendono il nome dalla misura della loro velocità di sedimentazione.

La subunità 60S presenta i frammenti di rRNA 28S, chiamato anche LSU (*Large Subunit*), 5,8S e 5S e circa 50 proteine. La subunità 40S presenta un unico frammento di RNA 18S, chiamato anche SSU (*Small Subunit*) e circa 33 proteine.

Al momento della traduzione del mRNA queste subunità si uniranno per formare i ribosomi 80S (Lodish et al., 1997).

I geni che codificano per i diversi frammenti di rRNA sono geni ripetuti, costituenti dell'organizzatore nucleolare, NOR (*Nucleolus Organizer Region*). All'interno del cromosoma sono raggruppati in unità strutturali separate da sequenze spaziatrici non codificanti, NTS (*Nontranscribed Spacer*) o IGS (*Intergenic Spacer*).

Ogni unità strutturale è costituita da uno spaziatore trascritto esterno, ETS (*External Transcribed Spacer*), situato all'estremità 3' del gene 18S, e due spaziatori trascritti interni, ITS (*Internal Transcribed Spacer*), situati rispettivamente: l'ITS1 fra il gene 18S e il gene 5.8S, mentre l'ITS2 tra il gene 5.8S e l'estremità 3' del gene 28S. Infine, vi è il gene 5S separato dal gene 28S da una sequenza spaziatrice non codificante (Fig. 20).

I geni 18S, 5.8S e 28S verranno trascritti dalla DNA polimerasi I in un pre-rRNA 45S che, inseguito a maturazione tramite eliminazione delle sequenze spaziatrici ETS ed ITS, formerà i rispettivi frammenti di rRNA. Il gene 5S verrà trascritto dalla DNA polimerasi III nel suo corrispettivo rRNA (Lafontaine et al., 2001) (Fernandez Rodriguez, 2007)

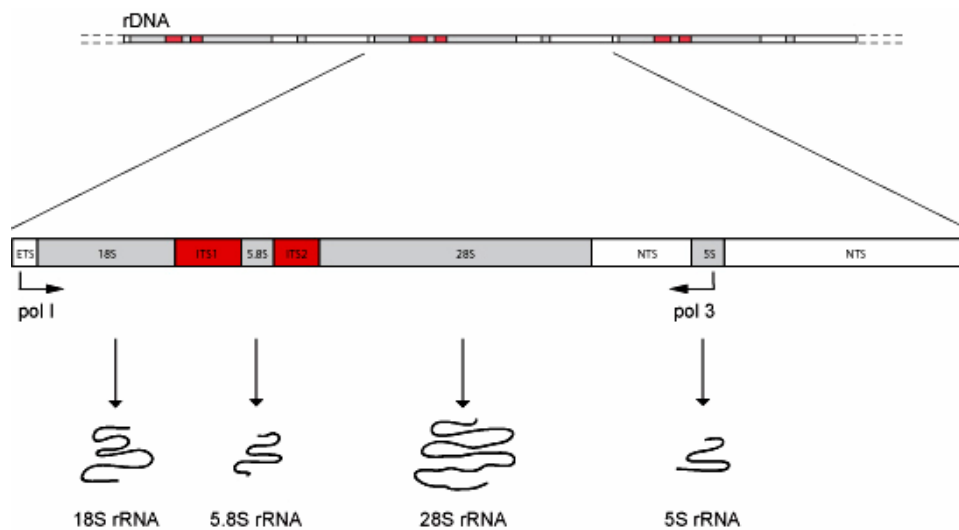


Fig. 20 Struttura dei geni ribosomiali degli organismi eucarioti.

1.3.1 Glossario per interpretazione PCR

- ❖ Baseline, si riferisce alla linea di segnale durante i cicli iniziali della PCR, solitamente da 3 a 15, in cui vi è un piccolo cambiamento di segnale di fluorescenza.
- ❖ Threshold è la linea che distingue un segnale significativo di amplificazione rispetto al rumore di fondo. Solitamente, il software dello strumento di PCR real-time imposta automaticamente il valore della linea *threshold* a 10 volte la deviazione standard del valore di fluorescenza della baseline, ma è anche possibile impostarlo manualmente al valore desiderato, ad esempio, per confrontare i Ct ottenuti in diverse reazioni di PCR.
- ❖ Threshold Cycle (Ct), corrisponde al numero di cicli al quale il segnale fluorescente della reazione supera la linea soglia. E' inversamente proporzionale alla quantità di DNA target presente.

Il Ct è strettamente correlato al numero di copie iniziali di DNA target. Un numero iniziale di copie pari al doppio anticipa il Ct di un ciclo, un numero pari a metà posticipa il Ct di un ciclo. Due campioni che possiedono una quantità di DNA target diverse di 1 logaritmo hanno un delta Ct di 3,3 (Invitrogen handbook).

- ❖ Curva Standard è la retta di taratura costruita con diluizioni seriali del DNA target a concentrazione nota (standard). Serve per determinare l'efficienza di reazione e per quantificare i campioni ignoti.
- ❖ Curva di melting: questa curva traccia i cambiamenti di fluorescenza osservati quando una molecola a doppio filamento di DNA (*dsDNA*), con incorporata una molecola di fluoroforo, si dissocia ("*melt*"), in una molecola di DNA a singolo filamento (*ssDNA*), nel momento in cui la temperatura di reazione aumenta in maniera progressiva fino ad un determinato valore ($T > T_m$). Per esempio, quando una molecola *dsDNA*, legata con il colorante SYBR Green I, è scaldata, viene immediatamente rilevata una diminuzione di fluorescenza quando si raggiunge il punto di *melting* (***melting point***)(T_m), dovuta alla dissociazione del filamento di DNA ed il conseguente rilascio del colorante. Il segnale di fluorescenza è messo in relazione con la temperatura, tramite la costruzione di un grafico (Fig. 21). Successivamente, il

valore di $-\Delta F/\Delta T$ (variazione di fluorescenza / variazione di temperatura) è messo in relazione con la temperatura tramite la costruzione di un secondo grafico (Fig. 22), al fine di ottenere una visione più chiara delle dinamiche di dissociazione.

L'analisi della *melting-curve* post-amplificazione è un modo semplice per assicurarne la specificità e per evidenziare la presenza, nella reazione di PCR real-time, di dimeri di primers. Poiché la temperatura di *melting* degli acidi nucleici è influenzata dalla lunghezza della sequenza, dal contenuto in GC e dalla presenza di un disallineamento delle basi, oltre ad altri fattori, prodotti differenti di PCR possono normalmente essere individuati grazie alle loro caratteristiche di *melting*.

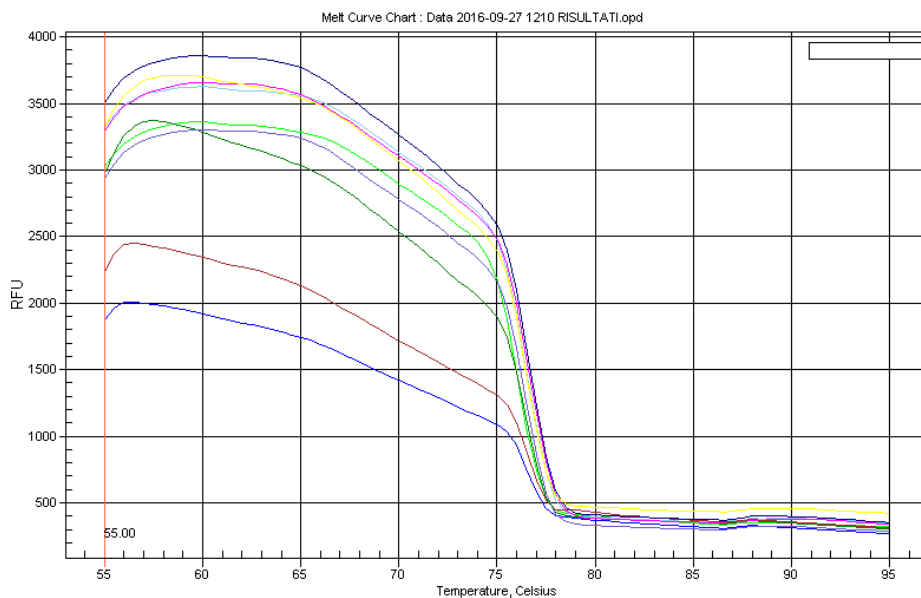


Fig. 21. Curva di *melting* (fluorescenza vs temperatura).

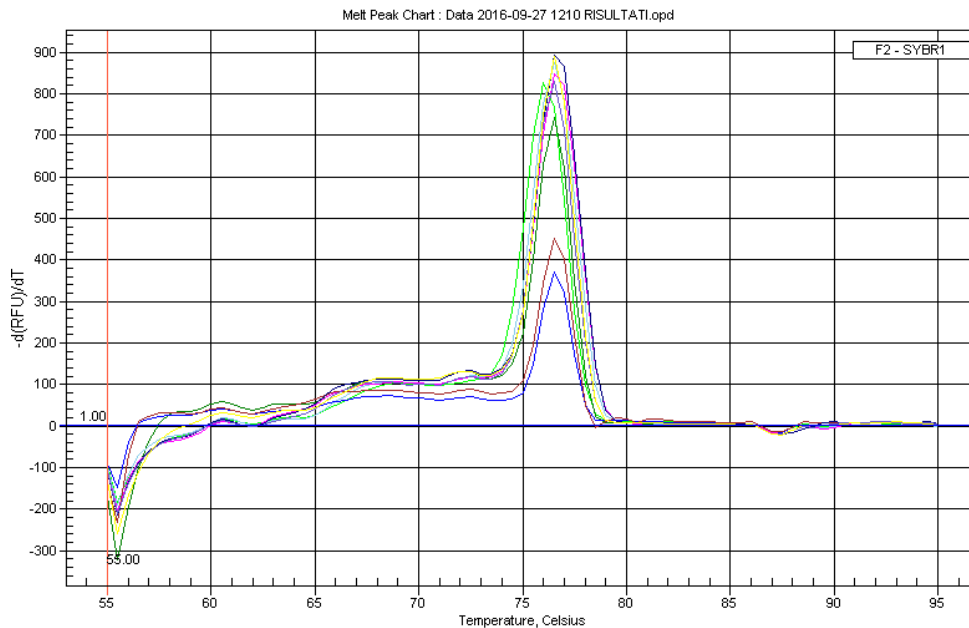


Fig. 22. Curva dei picchi di *melting* ($-\Delta F/\Delta T$ vs temperatura).

L'analisi della curva di *melting* può individuare la presenza di dimeri di primers poiché questi hanno una T_m più bassa rispetto a quella degli ampliconi.

La presenza di dimeri di primers è indesiderabile in una reazione, in quanto ne diminuisce l'efficienza e può quindi falsare il risultato dell'analisi. Tuttavia, essa viene spesso rilevata nel controllo negativo di reazione, nel quale vi è assenza di DNA target e abbondanza di primers non utilizzati. La presenza di dimeri di primers nel controllo negativo può segnalare che questi si possano formare anche in fase di amplificazione del DNA campione. Inoltre, può discriminare quando il segnale aspecifico è causato dalla presenza di dimeri di primers oppure da amplificazioni aspecifiche. In entrambi i casi, i picchi di *melting* sono rilevati ad una T_m più bassa rispetto a quella del campione e presentano pertanto un picco di *melting* che anticipa quello specifico.

- ❖ Efficienza (Slope), corrisponde alla pendenza della retta di taratura, ovvero al numero di cicli che intercorrono tra due diluizioni dello standard, ed è una misura dell'efficienza della reazione.

Per ottenere dei risultati accurati e riproducibili, la reazione deve avere un'efficienza il più possibile vicino al 100%, equivalente ad uno *slope* di -3.32, il che significa che il DNA target raddoppia ad ogni ciclo termico, nella fase esponenziale di reazione.

La formula per calcolare l'efficienza è la seguente: $E=10^{(-1/slope)}-1$

Fattori sperimentali come la lunghezza, la struttura secondaria e il contenuto in GC dell'amplicone possono influenzare l'efficienza della reazione. Altre condizioni che possono influenzare la reazione, tanto da far diminuire l'efficienza sotto il 90%, sono la dinamica della reazione stessa, l'uso di concentrazioni non ottimali di reagenti e la qualità dell'enzima. La presenza di inibitori di PCR, nei reattivi o nel campione, può produrre, invece, un'efficienza superiore al 110%.

Una buona reazione deve avere un'efficienza compresa tra il 90% e il 110%, che corrisponde ad avere uno *slope* compreso tra -3.58 e -3.10.

- ❖ Coefficiente di correlazione (R^2), riflette la linearità della standard curve (esprime la correlazione esistente tra i dati. Ideale=1, ma normalmente non si riesce ad ottenere un valore superiore a 0.999).

 - ❖ Limite di determinazione (Y-intercetta) corrisponde al limite teorico di rilevazione della reazione di PCR, ovvero al valore di Ct al quale il più basso numero di copie di DNA target dà origine ad un segnale di amplificazione statisticamente significativo. Definisce quindi il numero di cicli necessari per rilevare una copia di DNA target (teoricamente la PCR è in grado di rilevare una singola copia di DNA target, ma generalmente un numero di copie compreso tra 2 e 10 è indicato come il più basso numero di copie rilevabili e quantificabili in una PCR real-time). Questo limite può essere anche una misura della sensibilità del metodo.
- Inoltre, il valore di Y-intercetta può essere usato per comparare differenti target e sistemi di amplificazione.

2 SCOPO DEL LAVORO

L'esigenza di approfondire i dati del monitoraggio aerobiologico porta l'ARPA Valle d'Aosta ad esplorare tecniche di biologia molecolare, alternative all'identificazione microscopica su base morfologica, dei miceti aerodispersi.

I metodi tradizionali di identificazione macroscopica e microscopica dei funghi aerodispersi, basati su tecniche colturali, sottostimano inevitabilmente la biodiversità presente, in quanto solo il 17% dei funghi conosciuti può crescere su un terreno colturale e di questi molti producono un micelio sterile (Tonge et al., 2014).

L'analisi microscopica dei vetrini di monitoraggio rileva invece, in maniera più fedele, la biodiversità presente nel campione. Tuttavia, molti conidi/spore non possono essere distinti gli uni dagli altri in base alla loro morfologia e, in ogni caso, è possibile giungere solo fino all'indicazione del genere.

I metodi molecolari, basati sulla tecnica della PCR real-time, hanno il vantaggio di rilevare la presenza dei microrganismi nel campione, indipendentemente dalla loro coltivabilità. Riducono, inoltre, drasticamente i tempi analitici e sono caratterizzati, quando ben costruiti, da elevata sensibilità e specificità.

L'obiettivo finale del progetto di tesi di specializzazione è la determinazione quali-quantitativa dei propaguli fungini aerodispersi, tramite l'amplificazione del DNA target (PCR real-time).

In particolare, si vuole arrivare ad un'identificazione precisa di due miceti aerodispersi, *Alternaria* spp. e *Cladosporium* spp., normalmente presenti sui vetrini di monitoraggio aerobiologico.

In Europa e negli Stati Uniti d'America, la sensibilità ai conidi di questi due miceti è associata con uno sviluppo, una persistenza e un incremento dell'asma da allergia. Nel 2009, negli Stati Uniti, l'asma ha colpito l'8,2% della popolazione (adulti e bambini), ovvero 24,6 milioni di persone (Knutsen et al., 2012).

3 MATERIALI E METODI

Le prove sono state condotte nell'arco di un anno nei laboratori di microbiologia e biologia dell'ARPA Valle d'Aosta.

Il lavoro ha previsto il seguente procedimento, descritto in successione, seguendo l'ordine dei passaggi eseguiti.

3.1 Raccolta dei conidi per lo stock di riferimento

I conidi utilizzati per il lavoro di tesi sono di origine naturale, poiché sono stati campionati tramite metodica SAS (*Surface Air System*) (UNI EN 13098:2002), utilizzata per il controllo microbiologico ambientale dell'aria *indoor*, all'interno del laboratorio di microbiologia.



Fig. 23. Campionatore SAS

Il SAS (Fig. 23) è uno strumento grazie al quale è possibile prelevare diverse quantità d'aria con un flusso costante, che impatta direttamente sulla piastra di terreno colturale.

Lo strumento incorpora due testate, dotate di piccoli fori di speciale conformazione, che possono funzionare contemporaneamente. Questo permette di dimezzare i tempi di prelievo ed eseguire campionamenti su due terreni diversi nello stesso istante. Ogni testata aspira 180 litri al minuto.

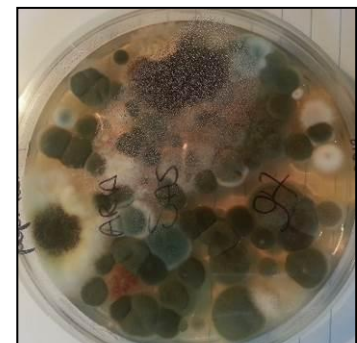


Fig. 24. Piastra di Sabouraud dextrose agar con crescita colonie da aria campionata con SAS

Successivamente, i conidi/spore sono stati messi nelle condizioni di germinare e produrre colonie visibili su terreno colturale Sabouraud dextrose agar (SAB; OXOID, UK) incubato per 5 giorni in termostato, ad una temperatura di $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ (Fig. 24).

Le colonie d'interesse sono quindi state reisolate nuovamente su terreno SAB, incubate in termostato per 10-15 giorni ad una temperatura di $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ed utilizzate per lo studio (Fig. 25).

Per la raccolta e la risospensione dei conidi, sono state effettuate diverse prove utilizzando:

- acqua distillata,
- alcool 70% (Yamamoto et al., 2010),
- *phosphate buffer* 0.01 M + 0.05% (v/v) di *Tween* 20 (Dean et al., 2004).

Infine, si è scelto di seguire, per la preparazione degli stock di riferimento, la metodica utilizzata da Dean et al., 2004 (Fig. 26), aggiungendo al loro protocollo una delicata agitazione superficiale della coltura, tramite una bacchetta di vetro a L (Fig. 27).



Fig. 25. Colonie di *Alternaria* spp. reisolata su terreno SAB.



Fig. 26. Colonie di *Alternaria* spp. con tampone phosphate buffer 0.01 M con l'aggiunta di 0.05% (v/v) di Tween 20

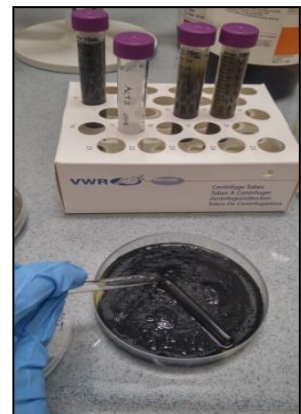


Fig. 27. Delicata agitazione superficiale della coltura, tramite bacchetta di vetro a L.

Si effettuano, quindi, i seguenti step:

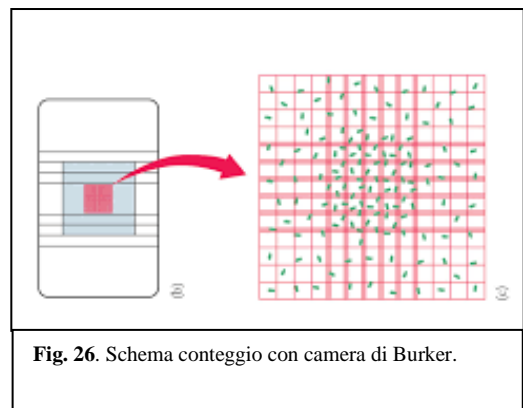
- 1) versare nella piastra Petri 5 ml di tampone *phosphate buffer* 0.01 M + 0.05% (v/v) di *Tween* 20 e, con una bacchetta di vetro, procedere delicatamente al distacco dei conidi dal micelio;
- 2) raccogliere il tampone con una pipetta e metterlo in una provetta sterile tipo *Falcon* da 15 ml;
- 3) ripetere pt.1 per ulteriori 2 volte;
- 4) raccogliere del liquido di sospensione in un'unica provetta da 15 ml;
- 5) centrifugare a 12.000 g per 10 minuti;
- 6) eliminare il surnatante, facendo attenzione a non asportare il pellet;
- 7) aggiungere 15 ml di tampone;

- 8) ripetere dal punto 4 al punto 6 per 2 volte;
- 9) trasferire il pellet in una provetta eppendorf da 2ml;
- 10) aggiungere 1.5 ml di tampone;
- 11) vortexare per omogeneizzare campione;
- 12) centrifugare a 12.000 g per 10 minuti;
- 13) asportare il surnatante;
- 14) risospendere il pellet portando a volume di 1 ml.

Il numero totale di conidi risospesi in 1ml è stato calcolato tramite conteggio diretto al microscopio ottico, utilizzando una camera di *Burker* (Fig. 26).

Supponendo un'alta concentrazione di partenza sono state eseguite una o più diluizioni 1:100 del campione:

- 1) unire 10 μ l di campione + 990 μ l di tampone;
- 2) vortexare,
- 3) prelevare 5 μ l di campione diluito e posizionarlo sulla camera di lettura del vetrino;



- 4) coprire con coprioggetto;
- 5) leggere al microscopio ottico e contare il numero di conidi d'interesse presenti;
- 6) rapportare il numero contato al volume di partenza, in base al numero di diluizioni effettuate.

La quantità teorica di DNA, contenuta nei conidi che compongono lo stock di partenza da sottoporre alle successive operazioni di estrazione e amplificazione dell'acido nucleico, è stata ricavata mediante l'utilizzo del *C-value* (Yamamoto et al., 2010; Hospodsky et al.,

2010).

C-value = quantità di DNA in pg contenuta in una cellula aploide

$$\text{Es: } (1,2 \times 10^8 \text{ spore}) \times 0,03 = 3,6 \times 10^6 \text{ pg DNA}$$

Per ricavare i *C-value*, caratteristici di ciascun genere, è stato utilizzato il sito:
<http://www.zbi.ee/fungal-genomesize>.

3.2 Raccolta conidi da vetrini veri e simulati

I conidi sono stati raccolti da:

- vetrini di monitoraggio reali,
- vetrini di monitoraggio simulati.

Per la preparazione dei vetrini simulati, 100 µl di una sospensione di conidi raccolti dalla piastra Petri, come descritto nel paragrafo precedente 3.1, sono stati posizionati direttamente sul nastro siliconato e, successivamente, dopo asciugatura all'aria, sono stati colorati con fucsina, per simulare un vetrino di monitoraggio, oppure non colorati per avere un campione di controllo di processo (TQ) dopo raccolta, su nastro siliconato (Fig. 29).

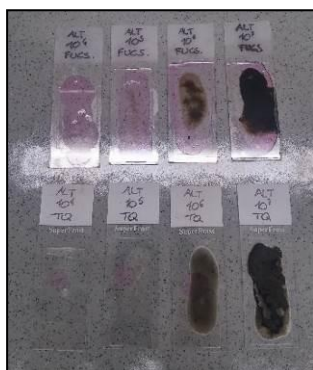


Fig. 29 Vetrini simulati, con diluizioni di conidi, colorati con fucsina e TQ (sotto).



Fig. 30. Nastro, in piastra petri sterile, grattato con cell scraper.

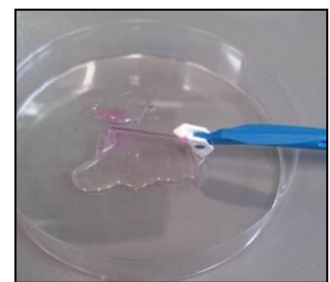
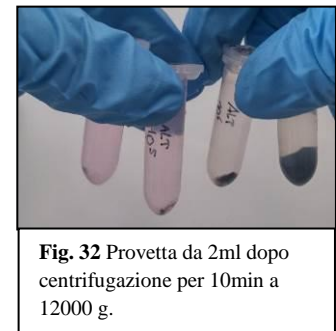


Fig. 31. Pulizia del nastro con 1ul di tampone phosphate buffer 0.01 M con l'aggiunta di 0.05% (v/v) di Tween 20 scaldato a 65°C.

La raccolta dei conidi depositati sul nastro siliconato (vetrino di monitoraggio o campione simulato) è stata effettuata nel seguente modo:

- 1) posizionare il nastro in una piastra Petri sterile, con il nastro siliconato, sul quale è presente il materiale biologico, rivolto verso l'alto (Fig. 30),
- 2) aggiungere 1000µl di tampone *phosphate buffer* 0.01 M con l'aggiunta di 0.05% (v/v) di *Tween 20* scaldato a 65°C (Fig. 31),
- 3) grattare sul nastro con l'aiuto di un *cell scraper* (Greiner Bio-One, Germany),
- 4) aspirare il liquido ottenuto e riporlo in una provetta da 15 ml,
- 5) ripetere le tre precedenti operazioni per 2 volte,
- 6) portare a volume la provetta con il *phosphate buffer*,
- 7) centrifugare per 10 minuti a 9000 g,
- 8) eliminare il surnatante,
- 9) risospendere il pellet riportando a volume con il *phosphate buffer*,
- 10) ripetere la centrifugazione e la successiva eliminazione del surnatante,
- 11) risospendere il pellet con 2ml di *phosphate buffer*,
- 12) trasferire il contenuto in una provetta da 2ml,
- 13) centrifugare per 10 minuti a 12000 g (Fig. 32),
- 14) eliminare il surnatante,
- 15) risospendere il contenuto in 1ml di *phosphate buffer*,
- 16) procedere al conteggio dei conidi presenti tramite lettura diretta al microscopio, come specificato nel precedente paragrafo.



3.3 Estrazione del DNA

Per effettuare l'estrazione del DNA dai conidi sono stati saggiati diversi metodi, pubblicati in letteratura, fino a definire quello più adeguato, che è stato poi adottato per le principali prove sperimentali necessarie alla messa a punto e alla caratterizzazione del metodo.

Per quanto riguarda il pre-trattamento meccanico, sono stati testati diversi tempi di rottura meccanica della parete dei conidi, oltre a un pre-trattamento a freddo, con l'uso dell'azoto liquido, per migliorare l'estrazione del DNA da *Alternaria* spp.

Per la fase di purificazione sono stati esaminati due metodi, il primo basato sull'uso del CTAB (Doyle & Doyle, 1987), il secondo basato su di un kit di estrazione (DNeasy plant mini kit, Qiagen), come suggerito da differenti autori.

Il materiale di partenza scelto per ogni prova è uno stock di conidi 10^8 per *Cladosporium* e 10^7 per *Alternaria*, preparato come descritto nei paragrafi precedenti (3.1 e 3.2).

3.3.1 Confronto tra due pre-trattamenti meccanici

Sono stati testati due diversi protocolli:

- ✓ Dean T.R. et al., 2004
 - a) 0.25 g di *acid-washed glass beads* (212-311 μm)
 - b) 200 μl campione di conidi
 - c) 50 secondi di rottura meccanica con scuotimento in "*Disruptor Genie*" (Scientific Industries, USA) (Fig. 33)
 - d) 1 minuti in ghiaccio
 - e) 50 secondi di rottura meccanica con scuotimento in "*Disruptor Genie*"
 - f) centrifugare brevemente per pochi secondi a 5000 rpm
 - g) prendere il surnatante, rimuovendolo dalle biglie, per iniziare l'estrazione con CTAB



Fig. 33. Disruptor Genie

✓ Pashley C. H. et al., 2012

a) 0.3 g di *acid-washed glass beads* (212-311 μm)

b) 100 μl campione di conidi

c) 400 μl di *buffer* CTAB di estrazione

d) 2 minuti di rottura meccanica con scuotimento in “*Disruptor Genie*” (Scientific Industries, USA)

e) 10 minuti a 65°C mescolando per inversione

f) procedere con l’ estrazione su tutto il campione, attraverso l’uso della metodica CTAB.

3.3.2 Confronto tra 3 tempi di rottura meccanica diversi

Mantenendo il protocollo previsto da Pashley et al., 2012, precedentemente descritto (3.3.1), si procede alla verifica di 3 diversi tempi di rottura, per vedere se questo passaggio influenza il risultato della prova:

✓ 2 minuti (Pashley et al., 2012);

✓ 15 minuti;

✓ 60 minuti (Yamamoto et al., 2010).

3.3.3 Confronto pre-trattamento a freddo del campione e stato fisiologico dei conidi

Vengono prese 3 colonie a tempi di crescita diversi:

✓ 10 giorni,

✓ 15 giorni,

✓ 20 giorni (Fig. 34).

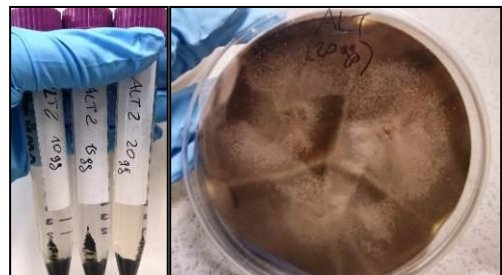


Fig. 34. Provette contenenti conidi di *Alternaria* spp. raccolti da piastre con diversi tempi di crescita e a dx colonie di *Alternaria* spp. a 20 giorni di crescita.

Lo stato fisiologico dei conidi dipende dal numero dei giorni di crescita: in particolare per *Alternaria*, quelli più giovani hanno una parete più sottile e un numero minore di setti trasversali, rispetto a quelli più vecchi che appaiono più scuri, grinzosi e con una struttura più complessa (Fig. 35).

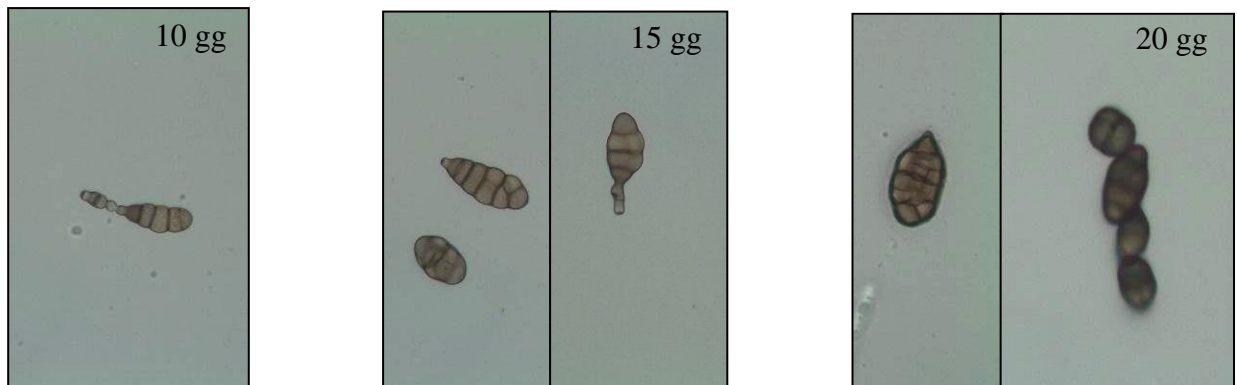


Fig. 35 Conidi di *Alternaria* spp. da colonie a 10 giorni, a 15 giorni e a 20 giorni di crescita (400X)

Viene testato lo stesso campione diviso in due provette (1 e 2):

- provetta 1 = sottoposta alla procedura Pashley et al., 2012;
- provetta 2 = sottoposta a preliminare congelamento:
100 µl di spore + 400 µl di CTAB + 0.3g di *beads* congelati in azoto liquido,
seguito dalla procedura Pashley et al., 2012

3.3.4 Scelte finali per il pre-trattamento

Alla fine delle prove precedentemente descritte, è stato scelto il seguente protocollo per il pre-trattamento dei campioni:

- a) 10^7 - 10^8 conidi risospesi in 100µl di tampone *phosphate buffer* 0.01 M con l'aggiunta di 0.05% (v/v) di *Tween 20* (Sigma Aldrich, Missouri, USA),
- b) solo per *Alternaria*, congelamento con azoto liquido,
- c) 400 µl *buffer* CTAB,

- d) 0.3 g di *Glass beads, acid-washed* 212-300 μm (50-70 U.S. sieve) (Sigma Aldrich, Missouri, USA),
- e) 2 minuti in un omogeneizzatore programmato alla massima velocità *Cell disruptor "Disruptor Genie"* (Scientific Industries, USA),
- f) 10 minuti a 65°C all'interno di un blocco riscaldante modulare (Barnstead International, USA),
- g) procedere all'estrazione dell'intero campione.

3.4 Purificazione del DNA estratto

La purificazione del DNA è stata effettuata utilizzando un metodo basato sull'utilizzo del *buffer* CTAB (Doyle & Doyle, 1987) e un secondo metodo indicato da Pashley et al., 2012, che prevede l'utilizzo del kit DNeasy plant mini kit (Qiagen, Germany).

3.4.4 Metodo CTAB

Il metodo CTAB (Doyle & Doyle, 1987) modificato, che si è deciso di seguire, era precedentemente utilizzato in laboratorio per l'estrazione del DNA, da matrici alimentari, per la ricerca degli OGM (POS VIR 031 INT rev.1 del 11/05/2011, IZSLT). Permette di ottenere un ottimo DNA in termini di concentrazione e di purezza, con costi molto limitati.

E' costituito da cinque passaggi principali:

- 1) Lisi delle membrane cellulari
- 2) Purificazione del DNA
- 3) Precipitazione del DNA
- 4) Lavaggio del DNA
- 5) Sospensione del DNA

Il metodo prevede l'utilizzo del tampone CTAB (esadeciltrimetil-ammonio-bromuro).

Si tratta di un detergente ionico che lega gli anioni. Le molecole di DNA, che hanno carica negativa, si vanno a legare al CTAB formando un complesso che può precipitare, favorendo la sua separazione dai prodotti di scarto.

1) Lisi delle membrane cellulari

- aggiungere 400 μ l di *buffer* CTAB (CTAB 20 g/l, EDTA 20mM, Tris/Hcl 20.1M, NaCl 1.4 M),
- incubare in blocco riscaldante a $65 \pm 5^\circ\text{C}$ per 30 minuti,
- aggiungere 10 μ l di RNasi (5 PRIME GmbH, Hamburg) 10 μ g/ml e mescolare accuratamente,
- incubare in blocco riscaldante a $65 \pm 5^\circ\text{C}$ per 15 minuti agitando le provette manualmente almeno tre volte durante l'incubazione,
- aggiungere 10 μ l di Proteinasi K (5 PRIME GmbH, Hamburg) 20 μ g/ml e mescolare accuratamente,
- incubare in blocco riscaldante a $65 \pm 5^\circ\text{C}$ per 30 minuti, agitando le provette manualmente almeno 5 volte durante l'incubazione,
- centrifugare 10 minuti a 12000 g.

Il *buffer* di estrazione contiene altri reagenti che svolgono un'azione importante nella purificazione del DNA:

- EDTA (Acido etilendiamminotetracetico), un agente chelante che sequestra i cationi necessari per la stabilizzazione delle membrane cellulari, va inoltre ad inibire l'enzima DNasi, che idrolizza i legami fosfodiesterici della catena del DNA, danneggiandolo.
- NaCl, che va a saturare le cariche negative del DNA, consentendogli successivamente di precipitare in alcool.
- Tris-HCl, che funge da tampone, mantenendo il pH leggermente alcalino (pH 8) condizione fondamentale per la successiva fase di purificazione.

L'RNasi viene utilizzata per eliminare l'RNA in preparazioni di DNA.

La Proteinasi K è un'endopeptidasi aspecifica molto attiva.

2) Purificazione del DNA

- trasferire la fase liquida e metterla in un tubo *eppendorf* da 2 ml contenente la stessa quantità di Cloroformio (J.T. Baker Analyzed, Holland) (circa 800µl),
- mescolare accuratamente e centrifugare per 15 minuti a 12000 g,
- riprendere il surnatante e metterlo in un tubo *eppendorf* da 2 ml contenente la stessa quantità di Cloroformio (J.T. Baker Analyzed, Holland) (circa 650µl),
- mescolare accuratamente e centrifugare per 5 minuti a 12000 g,

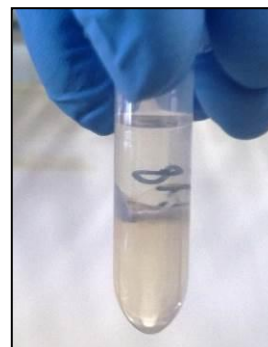


Fig. 36. Interfaccia solida, di proteine denaturate, tra le due fasi liquide.

Il Cloroformio completa la denaturazione delle proteine, rimuove i lipidi, solubilizzandoli e, grazie alla sua elevata densità, facilita la separazione della fase acquosa, contenente il DNA, da quella organica, contenente altri componenti di scarto.

Dopo centrifugazione, si apprezza nettamente l'interfaccia solida, di proteine denaturate, tra le due fasi liquide (Fig. 36).

3) Precipitazione del DNA

- trasferire il surnatante contenente il DNA in una nuova *eppendorf* da 1.5 ml,
- aggiungere 2 volumi di soluzione precipitante CTAB (5g/l + NaCl 0.04 M),
- miscelare per pipettamento,
- incubare per 60 minuti a temperatura ambiente.,
- centrifugare 10 minuti a 16000 g,
- eliminare il surnatante,
- risospendere il pellet in 350 µl NaCl 1.2 M,

- aggiungere 350 μ l di Cloroformio e mescolare accuratamente,
- centrifugare 10 minuti a 16000 g,
- trasferire il surnatante contenente il DNA in una nuova *eppendorf* da 1.5 ml,
- aggiungere 0.6 volumi di isopropanolo 99.5% (Carlo Erba Reagenti Spa, Milano) (es. 180 μ l di isopropanolo + 300 μ l di surnatante),
- mescolare per inversione ed incubare over night a 4°C.

4) Lavaggio del DNA

- centrifugare 10 minuti a 16000 g,
- togliere il surnatante, poiché il DNA precipitato rimane nel pellet,
- aggiungere 500 μ l di Etanolo (J.T. Baker Analyzed, Holland) al 70%, per rimuovere i sali precipitati,
- miscelare accuratamente,
- centrifugare 10 minuti a 16000 g,
- togliere il surnatante e asciugare il precipitato lasciandolo sotto cappa a flusso laminare,

Tale lavaggio allontana i Sali insolubili in etanolo, ma non è in grado di allontanare il cloruro di sodio.

5) Risospensione del DNA

- Dopo l'evaporazione dell'alcool, il pellet traslucido viene risospeso in 100 μ l di acqua grado reagente sterile.
- Il campione viene utilizzato immediatamente o congelato a -20°C.

3.4.5 METODO con DNeasy plant mini kit (Qiagen, Germany)

I kit per l'estrazione degli acidi nucleici hanno il vantaggio di fornire reagenti standardizzati e di qualità garantita, dando così un elevato grado di affidabilità. L'utilizzo del kit prevede i seguenti passaggi:



- Aggiungere 400 μ l di Tampone di lisi AP1 e 4 μ l di RNasi A, che digerisce l'RNA presente nel campione.
- Vortexare e incubare per 10 minuti a 65 °. Invertire il tubo 2-3 volte durante l'incubazione.
- Aggiungere 130 μ l di Buffer P3. Mescolare e incubare per 5 minuti in ghiaccio.
- Centrifugare il lisato per 5 minuti a 20.000 x g (14.000 giri / minuto).
- Pipettare il lisato in una colonnina QIAshredder collocata in tubo di una raccolta da 2 ml
- Centrifugare per 2 minuti a 20.000 x g.
- Trasferire il surnatante in un nuovo tubo, senza disturbare il pellet se presente.
- Aggiungere 1,5 volumi di Buffer AW1 e mescolare pipettando, per promuovere il legame del DNA alla membrana del kit.
- Trasferire 650 μ l della miscela in una colonnina DNeasy Mini di rotazione posta in un tubo di raccolta da 2 ml. Il DNA si lega alla membrana mentre i contaminanti, come le proteine e i polisaccaridi, sono eluiti.
- Centrifugare per 1 minuto a ≥ 6000 x g (≥ 8000 giri / minuto)
- Scartare l'eluito e ripetere questo passaggio con il campione rimanente.
- Collocare la colonnina di rotazione in un nuovo tubo di raccolta da 2 ml.
- Aggiungere 500 μ l di Buffer AW2

- n) Centrifugare per 1 minuto a $\geq 6000 \times g$.
- o) Scartare l'eluito e aggiungere 500 μ l di tampone AW2.
- p) Centrifugare per 2 minuti a 20.000 $\times g$. Nota: Rimuovere la colonna di rotazione dal tubo di raccolta in modo che la colonnina non entri in contatto con l'eluito.
- q) Trasferire la colonnina di centrifuga in un nuovo tubo di microcentrifuga da 1,5 ml o 2 ml.
- r) Aggiungere 100 μ l di Buffer AE per l'eluizione.
- s) Incubare per 5 minuti a temperatura ambiente (15-25 ° C).
- t) Centrifugare per 1 minuto a $\geq 6000 \times g$.
- u) Ripetere il passaggio s.

I tamponi utilizzati nel kit contengono:

Buffer AP1 –Lysis Buffer

10 mM Tris-HCl pH8.0

1 mM EDTA pH 8.0

0.1% SDS

0.1M NaCl

+1X PVP

+10mM DTT

+ RNase

P3 - Buffer per la precipitazione delle proteine

3M potassio / 5M acetato

Preparato aggiungendo:

60 ml of 5M acetato di potassio (98.14 g in 200 ml di H₂O)

11.5 ml of acido acetico glaciale

28.5 ml di H₂O

AW1- **Binding buffer**

1M Guanidine Hydrochloride (4.78 g GH in 50 mL 100% EtOH)

AW2- **Ethanol Wash**

70% EtOH

Buffer AE

10 mM Tris·Cl,

0.5 mM EDTA,

pH 9.0.

Tale pH è ottimale per l'eluizione del DNA dalle membrane delle colonnine del DNeasy kit.

3.4.6 Calcolo dell'efficienza di estrazione

L'accuratezza della reazione di PCR è fortemente limitata dall'efficienza di estrazione del DNA dal campione di partenza (Hospodsky et al., 2010).

Per determinare l'efficienza percentuale di estrazione del DNA (η_{DNA}), si rapporta la massa di DNA ottenuto dal processo di estrazione, misurata con lo spettrofotometro, con la quantità teorica di DNA ottenibile dal materiale di partenza, calcolata come indicato (paragrafo 3.1) in base al conteggio microscopico ottenuto e al *C-value*.

$$\eta_{DNA} = \frac{\text{massa di DNA misurato} \times 100}{\text{quantità teorica di DNA}}$$

(Hospodsky et al., 2010).

3.5 Amplificazione del DNA tramite Polymerase Chain Reaction (PCR)

Tutti i reattivi e le apparecchiature utilizzati sono sottoposti a regolari controlli e tarature, secondo quanto indicato dalle norme di riferimento.

Inoltre, è indispensabile predisporre una serie di controlli, durante tutte le fasi del processo analitico, compresa quella di estrazione e purificazione del DNA, secondo lo schema di seguito riportato (ISO 22174:2005):

	Controllo negativo di processo	Controllo positivo di processo	*Controllo negativo di PCR	*Controllo positivo di PCR
Trattamento campione	X	X		
Estrazione DNA	X	X		
Amplificazione	X	X	X	X
Rilevazione	X	X	X	X
X = fase del processo coperta dal controllo				
* controlli indispensabili in ogni ciclo di amplificazione				

3.5.4 Strumentazione e reattivi

- Termociclatore iCycler (Bio-Rad, USA) (Fig. 37)
- Modulo lettore multicanali iQ5 (Bio-Rad, USA)
- iQ™ SYBR® Green Supermix, 100 x 50 µl rxns, 2.5 ml (Bio-Rad, USA), reazione pronta all'uso ottimizzata per PCR quantitative, i cui componenti essenziali sono Hot-Start iTaq DNA polimerasi, dNTPs, MgCl₂, Sybr Green I®



Fig. 37. Termociclatore iCycler

- Primers *desalted* (Bio-Rad, USA):

Nome primers	Sequenza nucleotidica	Fonte bibliografica
ITS1F	5' - CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA - 3'	Gardes e Bruns, 1993
ITS4	5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	White et al., 1990
Clado F	5'TACTCCAATGGTTCTAATATTTTCCTCTC-3'	Qing-Yin Zeng et al., 2005
Clado R	5'-GGGTACCTAGACAGTATTTCTAGCCT-3'	
Alt4	5'-CTTTTGCGTACTTCTTGTTTCC-3'	Crespo-Sempere et al., 2013
Alt5	5'-CAGGCATGCCCTTGGATAC-3'	

Tab. 1 Sequenze nucleotidiche dei primers utilizzati durante il progetto.

3.5.5 Protocolli di preparazione delle master-mix e concentrazioni primers utilizzati

La reazione di PCR è effettuata in un volume complessivo di 25 µl per pozzetto: 20 µl di master-mix + 5 µl di campione di DNA. I reagenti della master-mix sono diluiti in acqua grado reagente sterile.

Preparazione della Mix per ALT		
Reagenti	concentrazione	concentrazione
	stock µM	finale µM
iQ™ SYBR® Green Supermix	2 x	1 x
primer ALT forward+reverse	5 µM (20x)	0,25 µM

Preparazione della Mix per CLAD		
Reagenti	concentrazione	concentrazione
	stock µM	finale µM
iQ™ SYBR® Green Supermix	2 x	1 x
primer CLAD forward+reverse	5 µM (20x)	0.4 µM

Preparazione della Mix per ITS		
Reagenti	concentrazione	concentrazione
	stock μM	finale μM
iQ™ SYBR® Green Supermix	2 x	1 x
primer ITS forward+reverse	5 μM (20x)	0.25μM

3.5.6 Protocolli termici utilizzati

ITS: Protocollo messo a punto durante il progetto presso il laboratorio di analisi dell'ARPA VdA.

step	tempo	temperature	Ripetizioni (cicli)
Attivazione Taq	5 minuti	95 °C	1
Denaturazione DNA	15 secondi	95°C	40
Annealing e estensione	30 secondi	60°C	

Tab. 2 Protocollo termico primers ITS

CLAD: Vedi Zeng et al., 2006.

step	tempo	temperature	Ripetizioni (cicli)
Attivazione Taq	5 minuti	95 °C	1
Denaturazione DNA	10 secondi	95°C	40
Annealing e estensione	30 secondi	68°C	

Tab. 3 Protocollo termico primers CLAD

ALT: Il protocollo termico pubblicato nell'articolo di Crespo-Sempere et al.,2013, preso come riferimento per la costruzione dei primer ALT, indicava anche l'utilizzo degli stessi reattivi (iQ™ SYBR® Green Supermix, Bio-Rad, USA), ciò nonostante non ha dato risultati soddisfacenti (nessuna amplificazione del DNA). E' stato pertanto necessario ottimizzare tutte le condizioni di reazione (concentrazione dei primer e soprattutto protocollo termico).

Il protocollo termico sotto riportato, che risulta essere performante, non coincide quindi con quello pubblicato, ma è stato messo a punto durante lo studio di tesi.

step	tempo	temperature	Ripetizioni (cicli)
Attivazione Taq	3 minuti	95 °C	1
Denaturazione DNA	10 secondi	95°C	40
Annealing e estensione	30 secondi	60°C	

Tab. 4 Protocollo termico primers ALT messo appunto presso il laboratorio di biologia dell'ARPA Vda.

Protocollo termico della curva di *melting*: impostazione automatica dello strumento.

step	Gradiente termico	tempo	temperature	Ripetizioni (cicli)
Melting	0.5°C	30 sec.	55°C →95 °C	81

Tab. 5 Protocollo termico utilizzato per creare la curva di *melting*.

3.5.7 Analisi dei risultati di PCR

E' necessario premettere che, per poter confrontare le curve di amplificazione ottenute in diverse sedute analitiche e/o con differenti condizioni sperimentali (campioni diversi, sequenze target differenti, protocollo termico, concentrazione dei reattivi, primers utilizzati), è indispensabile posizionare la *threshold line* sempre nella stessa posizione.

Per effettuare l'analisi dei risultati e il calcolo della performance questi sono i passaggi da seguire:

a) **Verifica del segnale di amplificazione,**

Innanzitutto bisogna verificare che la curva di amplificazione abbia il suo aspetto caratteristico (ISO 22119:2011) (Fig. 38).

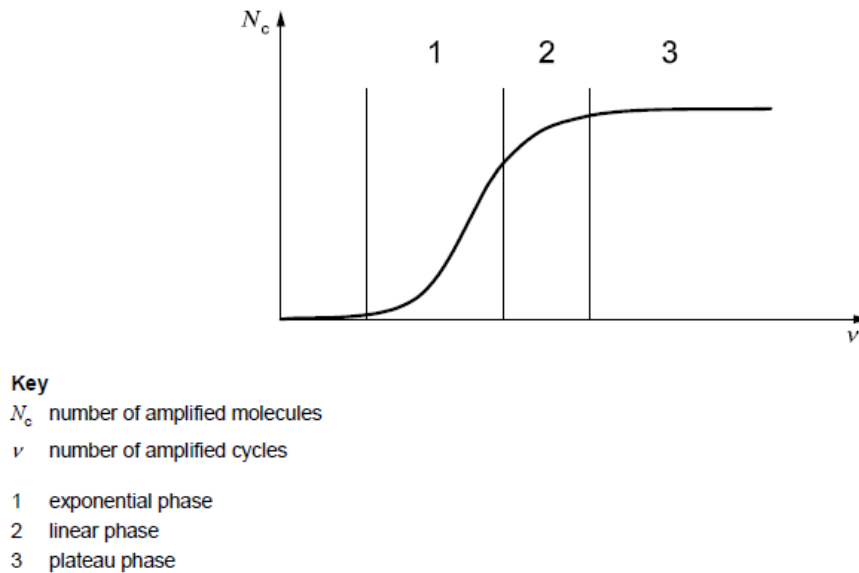


Fig. 38 Curva di amplificazione caratteristica (ISO 22119:2011)

Se la curva di amplificazione è caratteristica allora è possibile procedere con l'analisi e l'interpretazione dei risultati.

I risultati dei controlli predisposti (controllo positivo che presenta la sequenza target e controllo negativo che non presenta la sequenza target) devono essere chiari e non ambigui.

In questo caso è possibile interpretare i risultati ottenuti dai campioni con quelli ottenuti dai controlli, seguendo lo schema riportato:

Campione testato	Controllo positivo di processo	Controllo negativo di processo	Controllo positivo di PCR	Controllo negativo di PCR	Interpretazione del risultato
+	+	+	-	+/-	positivo
-	+	+	-	+	negativo
+	+	+	+	+/-	Possibile contaminazione
-	-	+	-	-	Possibile inibizione

Tab. 6 Schema per l'analisi dei risultati di PCR (ISO 22174:2005)

b) Controllo della curva di dissociazione (*Melting-curve*)

Se i risultati della PCR sono significativi ed interpretabili, come sopra riportato, è necessario verificare la specificità delle reazioni di amplificazione tramite l'analisi della curva di *melting*.

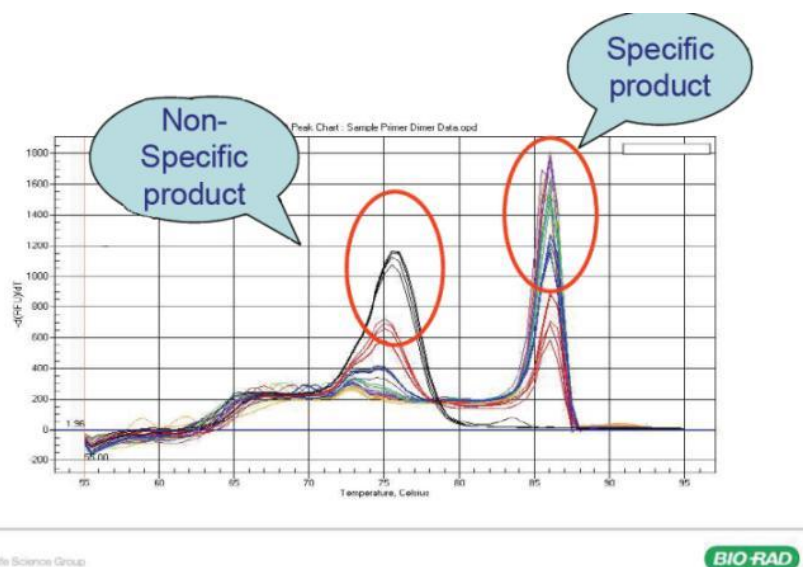


Fig. 39 Analisi della curva di *melting* (www.molecularlab.it)

La caratterizzazione dei prodotti di reazione (es. dimeri di primer vs ampliconi), tramite analisi della curva di *melting*, elimina la necessità di effettuare un gel di elettroforesi, per verificare la qualità del DNA amplificato, permettendo un notevole risparmio di tempo.

Una reazione specifica non fa rilevare, in questa fase, picchi diversi: tutti i prodotti devono presentare la stessa posizione di picco.

Picchi diversi possono testimoniare dimeri di primers oppure delle reazioni di amplificazione aspecifiche (vedi introduzione, paragrafo 1.3.1).

c) **Misurazione dell'Efficienza di reazione:**

Se l'analisi delle curve di amplificazione dimostra che si ottengono risultati soddisfacenti (amplificazioni specifiche della sequenza target) è necessario valutare anche l'efficienza della reazione, tramite la costruzione di una retta di calibrazione.

Essa viene costruita, a partire da un campione di materiale stock di DNA a concentrazione nota, attraverso una serie di diluizioni decimali (almeno 5 ordini di grandezza).

L'efficienza della reazione è calcolata direttamente dal software dello strumento. Al valore di efficienza sono associati altri parametri quali la pendenza della retta (*slope*), il coefficiente di correlazione, il *range* dinamico e l' Y-intercetta (vedi introduzione, paragrafo 1.3.1).

d) **Misurazione della Sensibilità di reazione:**

La sensibilità indica la quantità minima di DNA target che il sistema utilizzato è in grado di rilevare, espresso come numero di conidi/reazione o pg di DNA per reazione. E' stata calcolata, come l'efficienza, tramite la costruzione di una retta di calibrazione, utilizzando successive diluizioni decimali a partire da un campione stock di DNA a concentrazione nota.

Ad un valore di Ct più elevato corrisponde una più bassa sensibilità (vedi anche Y-intercetta, paragrafo 1.3.1).

f) Misurazione della ripetibilità intermedia:

La ripetibilità intermedia (o riproducibilità della PCR) si calcola tramite la ripetizione dello stesso campione, con le stesse condizioni di PCR, in sedute analitiche diverse, per un numero significativo di volte (6-10 ripetizioni).

Vengono quindi confrontati i valori di Ct ottenuti (mantenendo la *threshold* sempre nello stesso punto) e calcolati i seguenti parametri:

$$\text{Media} = \bar{x}$$

$$\text{Deviazione standard} = s_r$$

$$\text{Ripetibilità intermedia (riproducibilità della PCR)} = R = 2,8s_r$$

$$\text{Coefficiente di variazione \% (RSD)} = \frac{s}{x}$$

La ripetibilità intermedia, o riproducibilità della PCR, non comprende la variabilità dovuta al passaggio di estrazione e purificazione del DNA.

Il valore di riferimento con cui confrontare il risultato è < 35% (CRL-Validation report, 15 February 2015).

3.6 Analisi dei risultati del metodo

3.6.1 Sensibilità del metodo

La sensibilità del metodo comprende anche la fase di estrazione e purificazione del DNA.

E' stata calcolata effettuando diluizioni decimali a partire da un campione stock di conidi a concentrazione nota.

Tutti i campioni così ottenuti, che differiscono di un logaritmo come quantità di conidi presenti, sono sottoposti alla procedura di estrazione e purificazione del DNA.

Successivamente è stata effettuata la PCR real-time e sono state valutate le curve di amplificazione ottenute e i relativi valori di Ct.

3.6.2 Riproducibilità del metodo

Campioni stock contenenti una quantità di conidi standard (per *Cladosporium* 10^8 ml⁻¹ e per *Alternaria* 10^7 ml⁻¹), sono stati sottoposti alla procedura analitica completa (estrazione, purificazione del DNA e sua amplificazione) per un numero significativo di volte (almeno 10).

Sono stati quindi confrontati i valori di Ct ottenuti (mantenendo la *threshold* sempre nello stesso punto), e calcolati i seguenti parametri:

$$\text{Media} = \bar{x}$$

$$\text{Deviazione Standard} = s_R$$

$$\text{Riproducibilità della PCR} = R = 2,8s_R$$

$$\text{Coefficiente di variazione \% (RSD)} = \frac{s}{x}$$

Il valore di riferimento con cui confrontare il risultato è < 35% (valori inferiori a 50% sono comunque accettabili) (CRL-Validation report, 15 February 2015).

3.7 Applicabilità ai vetrini di monitoraggio

E' stata testata l'applicabilità del metodo molecolare descritto ai vetrini di monitoraggio, per verificare la possibilità di effettuare un confronto tra i due metodi d'indagine (molecolare vs tradizionale).

Per raggiungere una quantità sufficiente di materiale d'interesse è stato necessario unire il raccolto (effettuato come da paragrafo 3.2) di una ventina di vetrini del monitoraggio aerobiologico. In questo modo è stato ottenuto un campione misto di partenza contenente:

- 10^6 conidi/ml
- 10^4 pollini/ml

Inoltre, è stato saggiato il raccolto da vetrini simulati (preparati come da paragrafo 3.2), contenenti diluizioni note di conidi d'interesse (10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8). Alcuni di essi sono stati colorati, lasciando a contatto con la fucsina basica il campione asciugato sul nastro per tempi diversi:

- a) contatto campione/fucsina per 2 ore circa;
- b) contatto campione/fucsina per 1 settimana.

Altri sono stati mantenuti senza colorante, per avere un campione di controllo del processo.

4 RISULTATI E DISCUSSIONI

4.1 Raccolta dei conidi da vetrini e conteggio

Il conteggio al microscopio ottico dei conidi di *Alternaria* spp. e *Cladosporium* spp. raccolti dai nastri dei vetrini di monitoraggio aerobiologico (veri o simulati) ha dato un risultato soddisfacente, in linea con i valori attesi. Pertanto si può considerare una buona metodica da utilizzare per il lavoro sperimentale.

Infatti, dopo aver ripulito i nastri con il *cell scraper*, è stata verificata, al microscopio ottico, l'assenza di materiale d'interesse residuo e i nastri sono sempre risultati idoneamente ripuliti.

Inoltre, il valore ottenuto dal conteggio dei conidi raccolti (vedi Materiali e metodi, paragrafo 3.1) è sempre risultato in linea a quello atteso che, per i vetrini di monitoraggio veri, è il dato pubblicato sul bollettino pollinico, mentre, per i vetrini simulati è il numero di conidi messi sul nastro stesso.

4.2 Estrazione DNA

4.2.1 Confronto tra due pre-trattamenti meccanici

Come è possibile vedere nella seguente tabella, per entrambi i generi fungini (*Alternaria* e *Cladosporium*) risulta efficace il pre-trattamento meccanico indicato da Pashley et al., 2012.

Il pre-trattamento con la metodica indicata da Dean et al., 2004 risulta inefficace, poiché non dà nessun segnale di amplificazione del DNA (NA).

Questo, probabilmente, è dovuto al fatto che Dean et al., 2004 cominciano la fase di estrazione a partire dal surnatante ottenuto nella fase di pre-trattamento, mentre Pashley et al., 2012 utilizzano tutto il campione. Quindi, è ipotizzabile che nel pellet scartato nella prima metodica, si perda gran parte del DNA ottenuto dalla lisi meccanica, durante il pre-trattamento con le biglie.

Micete	Conteggio conidi	Pre-trattamento	Risultati PCR (Ct) (Primers ITS)
<i>Alternaria</i>	6.3 x 10 ⁶	Dean et al., 2004	NA
	2.7 x 10 ⁶	Pashley et al., 2012	36.12
<i>Cladosporium</i>	1.6 x 10 ⁸	Dean et al., 2004	NA
	1.2 x 10 ⁸	Pashley et al., 2012	17.67

Tab.7 Risultato confronto pre-trattamenti, in cui sono stati utilizzati i due diversi protocolli per la parte di trattamento. **NA** = non amplificato.

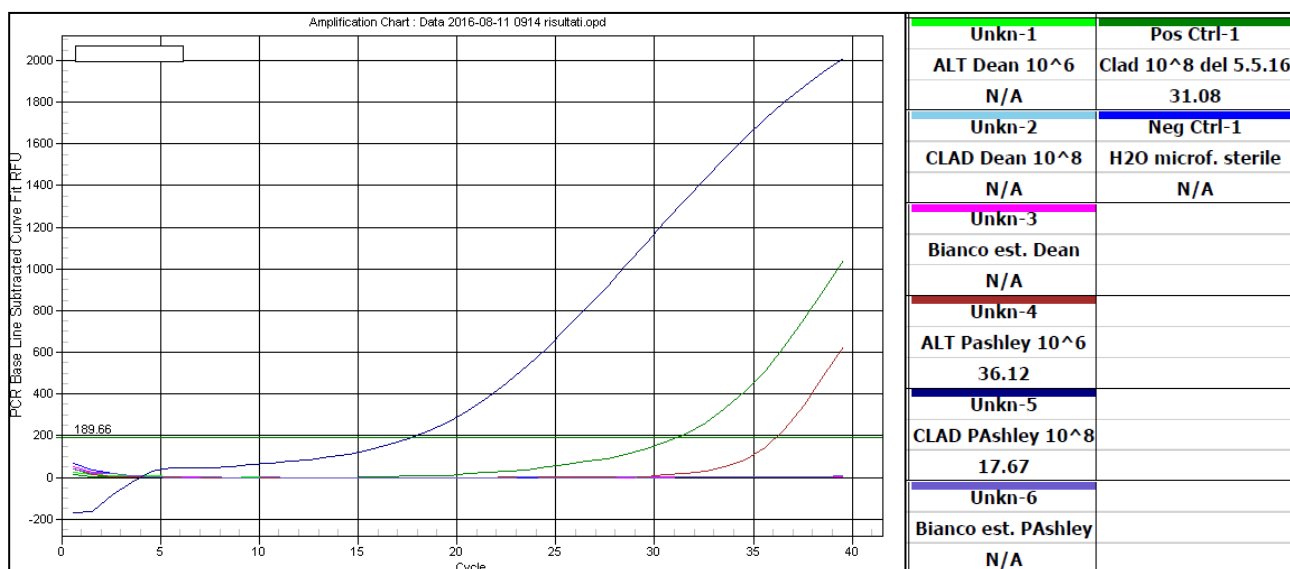


Fig. 40 Confronto (Ct) delle curve di amplificazione dei due diversi pre-trattamenti.

4.2.2 Confronto tempi di rottura meccanica

Variando i tempi del pre-trattamento meccanico con le biglie, si sono ottenuti risultati opposti tra i due miceti in esame: *Alternaria* presenta, infatti, dei Ct più bassi (DNA in quantità e/o qualità migliore) con un tempo di rottura di 2 minuti (Pashley et al., 2012), mentre con *Cladosporium* si ottengono Ct più bassi dopo un tempo di rottura di 60 minuti (Tab.8). Ciò sembra in contraddizione con quanto verrà indicato in seguito a proposito delle difficoltà di rottura della parete dei conidi di *Alternaria*. Probabilmente, aumentando i tempi di rottura meccanica, non si migliora l'efficienza del pre-trattamento, al contrario il prolungato

sfregamento con le biglie di vetro può portare ad un'eccessiva rottura e degradazione delle molecole di DNA liberate (Yamamoto et al., 2010).

Nel corso della sperimentazione è stato scelto di utilizzare il tempo indicato da Pashley (2012), sia per ottimizzare il processo di estrazione a partire da un campione misto, sia per ridurre i tempi analitici della prova.

L'ottimizzazione delle condizioni di estrazione di DNA è presumibilmente differente per i diversi generi fungini. Perciò, allo scopo di utilizzare il metodo sui vetrini del monitoraggio aerobiologico, comprendente molti conidi/spore diversi, sarebbe necessario ampliare la sperimentazione ad un maggior numero di miceti.

Le condizioni di estrazione di *Aspergillus* e *Cladosporium* sono rappresentative per la maggior parte dei conidi fungini presenti, ma conidi di grandi dimensioni, come quelli di *Alternaria alternata*, necessitano probabilmente di protocolli di estrazione differenti (es. tempi diversi, biglie di dimensioni maggiori, trattamento criogenico, ecc.) (Yamamoto et al., 2010).

Micete	Conteggio conidi	Tempi di rottura con biglie	Risultati PCR (Ct) (Primers ITS)
<i>Alternaria</i>	1.0×10^6	2 minuti	25.21
		15 minuti	27.75
		60 minuti	28.36
<i>Cladosporium</i>	1.7×10^7	2 minuti	20.67
		15 minuti	17.66
		60 minuti	11.01

Tab. 8 Risultati confronto diversi tempi di rottura meccanica (effettuata una sola prova).

I tempi di pretrattamento meccanico, quindi, sembrano influenzare il risultato dell'estrazione, ma sarebbe necessario un ulteriore approfondimento, per poter giungere a dei risultati maggiormente significativi.

Nel corso della sperimentazione, si è deciso di impiegare sempre un tempo di rottura pari a 2' (Pashley et al., 2012) sia per *Alternaria* che per *Cladosporium*.

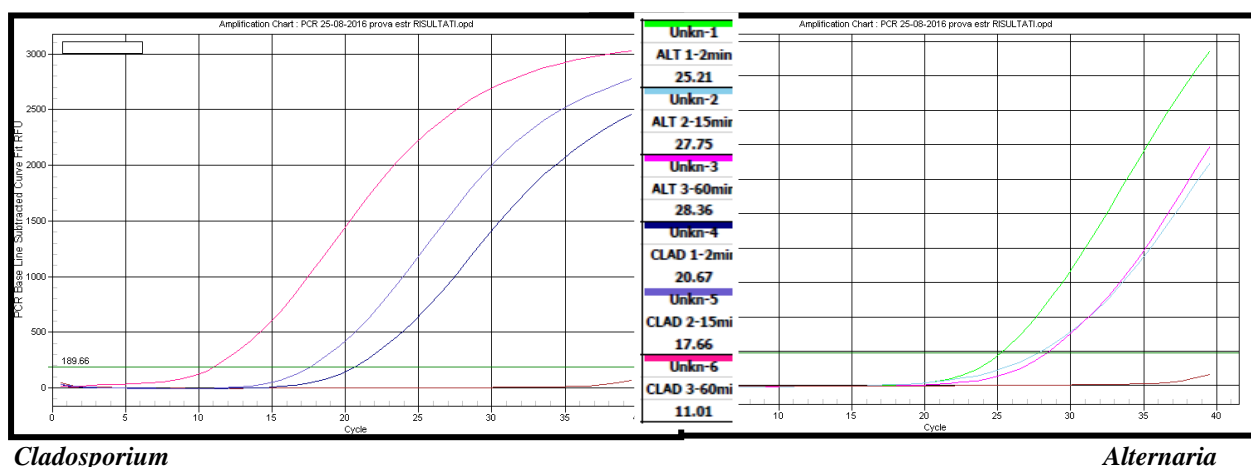


Fig. 41. Confronto curve (Ct) dei tre diversi tempi di rottura con biglie.

4.2.3 Confronto pre-trattamento a freddo del campione e stato fisiologico dei conidi

Per *Alternaria* si ottiene un'estrazione di DNA migliore dopo pre-trattamento a freddo in azoto liquido, seguito da pre-trattamento meccanico con biglie. La quantità e/o la qualità di DNA così ottenuto, verificate tramite l'amplificazione in PCR Real-time, sembrano essere migliori rispetto a quelli ottenuti con il solo pretrattamento con biglie di vetro (vedi Ct riportati in Tab. 9). Tale miglioramento non è apprezzabile quando la colonia è giovane e i conidi presentano una parete più sottile. Per *Alternaria*, dunque, sembra importante anche lo stato fisiologico dei conidi, come già indicato in letteratura da Andersen B. et al., 2006.

Bisogna sottolineare, tuttavia, che la differenza tra i Ct rilevati rimane sempre all'interno del *range* di riproducibilità del metodo. Sarebbe pertanto necessario ripetere ulteriori prove per avere un'evidenza statisticamente significativa di questo risultato.

Per *Cladosporium* non si evidenziano differenze significative con il pre-trattamento a freddo dei conidi, anzi, sembra comunque migliore l'estrazione con solo pre-trattamento meccanico con biglie di vetro. Pertanto, non sono state effettuate ulteriori prove.

Riassumendo, quindi, per *Cladosporium* sembra sufficiente la rottura meccanica con le biglie, mentre per *Alternaria* sembra necessario anche un pre-trattamento termico, con congelamento

in azoto liquido, passaggio fondamentale per permettere il rilascio del DNA nel tampone di estrazione.

Micete	N° conidi /reazione e giorni di crescita colonia	Pre-trattamento	Risultati PCR (Ct) Primers specifici	Ct ± Riproducibilità (metodo)
<i>Alternaria</i>	1.9 x 10 ⁶ a 10 giorni	biglie di vetro	23.21	23.21 ± 11.6
		biglie di vetro + azoto liquido	25.43	
	3.3 x 10 ⁶ a 15 giorni	biglie di vetro	29.01	29.01 ± 11.6
		biglie di vetro + azoto liquido	21.03	
	1.4 x 10 ⁶ a 20 giorni	biglie di vetro	28.21	28.21 ± 11.6
		biglie di vetro + azoto liquido	20.63	
<i>Cladosporium</i>	2 x 10 ⁷ a 14 giorni	biglie di vetro	20.68	20.68 ± 6.67
		biglie di vetro + azoto liquido	23.20	

Tab. 9 Confronto pre-trattamento a freddo del campione e tempo di crescita della colonia fungina.

Il metodo di pre-trattamento che si è rivelato più efficace è la combinazione di più tecniche ritrovate in letteratura, in quanto nessuna di queste, applicata singolarmente, è risultata soddisfacente. E' importante sottolineare che un'efficiente estrazione di DNA dai conidi fungini è la chiave per ottenere una sua accurata quantificazione tramite PCR real-time (Yamamoto et al., 2010).

4.2.4 Confronto tra i diversi metodi di purificazione

I passaggi successivi di purificazione del DNA, hanno lo scopo di allontanare eventuali molecole inibitrici per la PCR, associate per esempio alla parete fungina.

Un inibitore può formare dei complessi con le proteine, come la Taq-polimerasi, inibendo la PCR, oppure può legarsi al DNA target, rendendolo non utilizzabile per l'amplificazione, o ancora può interferire con il processo di lisi cellulare, necessario per l'estrazione del DNA, infine, alcune molecole contaminanti (proteine e carboidrati) legano i nucleotidi e gli ioni Magnesio, rendendoli non utilizzabili per la PCR (Keswani et al., 2005).

Ciascuno step addizionale nel processo di estrazione e purificazione del DNA, tuttavia, aumenta il tempo e la complessità della preparazione del campione e quindi è una fonte aggiuntiva di variazione dei dati.

Si può inoltre verificare una perdita di DNA, soprattutto per i campioni ambientali, caratterizzati da una concentrazione non molto elevata di conidi (bassa concentrazione campione di partenza) (Keswani et al., 2005; Yamamoto et al., 2010).

Le due modalità di purificazione saggiate hanno dato risultati diversi.

La purificazione del DNA tramite il kit (Pashley et al., 2012) sembra meno performante rispetto a quella ottenuta tramite metodica CTAB (Doyle & Doyle, 1987).

I Ct rilevati, dopo amplificazione del DNA effettuata sui campioni estratti con la prima metodica (DNeasy plant mini kit), risultano sempre più alti (DNA in quantità o qualità più bassa).

Per *Alternaria* in un caso non si è ottenuta amplificazione, per *Cladosporium*, in un caso, il Ct risulta significativamente diverso, poiché al di sopra del limite di riproducibilità del metodo (Tab.10).

Il kit di estrazione previsto da Pashley et al., 2012, quindi, non ha dato risultati soddisfacenti. Per questo motivo si è scelto di usare il CTAB (Doyle & Doyle, 1987) modificato che, pur essendo più lungo e complesso, permette di ottenere un DNA di migliore qualità.

Micete	N° conidi/reazione	Metodo di estrazione	Risultati PCR (Ct) Primers specifici	Ct ± R (metodo)
<i>Alternaria</i>	1,7 x 10 ⁶	kit (Qiagen)*	NA	19.06 ± 11.66
		CTAB	19.06	
	0.7 x 10 ⁶	kit (Qiagen)*	30.28	24.12 ± 11.66
		CTAB	24.12	
	2 x 10 ⁶	kit (Qiagen)*	32.97	23.63 ± 11.66
		CTAB	23.63	
<i>Cladosporium</i>	8.5 x 10 ⁶	kit (Qiagen)*	19.45	18.96 ± 6.67
		CTAB	18.96	
	6.0 x 10 ⁶	kit (Qiagen)*	25.12	19.29 ± 6.67
		CTAB	19.29	
	9.3 x 10 ⁶	kit (Qiagen)*	21.04	14.36 ± 6.67
		CTAB	14.36	

Tab. 10 Confronto metodi di purificazione del DNA. * DNeasy Plant mini kit (Pashley et al., 2012). NA = non amplificato

4.2.5 Efficienza di estrazione

Come già precedentemente ricordato, l'aumento del numero di passaggi durante il processo di estrazione e purificazione del DNA, pur permettendo di ottenere un acido nucleico di buona qualità, porta ad una perdita in quantità (Keswani et al., 2005). Tale perdita è stata dimostrata tramite il calcolo dell'efficienza di estrazione, paragonando i valori di concentrazione, letti allo spettrofotometro, con quanto ci si aspettava di ottenere dal numero di conidi iniziali sottoposti al processo di estrazione (vedi materiali e metodi, paragrafo 3.5.4).

	<u>Efficienza estrazione</u> $\frac{\text{massa di DNA misurato}}{\text{quantità teorica di DNA}} \times 100$	Limiti espressi in letteratura
<i>Cladosporium spp.</i>	24%	22-54% (Yamamoto et al., 2009)
<i>Alternaria spp.</i>	Non calcolabile	19% (Yamamoto et al., 2010)

Tab. 11. Risultati efficienza di estrazione per i due miceti in esame.

Calcolo quantità teorica media di DNA:

Cladosporium: $10^8 \times 0.03 = 3000000$ pg/100 µl corrispondenti a 30 µg/ml

Alternaria: $10^7 \times 0.03 = 300000$ pg/100 µl corrispondenti a 3 µg/ml

Non è stato possibile calcolare l'efficienza di estrazione per *Alternaria* poiché il limite di rilevabilità del nostro spettrofotometro (2,4µg/ml) è molto vicino alla quantità di DNA che teoricamente possiamo ricavare dai conidi che raccogliamo. Il dato ottenuto, quindi, è soggetto ad un'incertezza troppo elevata per risultare significativo.

4.3 Analisi dei risultati di PCR

4.3.1 PCR Primers ITS

L'amplificazione del DNA tramite i primers ITS, che va ad individuare una porzione di DNA comune a tutti i miceti, ha lo scopo di effettuare uno screening iniziale della presenza di DNA fungino nel campione estratto.

Il sistema da noi utilizzato ha un'efficienza molto bassa, 62,7 % per conidi di *Cladosporium* e 74.5 % per conidi di *Alternaria* (vedi Tab. 12 - Efficienza della PCR).

Sono state studiate e saggate diverse condizioni di PCR, diverse concentrazioni dei primers e protocolli termici, utilizzando la stessa Taq-polimerasi e la stessa mix di reazione, senza avere tuttavia dei miglioramenti. Dal momento che non è stato possibile ottimizzare in alcun modo le condizioni di PCR, è ipotizzabile che la bassa efficienza di amplificazione sia dovuta alla poca specificità dei primers, i quali vanno ad amplificare una sequenza troppo lunga. E' pertanto necessario rivedere il disegno della sequenza dei primers ITS.

4.3.2 PCR Primers CLAD e ALT

La PCR con i primers specifici CLAD e ALT ha dimostrato buone caratteristiche di performance. E' stata, quindi, utilizzata con successo nella sperimentazione.

4.3.3 Efficienza della PCR

I valori di **efficienza** ottenuti per CLAD e ALT si trovano sempre entro i limiti di accettabilità (90-110%), così come lo **slope** (-3.58; -3.10) e il **coefficiente di correlazione** (R^2 ideale = 1) (Tab. 12). Ciò vuol dire che tutte le condizioni di reazione sono state ottimizzate: la quantità e la qualità del DNA estratto, la concentrazione dei reattivi, la specificità dei primers, il protocollo termico.

La linearità della curva standard, insieme al fatto che la PCR opera con buona efficienza, conferma che il saggio è ben disegnato e può essere utilizzato per delle misurazioni di tipo quantitativo del DNA presente.

Primers	Efficienza (90-110%)	Slope (-3.58; -3.10)	Coefficiente di correlazione (R²)	Y-intercetta (Ct al quale si rileva 1 copy-number)
ITS su <i>Cladosporium</i>	62,7 %	-4.480	0.998	41
ITS su <i>Alternaria</i>	74.5 %	-4.137	0.990	36
CLAD (immagine 1)	92.5%	-3.516	0.999	34
CLAD (immagine 2)	104.6%	-3.216	0.998	32
CLAD (immagine 3)	96.3%	-3.413	0.996	40
ALT (immagine 4)	91.9%	-3.532	0.996	36
ALT (immagine 5)	93.8%	-3.481	0.990	45

Tab. 12 Confronto prove di efficienza PCR per i diversi primers utilizzati nello studio.

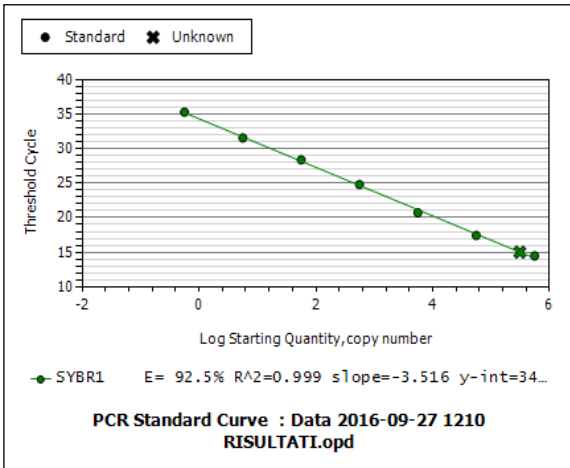


Immagine 1. 1° Curva Standard CLAD

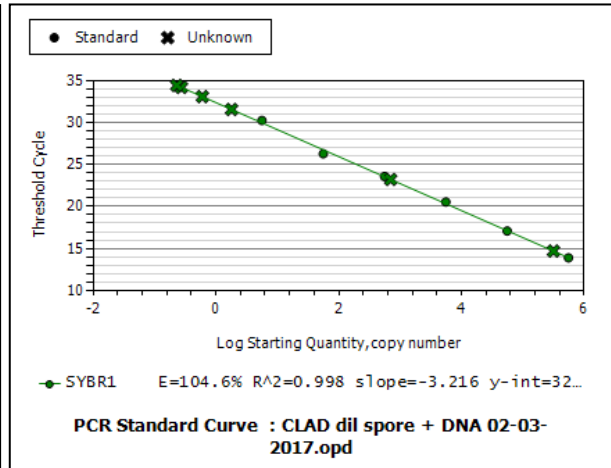


Immagine 2. 2° Curva Standard CLAD

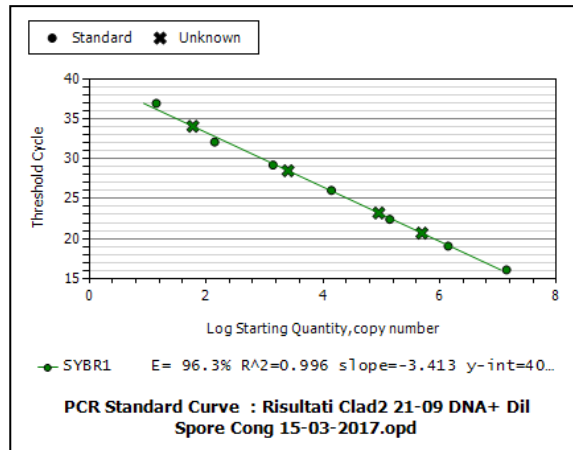


Immagine 3. 3° Curva Standard CLAD

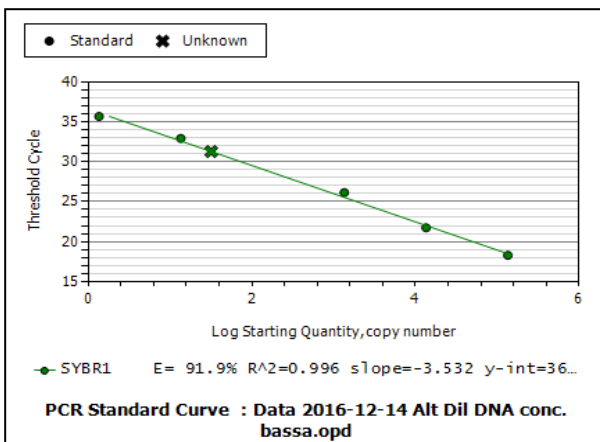


Immagine 4. 1° Curva Standard ALT

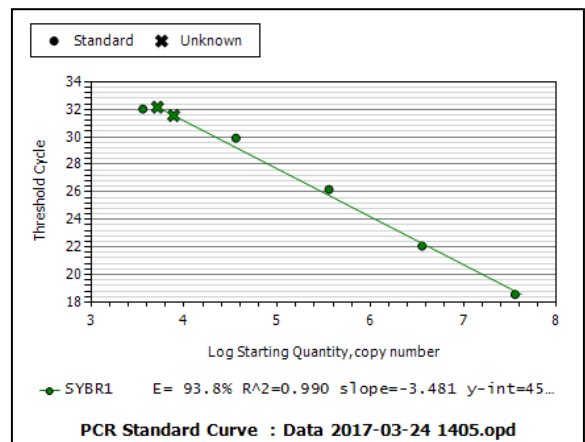


Immagine 5. 2° Curva Standard ALT

4.3.4 Ripetibilità intermedia (Riproducibilità) della PCR

I protocolli messi a punto hanno mostrato una buona ripetibilità intermedia (riproducibilità PCR), espressa in termini di coefficiente di variazione (CV%), per i primers ITS utilizzati per amplificare il DNA estratto esclusivamente da *Alternaria* e per i primers CLAD e ALT (Tab. 13 e 14). Il criterio di accettabilità è $RSD_R (CV\%) < 35\%$ (CRL-validation report, 15 february 2015).

Come già indicato, lo scopo dei primers ITS è quello di amplificare un campione misto, con DNA appartenente a diversi generi fungini. Per questo motivo, è necessario considerare la ripetibilità intermedia calcolata utilizzando tutte le PCR eseguite sia su campioni di *Alternaria* che di *Cladosporium*. In questo caso, si vede che il CV% medio è sopra il limite di accettabilità indicato ($RSD_R < 35\%$).

Per gli altri due primers (ALT e CLAD) sono stati ottenuti dei valori di ripetibilità intermedia molto al di sotto dei valori limite di accettabilità e quindi molto soddisfacenti.

Primers	Conteggio conidi estratti (conidi/reazione)	Ct medio (<i>threshold</i> = 189.66)	Dev standard (s_r)	Riproducibilità $R = 2 \times \sqrt{2} \times s_r$	CV % (s_r / Ct medio) $RSD_R < 35\%$.
ITS <i>Cladosporium</i>	5.6×10^6	6.70	4.85	13.71	72.69
ITS <i>Alternaria</i>	1.4×10^5	16.56	2.77	7.83	16.72
Valori medi calcolati utilizzando tutte le PCR eseguite su <i>Alternaria</i> e <i>Cladosporium</i>		10.50	5.5	15.63	52.63

Tab. 13. Ripetibilità intermedia per i primers ITS.

Primers	Conteggio conidi estratti (conidi/reazione)	Ct medio (<i>threshold</i> =53)	Dev standard (s_R)	Riproducibilità $R = 2 \times \sqrt{2} \times s_R$	CV % (s_R /Ct medio)
CLAD	5.6×10^6	13.44	1.61	4.55	11.98
ALT	4.8×10^5	25.79	2.26	6.40	8.77

Tab. 14. Ripetibilità intermedia per i primers specifici CLAD e ALT.

4.3.5 Sensibilità della PCR

The reaction sensitivity is different from the method sensitivity. The reaction sensitivity can be precisely defined by amount of the nucleic acid used as template (ISO 22118:2011).

Il limite teorico di rilevabilità della reazione di PCR (sensibilità) è dato dal valore di Y-intercetta (Tab. 12).

Il limite sperimentale di sensibilità (Tab. 15), rilevato nel corso della sperimentazione, per *Cladosporium* è di 0,56 *copy number* (o conidi/reazione), mentre per *Alternaria* è di 13,5 *copy number* (o conidi/reazione): entrambi i valori sono confrontabili con quelli ritrovati in letteratura. Le sequenze target amplificate sono di rDNA. Ogni conidio contiene molti ribosomi, di conseguenza le sequenze di rDNA sono presenti in più di 1 *copy-number* (Tsuge et al., 1989). Pertanto, non è sorprendente ottenere un limite di determinazione che corrisponda ad una frazione di conidi (Keswani et al., 2005).

Primer	Conidi/reazione (Copy-number)	pg DNA/reazione (genoma aploide)	Limiti letteratura
CLAD	0.56*	0.017* pg	Potenzialmente 1 conidio/reazione (0.04 pg) (Zeng et al., 2006)
ALT	13.5*	0.4* pg	75 copie di DNA (4 pg) (Andersen et al., 2006)

Tab. 15 *Valori indicativi calcolati su una sola ripetizione per livello di diluizione di DNA.

Per il primer generico ITS questi calcoli non sono stati eseguiti in quanto l'efficienza di PCR è bassa e il coefficiente di variazione (ripetibilità intermedia della reazione) è molto elevato.

4.4 Analisi dei risultati del METODO COMPLETO

4.4.1 Sensibilità del METODO

The method sensitivity is, among other thing, dependent on the efficiency of recovery of the extraction per concentration (ISO 22118:2011)

Per quanto riguarda *Cladosporium* i risultati ottenuti sono in accordo con i limiti pubblicati in letteratura sia per la sensibilità del metodo che per l'efficienza di estrazione.

Per *Alternaria*, come già riportato, non è stato possibile calcolare l'efficienza di estrazione, in quanto il limite di rilevabilità dello spettrofotometro utilizzato (2,4µg/ml) coincide con la quantità di DNA che teoricamente possiamo ricavare dalla quantità di conidi che costituiscono il campione stock di partenza.

La sensibilità del metodo per *Alternaria* risulta essere superiore rispetto a quanto riportato in letteratura (Tab. 16). Il fattore limitante per *Alternaria* risulta essere la fase di estrazione, poiché la PCR ha dimostrato delle buone caratteristiche di performance.

Una delle criticità potrebbe essere la fase di rottura della parete fungina e di liberazione del DNA nel tampone di estrazione (vedi paragrafo 4.2). A tal proposito, sarebbe necessario proseguire la sperimentazione con ulteriori prove.

	<u>Efficienza estrazione</u> <i>massa di DNA misurato x 100</i> <i>quantità teorica di DNA</i>	Limiti espressi in letteratura	<u>Sensibilità</u> (conidi/reazione)	Limiti espressi in letteratura (conidi/reazione)
<i>Cladosporium</i> spp.	24%	22-54% (Yamamoto et al., 2009)	10²	10 ³ -10 ² (Dean et al., 2004)
<i>Alternaria</i> spp.	Non calcolabile	19% (Yamamoto et al., 2010)	10⁵	10 ² (Crespo-Sempere et al., 2013)

Tab. 16 Sensibilità del metodo a confronto con i limiti ritrovati in bibliografia.

4.4.2 Riproducibilità del metodo

La riproducibilità del metodo, comprensiva di tutti i passaggi (estrazione, purificazione e amplificazione del DNA), risulta buona in termini di coefficiente di variazione (CV %). Il criterio di accettabilità indicato nel protocollo di validazione e verifica dei metodi in PCR per la ricerca di OGM è $RSD_R < 35\%$ (valori $< 50\%$ sono comunque accettabili) (CRL-validation report, 15 february 2015).

Micete	Conteggio conidi (stock)	Ct med (threshold =53)	Dev standard (s_R)	Risproducibilità $R = 2 * \sqrt{2} * s_R$	CV % ($s_R / \text{Ct medio}$)
CLAD <i>Cladosporium</i>	10^8 (5×10^6 conidi/reazione)	17.81	2.93	6.67	16.43
ALT <i>Alternaria</i>	10^7 (5×10^5 conidi/reazione)	23.94	4.17	11.66	17.40

Tab. 17 10 ripetizioni (estrazione del DNA da stock con quantità di spore uguali e successiva reazione di PCR real-time con i primers indicati).

Anche da questi risultati appare evidente la criticità nella fase di estrazione dei conidi di *Alternaria*. Infatti, benché il metodo abbia una buona riproducibilità sia per *Alternaria* che per *Cladosporium* (CV% CLAD = 16.43 e CV% ALT= 17.40), la differenza tra i Ct rilevati nei due sistemi è superiore al valore teorico atteso. Considerando che le due concentrazioni stock differiscono per 1 ordine di grandezza (10^6 conidi/reazione *Cladosporium*, 10^5 conidi/reazione *Alternaria*), dovremmo avere una differenza tra i Ct di 3,3, invece si evidenzia una differenza di circa 6 Ct (Tab. 17).

Per *Alternaria*, è necessario effettuare ulteriori prove di riproducibilità, inserendo il passaggio di congelamento in azoto liquido, prima della rottura meccanica con le biglie, che sembra dalle prove preliminari effettuare migliorare sensibilmente l'efficienza di estrazione, in termini di Ct rilevabili.

4.5 Applicazione del metodo ai vetrini di monitoraggio veri o simulati

Non si ottiene nessun segnale di amplificazione (NA) a partire dal DNA estratto dai vetrini veri né dai vetrini simulati colorati con fucsina basica, messa a contatto per almeno 1 settimana.

Al contrario, il DNA estratto dai vetrini simulati non colorati o lasciati a contatto con la fucsina basica per poche ore viene amplificato (Tab. 18).

Pertanto, l'applicabilità sui vetrini di monitoraggio non è stata dimostrata.

Il punto critico è probabilmente la presenza della fucsina basica, che potrebbe essere un inibitore della reazione di amplificazione.

	Campione	Conteggio conidi estratti	Ct
1 prova	Vetrini di monitoraggio veri	10^6	NA
2 prova	Vetrini di monitoraggio veri	10^6	NA
3 prova	Vetrini simulati - non colorati	10^8	17.17
	Vetrini simulati – FUCSINA per poche ore	10^8	19.96
4 prova	Vetrini simulati - non colorati	10^8	20.36
	Vetrini simulati - FUCSINA per poche ore	10^8	25.41
5 prova	Vetrini simulati - non colorati	10^6	22.69
	Vetrini simulati - non colorati	10^5	28.39
	Vetrini simulati – FUCSINA 1 settimana	10^6	NA
	Vetrini simulati - FUCSINA 1 settimana	10^5	NA
	Vetrini simulati - non colorati	10^7	23.23
	Vetrini simulati - non colorati	10^6	NA
	Vetrini simulati - FUCSINA 1 settimana	10^7	NA
	Vetrini simulati - FUCSINA 1 settimana	10^6	NA

Tab. 18 Risultati delle prove utilizzando i vetrini di monitoraggio veri e simulati.

5 CONCLUSIONI

L'applicazione dei metodi molecolari, per identificare e quantificare le particelle del bioaerosol degli ambienti *indoor* e *outdoor*, serve a chiarire i processi fisici, chimici e biologici che influenzano l'esposizione umana agli agenti infettivi presenti in aria.

Alcune variabili che influenzano l'accuratezza, la precisione e il limite di determinazione del metodo per la PCR del bioaerosol sono: l'efficienza di campionamento, l'efficienza associata all'estrazione del DNA, il numero di copie genomiche nel campione target, l'inibizione della PCR (dimeri di primers, ecc.) e le variabili interne allo strumento di PCR (specialmente ad una bassa concentrazione di campione iniziale) (Hospodsky et al., 2010).

I risultati presentati nel lavoro di tesi mostrano che la metodica molecolare, messa a punto nel laboratorio di biologia dell'ARPA Valle d'Aosta, comprendente l'estrazione del DNA e la sua amplificazione, applicata alle spore fungine, ha buone caratteristiche di performance. Essa ha dimostrato, infatti, buona efficienza, specificità, riproducibilità e sensibilità, in particolare per la rilevazione di *Cladosporium* spp. (10^2 conidi/reazione).

Per *Alternaria* spp. sono state rilevate alcune criticità, legate alla fase di estrazione e purificazione dell'acido nucleico. Infatti, dai risultati ottenuti, se paragonati a quelli di *Cladosporium*, si evidenzia una minor sensibilità (10^5 conidi/reazione). Dal momento che il processo di amplificazione del DNA è risultato performante, è evidente che il problema è relativo alla fase di estrazione, probabilmente legato alla maggior complessità e dimensione dei conidi fungini.

Le condizioni utilizzate per *Cladosporium* spp. non sembrano adeguate a conidi pluricellulari di grandi dimensioni (Yamamoto N. et al., 2010). E' inoltre stato dimostrato, come già indicato da Andersen B. et al., 2006, che lo stato fisiologico dei conidi di *Alternaria* influenzi l'efficienza di estrazione del DNA.

Se si vuole applicare in futuro questo metodo per la caratterizzazione e la quantificazione dei propaguli fungini aerodispersi, è senz'altro necessario proseguire la sperimentazione su *Alternaria*, ma anche su altre tipologie di conidi/spore, in modo da ottenere una metodica di estrazione del DNA applicabile ad un campione misto, che comprenda molti generi fungini.

I metodi utilizzati per la fase di amplificazione del DNA hanno invece dimostrato delle caratteristiche di performance confrontabili tra i due generi testati. Pertanto possono essere utilizzati per effettuare una PCR quantitativa.

E' da sottolineare però che, se per *Cladosporium* sono state applicate in toto le indicazioni reperite nel metodo scelto come riferimento (disegno dei primers, chimica di amplificazione, tipo di Taq-polimerasi utilizzata, protocollo termico da Zeng et al., 2006) ottenendo ottimi risultati, per *Alternaria* ciò non è stato possibile (articolo di riferimento Crespo-Sempere et al., 2013). Il metodo applicato sui campioni stock ha dato risultati di pessima qualità: nel corso delle reazioni di PCR eseguite, infatti, non si è mai ottenuto nessun segnale di amplificazione. Ciò ha comportato la necessità di effettuare prove di ottimizzazione delle condizioni di PCR, in particolare del protocollo termico. Tra l'altro, quello indicato nell'articolo si discostava sensibilmente da quanto riportato nelle istruzioni di utilizzo, fornite dal produttore della Taq, che è la stessa utilizzata nel corso della sperimentazione presentata in questa tesi (paragrafo 3.5.1).

Ciò, oltre ad aver comportato un notevole dispendio aggiuntivo in termini di tempo e lavoro, rispetto a quanto programmato, ha evidenziato come in letteratura si trovino ancora delle pubblicazioni con risultati poco chiari e attendibili (Hospodsky et al., 2010).

Per quanto concerne i primers generici di rilevazione fungina, ITS, necessari per lo screening del materiale presente nel campione, i risultati dell'amplificazione non hanno dimostrato dati di performance accettabili, tali da essere utilizzabili in un'analisi quantitativa. Questo è un altro punto da approfondire e migliorare, ad esempio tramite la scelta di primers disegnati diversamente.

L'applicabilità del metodo sui vetrini del monitoraggio aerobiologico, dopo colorazione con fucsina, non è stata dimostrata. Si è riscontrata una criticità dovuta alla colorazione con fucsina basica, che sembra inibire la reazione di PCR.

Inoltre, le esigue quantità di DNA che si possono ottenere dall'estrazione dei conidi, presenti in basse concentrazioni sui vetrini del monitoraggio aerobiologico (*range* compreso tra 10^2 - 10^4 conidi/vetrino) risultano insufficienti a garantire la riuscita dell'amplificazione con la metodica elaborata durante lo studio (vedi Limiti di sensibilità del metodo, paragrafo 4.4.1).

Probabilmente, con altri metodi di campionamento aerobiologico, si potrebbe ottenere un maggior quantitativo di spore fungine (Hospodsky et al., 2010), da utilizzare come campione di partenza per l'estrazione del DNA, ai fini di una migliore applicabilità del metodo molecolare. Tuttavia, ciò porterebbe all'impossibilità di confrontare i risultati così ottenuti con quelli del monitoraggio aerobiologico, applicato su ampia scala in Europa, e regolamentato da Norme tecniche e specifiche Linee Guida.

In conclusione, pur con le criticità precedentemente sottolineate, la metodica esposta in questa tesi rappresenta una buona base di partenza per estendere la sperimentazione ad altri tipi di spore/conidi e ad altre tipologie di analisi sul bioaerosol, come ad esempio l'effettuazione di indagini di DNA-barcoding, volte al sequenziamento delle specie rilevate, al fine di una loro identificazione specifica, piuttosto che una loro quantificazione.

6 BIBLIOGRAFIA

- Andersen B., Smedfgaard J., Jorring I., Skouboe P., Hagsholm Pedersen L “Real-time PCR quantification of the AM-toxin gene and HPLC qualification of toxigenic metabolites from *Alternaria* species from apples”. *Int. J. Food Microbiol* (2006): 111:105-111.
- Black P.N., Udy A.A., Brodie S.M. “Sensitivity to fungal allergens is a risk factor for life-threatening asthma”. *Allergy* (2000): 55(5):501-4.
- Cecchi L. “From pollen count to pollen potency: the molecular era of aerobiology”. *Eur Respir J* (2013): 42: 898-900, DOI:10.1183/09031936.00096413
- Cecchi L., D’Amato G., Ayres J.G., Galan C., Forastiere F., Forsberg B., Gerritsen J., Nunes C., Behrendt H., Akdis C., Dahl R., Annesi-Maesano I. “Projections of the effects of climate change on allergic asthma: the contribution of aerobiology”. *Allergy* (2010): 65: 1073–1081.
- Crespo-Sempere A., Estiarte N., Marin S., Sanchis V., Ramos A.J. “Propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR to quantify viable *Alternaria* spp. contamination in tomato products”. *Int. J. Food Microbiol* (2013): 165:214-220.
- D’Amato G, Chatzigeorgiou G, Corsico R, Gioulekas D, Jäger L, Jäger S, Kontou-Fili K, Kouridakis S, Liccardi G, Meriggi A, Palma-Carlos A, Palma-Carlos ML, Pagan Aleman A, Parmiani S, Puccinelli P, Russo M, Spieksma FTM, Torricelli R, Wuthrich B “Evaluation of the prevalence of prick skin test positively to *Alternaria* and *Cladosporium* in patients with suspected respiratory allergy”. *Allergy* (1997): 52:711–716
- D’Amato G, Spieksma FTM “Aerobiologic and clinical aspects of mould allergy in Europe”. *Allergy* (1995): 50:870–877
- Dean TR, Betancourt D, Menetrez MY. “A rapid DNA extraction method for PCR identification of fungal indoor air contaminants”. *J. Microbiol. Methods* (2004): 56:431-434.
- Dean TR, Roop B, Betancourt D, Menetrez MY. “A simple multiplex polymerase chain reaction assay for the identification of four environmentally relevant fungal contaminants”. *Journal of Microbiological Methods* (2005): 61. 9 – 16
doi:10.1016/j.mimet.2004.10.015
- Denning DW, Pashley C, Hartl D, Wardlaw A, Godet C, Del Giacco S, et al. “Fungal allergy in asthma-state of the art and research needs”. *Clin Transl Allergy* (2014): 4:14. doi: 10.1186/2045-7022-4-14.
- Di Filippo P., Riccardi C., Pomata D. “Procedura sperimentale per la determinazione di spore fungine nell'atmosfera”. INAIL (2016): isbn 978-88-7484-521-7
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. “A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue”. *Phytochemical Bulletin* (1987): 19: 11-15.

- Downs S.H., Mitakakis T.Z., Marks G.B., Car N.G., Belousova E.G., Leüppi J.D., Xuan W. “Clinical importance of *Alternaria* exposure in children”. *Am J Respir Crit Care Med* (2001): 164:455–459
- Elbert W., Taylor P. E., Andreae M. O. and Pöschl U. “Contribution of fungi to primary biogenic aerosols in the atmosphere: wet and dry discharged spores, carbohydrates and inorganic ions”. *Atmos. Chem. Phys* (2007): 7:4569-4588
- Enciclopedia Medica Italiana USES, 1985
- Escuredo O., Seijo M.O., Fernandez-Gonzalez M., Iglesias I. “Effect of meteorological factors on the levels of *Alternaria* spores on a potato crops”. *Int J Biometeorol* (2011): 55:243–252
- Fernandez R., Blanca M. “Amplificazione delle regioni ITS1 e ITS2 per l’identificazione di muffe di interesse clinico”. Lavoro di diploma, Formazione Tecnico in Analisi Biomediche SSS, (2007) Scuola Superiore Medico Tecnica, Locarno Lavoro svolto presso Istituto Cantonale di Microbiologia, Bellinzona
- Frenguelli G. “Le esperienze di monitoraggio degli aeroallergeni in Europa”. (2013): Bologna, cambiamento climatico, pollini e salute.
- Gardes M., Bruns T.D. “ITS primers with enhanced specificity for *basidiomycetes*--application to the identification of mycorrhizae and rusts”. *Mol. Ecol.* (1993): 2:113-8.doi: 10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x
- Grube S, Schönling J ,Prange A. “Evaluation of a triplex real-time PCR system to detect the plant-pathogenic molds *Alternaria* spp., *Fusarium* spp. and *C. purpurea*”. *Journal of Microbiological Methods* (2015): 119 (2015) 180–188
- Hirst J.M. “An automatic volumetric spore trap”. *Ann Appl Biol* (1952): 39:257-265
- Hospodsky D., Yamamoto N., Peccia J. “Accuracy, Precision, and method detection limits of quantitative PCR for airborne bacteria and fungi”. *App. Environ. Microbiol* (2010): 76: 7004-7012
- Humpherson-Jones F.M. “Survival of *Alternaria brassicae* and *Alternaria brassicicola* on crop debris of oilseed rape and cabbage”. *Ann Appl Biol* (1989): 115:45–50
- Invitrogen. “Real-Time PCR: From theory to practice”. HandBook (www.invitrogen.com)
- Jones A. M., Harrison R.M. “The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations-a review”. *Elsevier* (2003): DOI:10.1016/j.scitotenv.2003.11.021
- Kasprzyk I., Rodinkova V., Šaulienė I, Ritenberga O., Grinn-Gofron A., Nowak M., Sulborska A., Kaczmarek J., Weryszko-Chmielewska E., Bilous E, Jedryczka M. “Air pollution by allergenic spores of the genus *Alternaria* in the air of central and eastern Europe”. *Environ Sci Pollut Res* (2015): 22:9260–9274 DOI 10.1007/s11356-014-4070-6
- Kasprzyk I., Rzepowska B., Wasylow M. “Fungal spores in the atmosphere of Rzeszow (South-East Poland)”. *Ann Agric Environ Med* (2004): 11:285–289

- Katotomichelakis M., Nikolaidis C., Makris M., Proimos E., Aggelides X., Constantinidis T.C., Papadakis C.E., Danielides V. “*Alternaria* and *Cladosporium* calendar of Western Thrace: Relationship with allergic rhinitis symptoms”. *Laryngoscope. Feb* (2016) :126(2):E51-6. doi: 10.1002/lary.25594.
- Keswani J., Kashon M. L., Chen B.T. “Evaluation of interference to conventional under real-time PCR for detection and quantification of fungi in dust”. *J. Environ. Monit.* (2005): 7:311-318
- Kim H.K., Lund S., Baum R., Rosenthal P., Khorram N., Doherty T.A. “Innate type 2 response to *Alternaria* extract enhances ryegrass-induced lung inflammation”. *Int. Arch. Allergy Immunol.* (2014): 163(2):92-105. doi: 10.1159/000356341
- Knutsen A.P., Bush R.K., Demain J.G., Denning D.W., Dixit A., Fairs A., Greenberger P.A., Kariuki B., Kita H., Kurup V.P., Moss R.B., Niven R.M., Pashley C.H., Slavin .RG., Vijay H.M., Wardlaw A.J. “Fungi and allergic lower respiratory tract diseases”. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2012): 129:280-91 doi:10.1016/j.jaci.2011.12.970
- Kołodziejczyk K, Bozek A. “Clinical Distinctness of Allergic Rhinitis in Patients with Allergy to Molds”. *Biomed Res Int.* (2016):3171594. doi: 10.1155/2016/3171594.
- La Placa. (2001) “Principi di microbiologia medica”. Società Editrice ESCULAPIO, Bologna
- Lafontaine, Tollervey. (2001) “Ribosomal RNA”, Encyclopedia of life Sciences. www.els.net
- Laube I, Hird H, Brodmann P, Ulmann S, Shone-Michling M, Chisholm J, Broll H. “Development of primer and probe sets for the detection of plant species in honey”. *Food Chemistry* (2010); 118: 979–986
- Licorish K., Novey H.S., Kozak P., Fairshter R.D., Wilson A.F. “Role of *Alternaria* and *Penicillium* spores in the pathogenesis of asthma”. *J. Allergy Clin. Immunol.* (1985) 76:819–825
- Lodish et al. *Biologie moléculaire de la cellule.* (1997): 3° ed. De Boeck Université, Bruxelles.
- Marcer G. “L'allergia alle muffe”. (2012): Arpav N. 7
- Maya-Manzano J.M., Fernandez-Rodriguez S., Hernandez-Trejo F., Diaz Perez G., Gonzalo-Garijo A., Silva-Palacios I., Munoz-Rodriguez A.F., Tormo-Molinia R. “Seasonal Mediterranean patterns for airborne spores of *Alternaria*”. *Aerobiologia* (2012): 28:515–526
- Meklin T., Haugland, R.A., Reponen, T., Varma, M., Lummus, Z., Bernstein, D., Wymer, L.J., Vesper, S.J. “Quantitative PCR analysis of house dust can reveal abnormal mold conditions”. *J. Environ. Monit.* (2004): 6, 615 – 620.
- Mikaliūnaitė R., Kazlauskas M., Veriankaitė L. “Prevalence peculiarities of airborne *Alternaria* genus spores in different areas of Lithuania”. *Sci Works Lith Inst Horticult Lith Univ Agric* (2009): 28:135–143

- Müller-Germann I., Vogel B., Vogel H., Pauling A., Fröhlich-Nowoisky J., Pöschl U., Després V.R. “Quantitative DNA Analyses for Airborne Birch Pollen”. (2015) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140949>
- Nikkels A.H., Terstege P., Spijksma F.T.M. “Ten types of microscopically identifiable airborne fungal spores at Leiden, The Netherlands”. *Aerobiologia* (1996): 12:107–112
- Oliveira M., Ribeiro H., Delgado J.L., Abreu I. “The effects of meteorological factors on airborne fungal spore concentration in two areas differing in urbanisation level”. *Int J Biometeorol* (2009): 53:61–73
- Pashley C.H., Fairs A., Free R.C., Wardla A.J. “DNA analysis of outdoor air reveals a high degree of fungal diversity, temporal variability, and genera not seen by spore morphology”. *Fungal Biology* (2012): 116 : 2014-224
- Pavón M.A., Gonzalez I., Pegels N., Martin R., Garcia T. “PCR detection and identification of *Alternaria* species-groups in processed foods based on the genetic marker Alt A1”. *Food Control* (2010): 21:1745-1756.
- Rapiejko P., Lipiec A., Wojdas A., Jurkiewicz D. “Threshold pollen concentration necessary to evoke allergic symptoms”. *Int Rev Allergol Clin Immunol* (2004): 10(3):91–94
- Rapiejko P, Piekosz-Orzechowska B., Jurkiewicz D. “Assessment of Polish physicians' therapy behaviour and patterns of prescribing antihistaminic medicines in day-to-day outpatient care”. *Otolaryngol Pol.* (2009): 63(6):509-12. doi: 10.1016/S0030-6657(09)70170-2.
- Sabariego S., Bouoso V., Pérez-Badia R. “Comparative study of airborne *Alternaria* conidia levels in two cities in Castilla-La Mancha (central Spain), and concentrations with weather-related variables”. *Ann Agric Environ Med* (2012): 19:227–232
- Sanchez H., Bush R.K. “A review of *Alternaria alternata* sensitivity”. *Rev Iberoam Micol* (2001): 18:56–59
- Simmons E.G. “*Alternaria*—an identification manual”. CBS Biodiversity—book 6. *ASM Press, Washington* (2008): ISBN-10:9070351684
- Tonge D.P., Pashley C.H., Gant T.W. “Amplicon-based metagenomic analysis of mixed fungal samples using proton release amplicon sequencing”. *PLoS ONE* (2014):9 (4) :e 93849. doi: 10.1371/journal.pone.0093849
- Tsuge T., Kobayashi H., Nishimura S. *Curr. Genet.*, (1989) 16
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. “PCR protocols . Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics”. (1990). doi:10.1016/b978-o-12-372180-8.50042-1
- Woudenberg J.H.C., Groenewald J.Z., Binder M., Crous P.W. “*Alternaria* redefined”. *Stud Mycol* (2013): 75:171–212
- Wu Z., Wang X.R., Blomquist G. “Evaluation of PCR primers and PCR conditions for

specific detection of common airborne fungi”. *J. Environ. Monit.* (2002): 4, 377 – 382.

Yamamoto N., Kimura M., Matsuki H., Yanagisawa Y. “Optimization of a real-time PCR assay to quantitate airborne fungi collected on a gelatin filter”. *J. Biosci. Bioeng.* (2010): 109: 83-88

Yamamoto N., Matsuzaka Y., Kimura M., Matsuki H., Yanagisawa Y. “Comparison of dry- and wet-based fine bead homogenization to extract DNA from fungal spores”. *J. Biosci. Bioeng.* (2009): 107: 464-470.

Zeng Q.Y., Westermark S.O., Rasmuson-Lestander A., Wang X.R. “Detection and quantification of *Cladosporium* in aerosols by real-time PCR”. *J. Environ. Monit.* (2005): 8:153-160.

Sitografia:

www.arpa.vda.it

www.arpae.it

www.bayergarden.it

www.biodeterioramento.it

www.molecularlab.it

www.mycobank.org

<http://dyes.gene-quantification.info/>

<http://www.isprambiente.gov.it>

Normative:

D.lgs. 81/08 Testo unico sulla salute e sicurezza sul lavoro

ISO 22118:2011 Microbiology of food and animal feeding stuffs- Polymerase chain reaction (PCR) for the detection and quantification of food-borne pathogens – Performance characteristics.

ISO 22119:2011 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Real-time polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens -- General requirements and definitions

ISO 22174:2005 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens -- General requirements and definitions

ISO/TR 13843:2000 Water Quality _ Guidance on validation of microbiological methods.

UNI CEN/TS 16868:2015 Sampling and analysis of airborne pollen grains and fungal spores

for allergy networks – Volumetric Hirst method.

UNI EN 13098:2002 Atmosfera nell'ambiente di lavoro - Linee guida per la misurazione di microrganismi e di endotossine aerodispersi.