



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI CAGLIARI

Dipartimento di Scienze Chirurgiche-Laboratorio di Biologia Molecolare
Responsabile Prof. Germano Orrù

PROGETTO CLUSTER TOP DOWN- POR FESR 2014-2020

Titolo:

Sistemi di Monitoraggio Rapido della Qualità e dell'idoneità Igienico-sanitaria di prodotti di IV Gamma, per l'individuazione e la gestione in tempo reale delle criticità lungo la filiera produttiva.

Acronimo: RealTimeCheckIVGamma

Responsabile scientifico: Dr. Antonio Barberis

Responsabile Unità Operativa – Università di Cagliari: Prof. Germano Orrù

Relazione attività operativa Dott.ssa Sara Fais , dal 3 11 2020 al 3 -02-2021.

La sottoscritta Fais Sara, codice fiscale FSASRA79B56B354W, nata a Cagliari il 16/02/1979, Partita Iva n. 03898090927, indicato come "Collaboratore

Descrizione e panoramica dei risultati ottenuti nell'ambito dell'attività : **Metodiche di Biologia molecolare, Bioinformatica e Microbiologia per lo studio del microbioma di matrici vegetali, con particolare riferimento al settore degli ortofrutticoli di IV gamma"**

Descrizione attività e panoramica dei risultati ottenuti.

È stata svolta attività di laboratorio per la progettazione di un *Molecular Beacon Array* per il rilevamento rapido dei principali microorganismi di interesse igienico-sanitario riscontrati nei vegetali di IV Gamma. Una parte della procedura è stata messa a punto attraverso esperimenti di ricostruzione.

Negli intenti del progetto si dovrà disporre di un'analisi veloce e specifica, basata

sull'utilizzo di sonde oligonucleotidiche Molecular Beacon. Il dispositivo dovrà essere utilizzabile nei vari punti della filiera e dovrà valutare: (i) il grado di contaminazione batterica totale (ii) la presenza o/e il titolo di patogeni chiave come *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7(1, 2).

L'analisi molecolare per patogeni alimentari nei prodotti vegetali non è di semplice attuazione, sia per l'aspetto intrinseco del materiale biologico a volte problematico per l'estrazione del DNA, sia per la necessità di disporre di metodi a diversa selettività. Per esempio nel caso di *E. coli* O157:H7 risulta cruciale disporre di un metodo altamente

specifico nell'ambito della specie, al contrario per *Salmonella spp.* è richiesto disporre di un sistema capace di rilevare più specie all'interno del genere (3).

Innanzitutto, una delle condizioni *sine qua non* sono rappresentate dalle prime fasi analitiche come la raccolta del materiale e l'estrazione del DNA. La raccolta del campione biologico (a cura spesso dell'operatore aziendale) deve essere eseguita in modo asettico, evitando le contaminazioni ambientali, in particolare quelle del terreno. Risulta necessario altresì evitare la presenza di sostanze inibenti la reazione della polimerasi che potrebbero portare ad una sottostima delle cariche microbiche presenti nel campione. In questo contesto l'operatore aziendale dovrebbe evitare prelievi subito dopo l'utilizzo di concimi o l'uso di anticrittogamici, nel frattempo le procedure di laboratorio devono dotarsi di controlli interni atti a rilevare possibili inibitori della PCR.

In quest'ambito della fase progettuale, è stato fondamentale sviluppare dei procedimenti atti ad ottimizzare le fasi analitiche e preanalitiche sopra esposte. Nel suo complesso il lavoro svolto si può dividere nelle seguenti fasi operative:

- ✓ Realizzazione di un sistema per il prelievo e la conservazione del campione.
- ✓ Valutazione in laboratorio di un sistema di estrazione del DNA per prodotti vegetali.
- ✓ Validazione di un real-time PCR per la valutazione della carica batterica totale.
- ✓ Progettazione di sonde Molecular beacon per:
 - E. coli H157*
 - Salmonella spp.*
 - Lysteria monocytogenes*

Realizzazione di un sistema per il prelievo e la conservazione del campione

Le modalità di prelievo dei campioni saranno descritte nel manuale operativo per gli operatori aziendali e in una video-lezione esplicativa.

In diverse realtà aziendali, un servizio di stoccaggio a freddo per campioni biologici vegetali potrebbe essere inesistente. Si ritiene perciò l'uso di un mezzo di conservazione alternativo. Altri metodi di conservazione per campioni ambientali per l'analisi del DNA microbico includono l'essiccazione su varie matrici (DNA carte, tamponi) o sistemare i campioni in conservanti liquidi (ad es. cloroformio / fenolo / alcool isoamilico, TRIzol, etanolo). Queste metodologie eliminano la necessità di celle frigorifere, tuttavia, aggiungono spese e requisiti di autorizzazione per componenti chimici pericolosi e il recupero del DNA microbico intatto spesso può essere non ottimale quantitativamente e qualitativamente (4).

Durante la sperimentazione alla base del sistema, è stata realizzata una soluzione atta a mantenere intatto il DNA diverse settimane, a temperatura ambiente e con reattivi poco tossici e costosi. Il metodo già sperimentato da Lisa A May *et al.*, per sugne e coralli è stato modificato in questo progetto per i prelievi da campioni di IV gamma. https://www.coris.noaa.gov/activities/dmso_edta_microbial_dna/

Dopo diverse prove la soluzione di mantenimento era costituita da una soluzione 10 mM Tris-1mM EDTA (TE, pH 8.0) contenente il 20% di DMSO puro. Alternativamente è stato valutato anche un tampone commerciale della Sigma Aldrich (Tris EDTA Buffer solution pH 8) con risultati comparabili. La soluzione stabilizzante è stata aliquotata all' interno di una provetta di tipo Falcon™ 50 mL. Questo metodo evita lo stoccaggio dei prelievi in celle frigorifere e permette nel contempo la conservazione del materiale nelle strutture aziendali prima dell'analisi molecolare, Fig. 1.

Il contenitore può contenere 2 gr di prelievo vegetale e 20 mL di soluzione conservante.

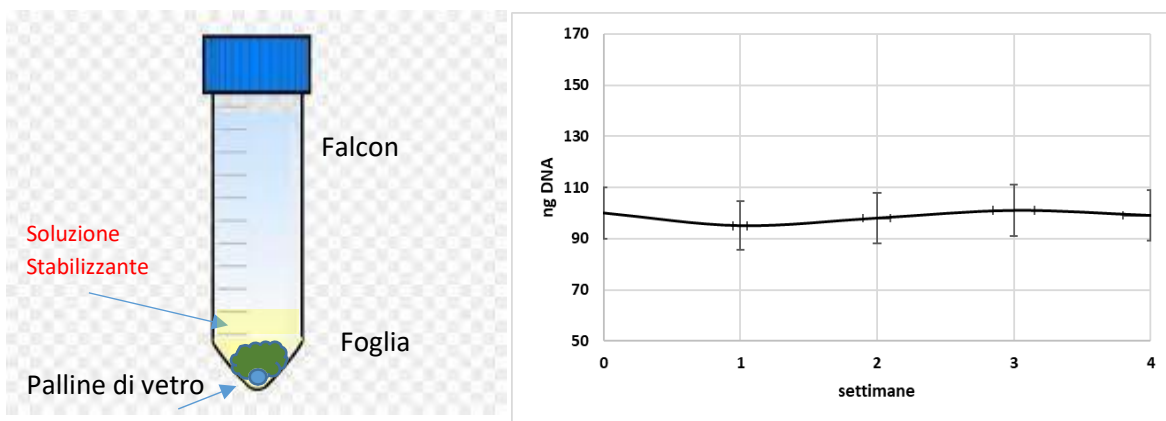


Fig. 1. Schema della soluzione di stoccaggio per prelievi da prodotti di IV gamma e curva di stabilità del DNA di *E. coli*. (media di 4 prelievi). Prima dell'estrazione il contenuto è stato opportunamente vortexato. In questo modo veniva meglio omogenizzato il materiale vegetale.

Nella figura 1 è rappresentata anche la curva di stabilità di una sospensione di DNA di *E. coli*, si evince che la quantità del DNA rimane pressoché costante dopo 4 settimane dal prelievo.

Valutazione in laboratorio di un sistema di estrazione del DNA per prodotti vegetali di IV gamma.

Diversi autori hanno evidenziato difficoltà nell' estrazione di DNA microbico da prodotti vegetali, sia per un fattore dovuto alla probabile bassa carica batterica presente nei prodotti di mercato, sia per la presenza di sostanze interferenti in grado di invalidare per esempio la fase di separazione degli acidi nucleici.

Nella fase sperimentale sono state valutate due procedure di estrazione:

- (i) Kit commerciale *geneproof DNA isolation Kit* (www.geneproof.com) validato per l'estrazione di DNA genomico da tessuti biologici.
- (ii) (una procedura home made a basso costo, sistema CTAB, già indicato in letteratura come metodo per estrazione da vegetali ma, opportunamente modificato nel nostro laboratorio per i prodotti di IV gamma (5-7).

Lo scopo di valutare diverse procedure di estrazione è, a parità di efficienza estrattiva, di ridurre i costi dell'analisi molecolare che allo stato attuale risultano elevati, impedendo di fatto lo screening massivo nelle aziende al fine di isolare/identificare possibili lotti contaminati.

Mentre per il metodo commerciale è stata utilizzata la procedura standard, consigliata dal produttore. Per tessuti biologici, il metodo CTAB è stato adattato alla tipologia del campione analizzato.

La procedura *home-made* consisteva delle seguenti fasi operative, Tabella I

Tab. I. Procedura di estrazione del CTAB utilizzata nel nostro studio.

1. Prelevare 400 µl circa di materiale
2. Aggiungere 4-5 palline di quarzo
3. Congelare e scongelare il campione da -20 °C a 20 °C,.
4. Vortexare
5. Aggiungere 75 µl di SDS/ Proteinasi K e mettere il tutto ad incubare per 1 ora a 65 °C.
6. Aggiungere 100 µl di NaCl (5 M).
7. Aggiungere 100 µl di CTAB/NaCl preriscaldato a 65 °C, vortexato delicatamente e incubare a 65 °C per 30'.
8. Aggiungere 750 ul di Cloroformio/Alcool Isoamilico (24/1), si centrifuga 5' a 12.000 rpm.

9. Si preleva il DNA dalla fase liquida superiore, dalle due presenti nella provetta, stando attenti a non prelevare del materiale dall'interfaccia bianca, si trasferisce in una provetta ghiacciata a -20 °C. Versare all'interno della provetta 450 µl di Isopropanolo freddo (tenuto a -20 °C), agitare a mano.
10. Incubare il tutto a -20°C per almeno 2 ore
11. Centrifugare a 12.000 rpm per 15'.
12. Eliminare il soprannatante,
13. Eseguire un lavaggio del pellet con 100 µl di etanolo al 70° (facendo attenzione a non staccare il pellet dalla parete della provetta).
14. Risospendere il DNA aggiungendo TRIS/HCl pH>8. (La quantità dipendeva dal pellet iniziale se elevata 50 µl se nullo 10 µl)
15. Vortexare per uniformare la sospensione.

L'analisi dell'estratto, eseguito con il metodo fluorescente Qbit ha rilevato, in tutti i campioni, una concentrazione superiore a 100 ng/mL, risultati analoghi sono stati ottenuti (con valori di lettura leggermente superiori) con il sistema Nanodrop™ (Thermo Scientific). Il rapporto 260/260 risultava nettamente migliore con il sistema CTAB rispetto al sistema commerciale (1.78 vs 1.65 come media).

Validazione di una real time PCR per la valutazione della carica batterica totale.

La procedura di estrazione è stata valutata con la real time PCR utilizzando il composto intercalante SYBR-Green. I primer utilizzati sono stati disegnati nella regione costante del gene 16S rRNA batterico. Allo scopo, sono state utilizzate foglie contaminate con quantità scalari di: *Escherichia coli* ATCC 7075 (da $1 \cdot 10^6$ a $1 \cdot 10^2$ CFU/mL). È stata osservata positività per tutti i campioni, ad indicare una buona sensibilità del metodo in esame. Per la reazione di PCR è stato utilizzato il Kit Takara RR039A (Clontech) su termociclatore Light Cycler II, il volume finale di reazione era 20 µl e conteneva: 4 mM MgCl₂, 1 µM di ciascun primer (OG33-OG123) e 2 µl di estratto di DNA. Il programma utilizzato per la PCR era il seguente: (i) denaturazione a 95 ° C per 30 sec, (ii) 40 cicli di 0 sec a 95 ° C, 10 sec a 50 ° C, 12 sec a 72 °

C, (iii) curva di melting eseguita per 0 secondi a 95°C, poi un passaggio da 45 °C a 95 ° C
Le velocità di transizione erano 5 ° C / s. Durante l'ottimizzazione iniziale, gli ampliconi sono stati analizzati tramite corsa su gel d' agarosio per garantire la corretta dimensione del prodotto campione e dall'analisi del picco di melting, infatti la reazione positiva mostrava un picco a 90 °C T_m .

Oligonucleotidi utilizzati

- ✓ Bt forward (5'-GACTACCAGGGTATCTAATC-3')
- ✓ Bt reverse (5'-AGCAGCCGCGGTAATA-3')

La curva di fluorescenza è mostrata nella figura 2.

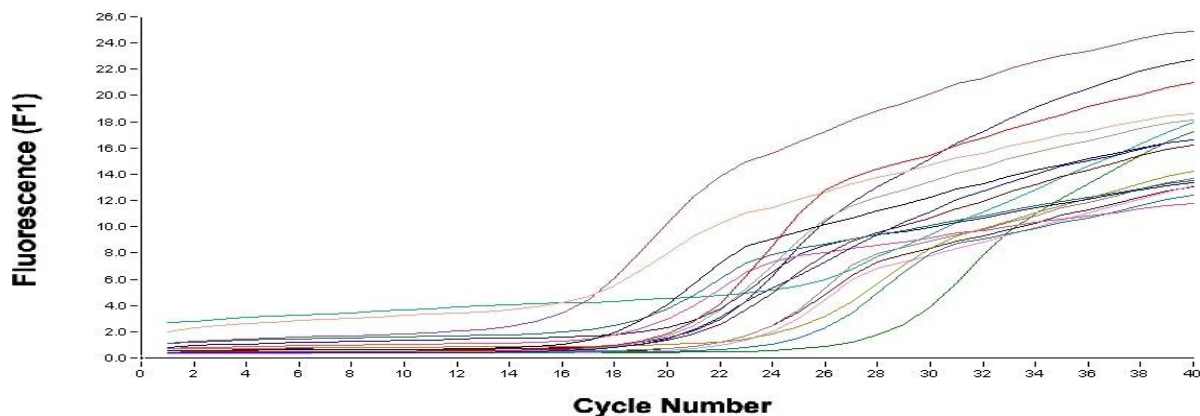


Fig. 2. Curva di fluorescenza ottenuta con DNA estratti da prodotti di IV gamma previamente contaminati con *E. coli*.

E' stata poi calcolata l'efficienza della PCR con la seguente formula : $E = (10^{(-1/slope)} - 1) * 100$

Dove per *slope* si intende il coefficiente angolare della retta di regressione, ottenuta rapportando il Ciclo soglia CT (di inizio crescita fluorescenza) con il log della concentrazione del DNA a titolo noto dei diversi estratti. In questo caso l'efficienza risulta essere del 99%. La reazione presenta anche un buon grado di linearità $R^2 = 0.98$, a sostegno del metodo di estrazione utilizzato.

In conclusione, l'attività ha premesso di validare le procedure di prelievo e di estrazione del DNA per l'analisi microbiologica molecolare da utilizzare nei prelievi da prodotti di IV gamma.

Disegno dei Molecular beacon

I molecular beacon (MB) , sono sonde nucleotidiche conformate ad ansa, figura 3. Essi consistono di una parte centrale “loop” omologa al bersaglio da rilevare, nel nostro caso una porzione di sequenza del patogeno in esame, e di due sequenze ripetute invertite di circa 5 nucleotidi “stem”. All’ estremità 5’ dello “stem” è legato un fluoroforo, mentre nella posizione 3’ un “quencher”, in assenza di bersaglio la molecola è nella sua conformazione chiusa, con le sequenze ripetute-invertite ibridate fra loro, in questa conformazione il fluoroforo è schermato dal “quencher” se il MB si lega al bersaglio ne consegue un cambiamento conformazionale con il fluoroforo non più schermato e quindi fluorescente. Queste sonde presentano elevata specificità e possono discriminare un bersaglio che contiene una sola base mutata, questo aspetto impedisce la rilevazione di falsi positivi. In questa fase progettuale i MB sono stati disegnati seguendo la procedura pubblicata da Orrù et al (8). Le specie batteriche e le sequenze bersaglio sono indicate nella Tabella II

Tabella I. Target genomici utilizzati per il disegno dei molecular beacon.

Specie batterica	Sequenza bersaglio	Accession number	Tm molecular beacon
<i>E. coli</i> O157:H7	<i>eaeA gene</i>	U38618.1	64°C
<i>Salmonella spp.</i>	<i>sdiA gene</i>	AE014613.1	65,3°C
<i>Lysteria monocytogenes</i>	<i>InIA gene</i>	EF445937.1	62°C

Le condizioni PCR erano le stesse di quella già descritta per la carica batterica totale. In 20 µl di reazione venivano aggiunti 4 µl di una sospensione di MB 100 pmoli/ µl. I Molecular beacon contenevano FAM come reporter e BHQ1 come quencher. Primer e sonde sono stati ordinati alla Europhins genomics (MWG).

La figura 3 mostra: (i) la curva di fluorescenza ottenuta con MB per *E. coli* O157:H7, (ii) lo schema di un MB.

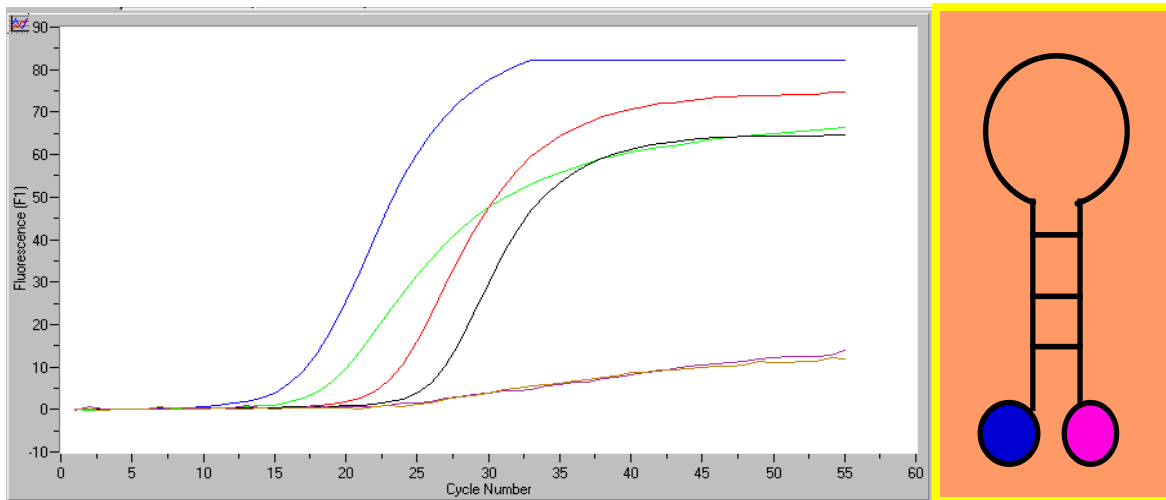


Fig.3. curva di fluorescenza ottenuta con real time PCR utilizzando concentrazioni scalari di *E. coli* O157:H7

Per tutte le specie batteriche testate la specificità si attestava tra e $5 \cdot 10^2$ e $4 \cdot 10^3$ genomi/ul.

Bibliografia

1. Wang Y, Salazar JK. Culture-Independent Rapid Detection Methods for Bacterial Pathogens and Toxins in Food Matrices. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 2016;15(1):183-205.
2. Schoder D, Strauss A, Szakmary-Brandle K, Stessl B, Schlager S, Wagner M. Prevalence of major foodborne pathogens in food confiscated from air passenger luggage. *International journal of food microbiology*. 2015;209:3-12.
3. Cortez AL, Carvalho AC, Ikuno AA, Burger KP, Vidal-Martins AM. Identification of *Salmonella* spp. isolates from chicken abattoirs by multiplex-PCR. *Research in veterinary science*. 2006;81(3):340-4.
4. Hummon AB, Lim SR, Difilippantonio MJ, Ried T. Isolation and solubilization of proteins after TRIzol extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. *BioTechniques*. 2007;42(4):467-70, 72.
5. Siegel CS, Stevenson FO, Zimmer EA. Evaluation and comparison of FTA card and CTAB DNA extraction methods for non-agricultural taxa. *Applications in plant sciences*. 2017;5(2).
6. Attitalla IH. Modified CTAB method for high quality genomic DNA extraction from medicinal plants. *Pakistan journal of biological sciences : PJBS*. 2011;14(21):998-9.
7. Springer NM. Isolation of plant DNA for PCR and genotyping using organic extraction and CTAB. *Cold Spring Harbor protocols*. 2010;2010(11):pdb prot5515.
8. Orru G, Ferrando ML, Meloni M, Liciardi M, Savini G, De Santis P. Rapid detection and quantitation of Bluetongue virus (BTV) using a Molecular Beacon fluorescent probe assay. *Journal of virological methods*. 2006;137(1):34-42.

Si attesta che l'attività e le procedure descritte in questa relazione sono conformi agli obiettivi e alle funzioni richieste nel contratto della Dott.ssa Sara Fais

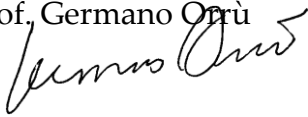
Cagliari 27-01-2021

Dott.ssa Sara Fais



Il responsabile dell'Unita Operativa

Prof. Germano Orrù



Il responsabile Scientifico del progetto

Dr. Antonio Barberis