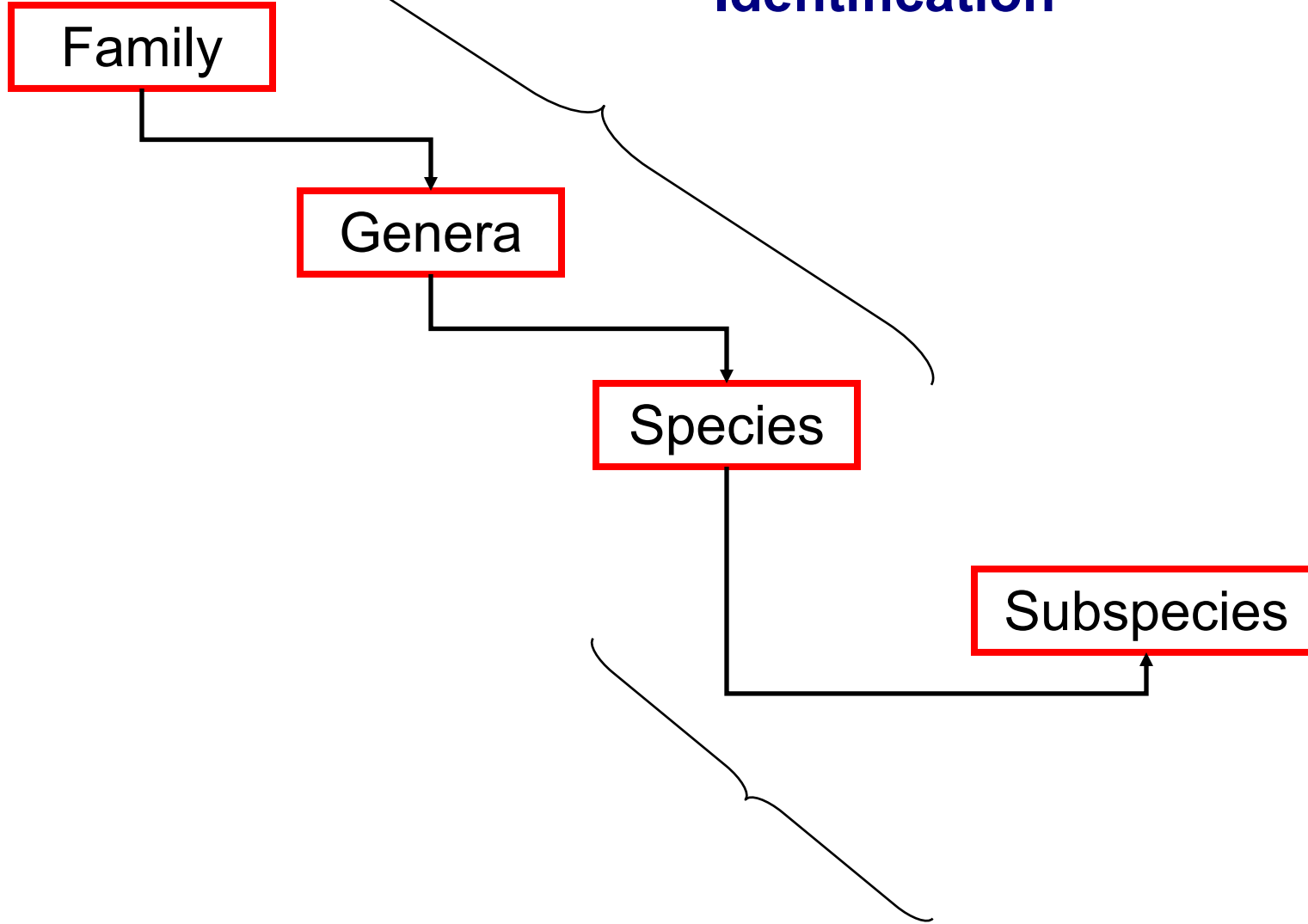
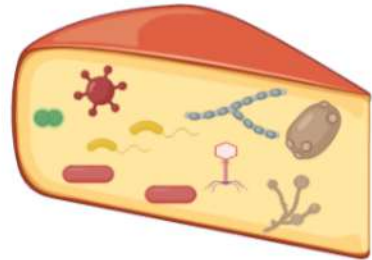


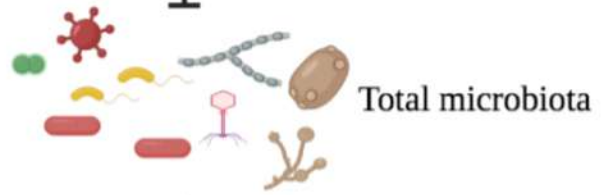
Identification





Culture-independent
methods

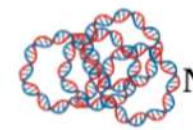
Culture-dependent
methods



Total microbiota



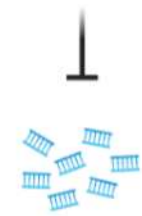
Cultured microbiota



NAs extraction



metagenomics
metatranscriptomics



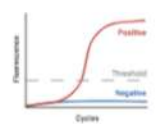
Amplicon
sequencing



PCR-based methods



Pattern analysis



RT-PCR
Digital -PCR



Phenotypic
characterization



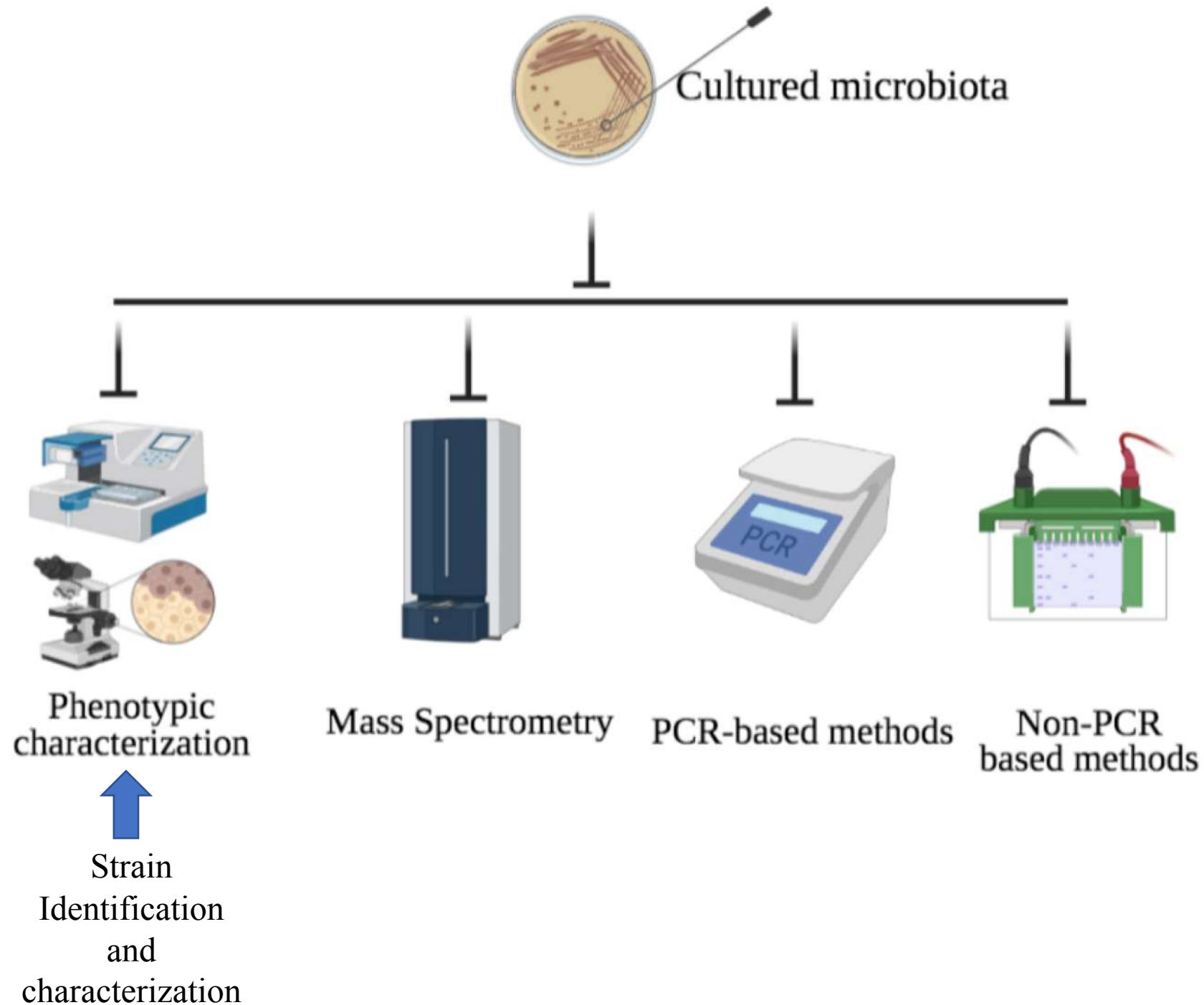
Mass Spectrometry

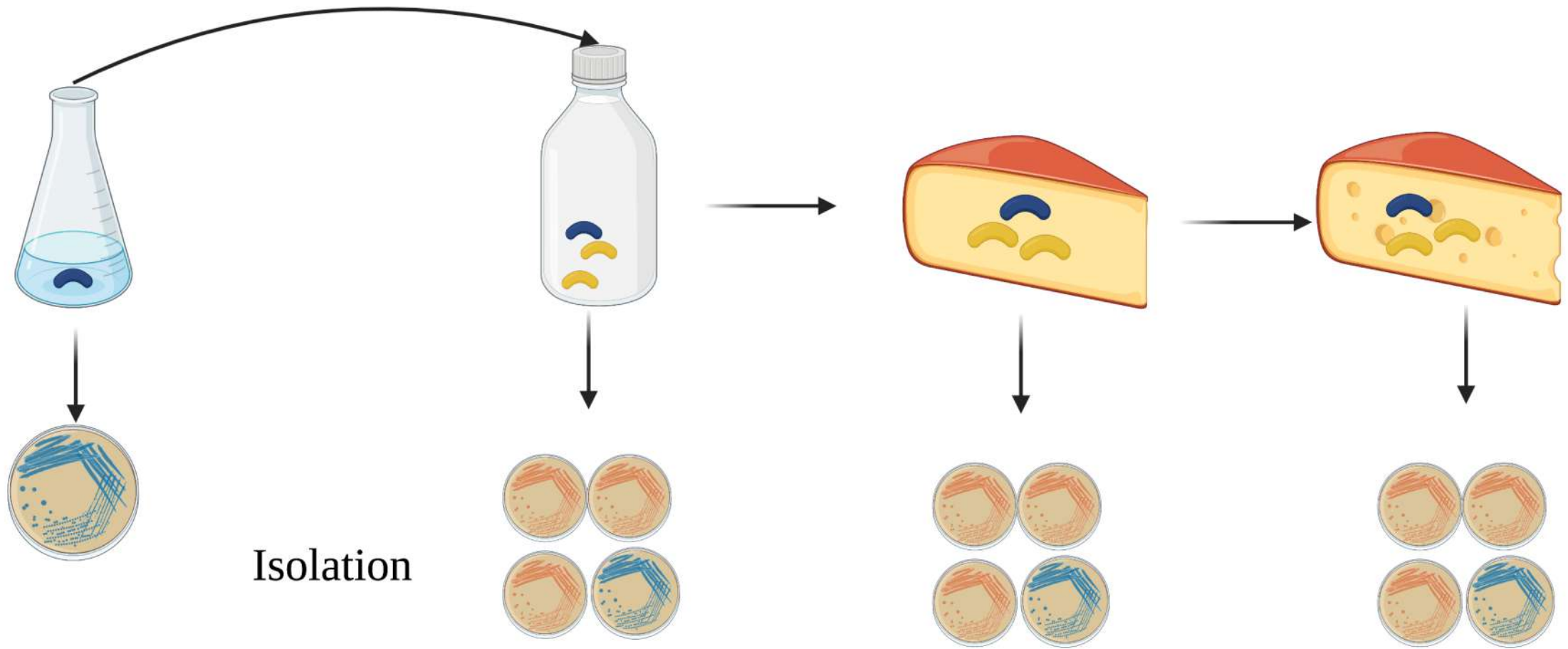


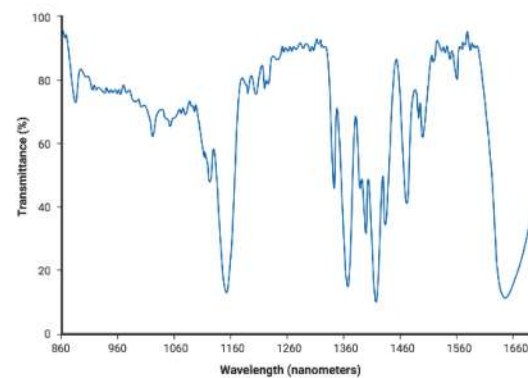
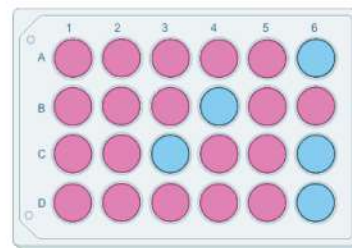
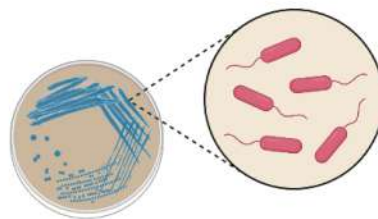
PCR-based methods

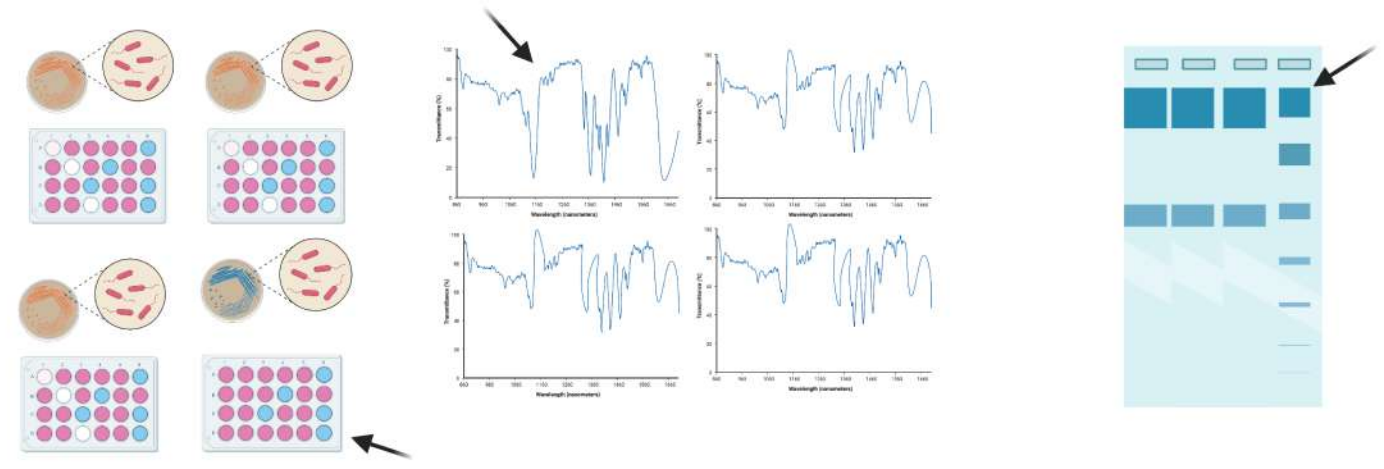
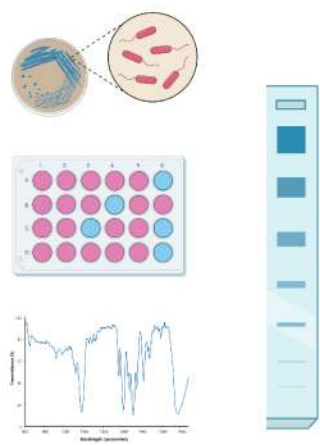
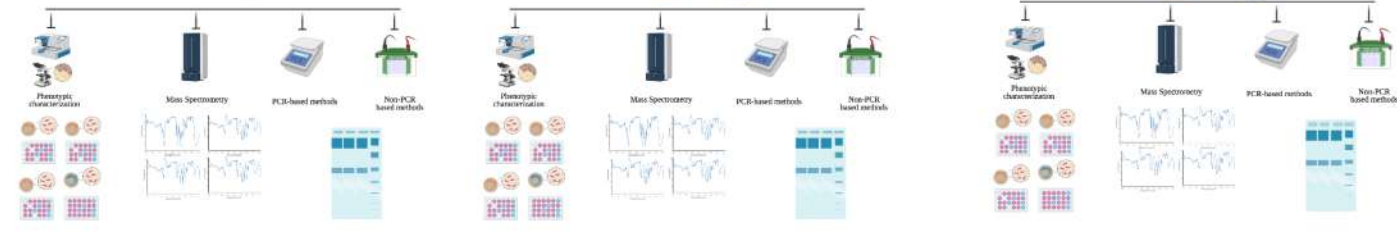
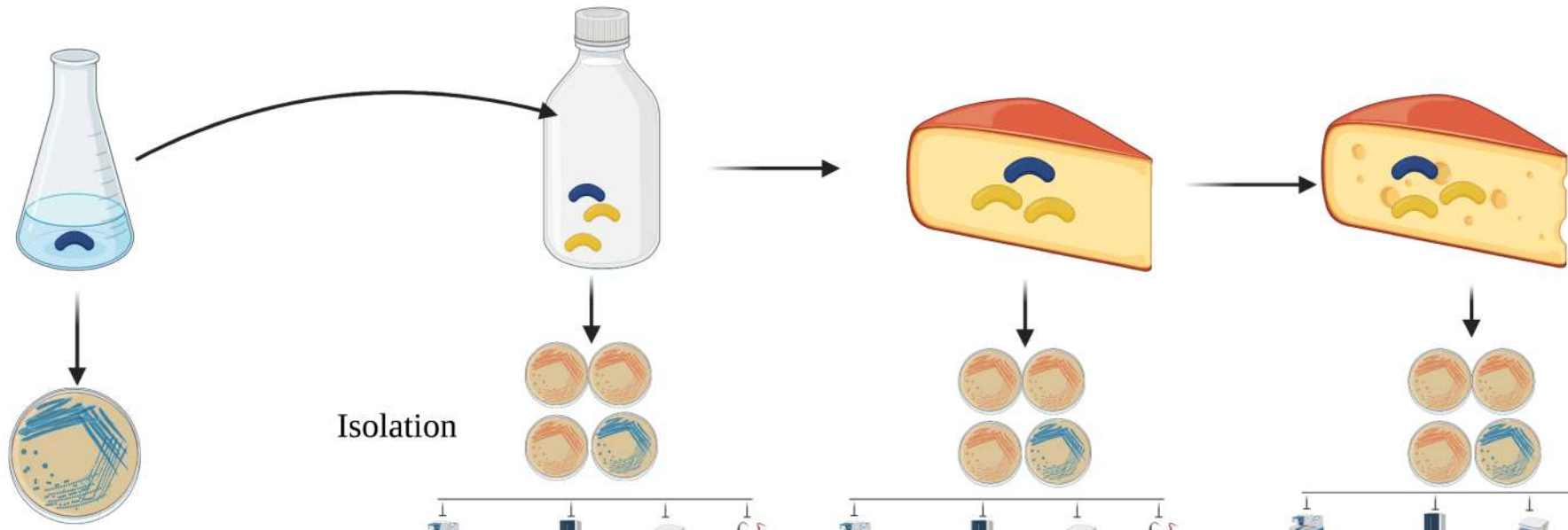


Non-PCR
based methods







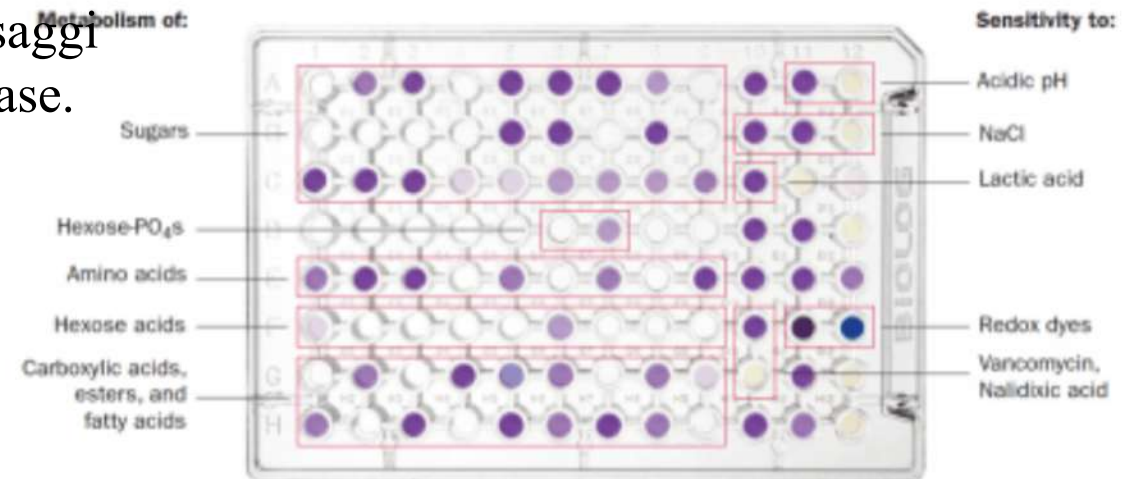


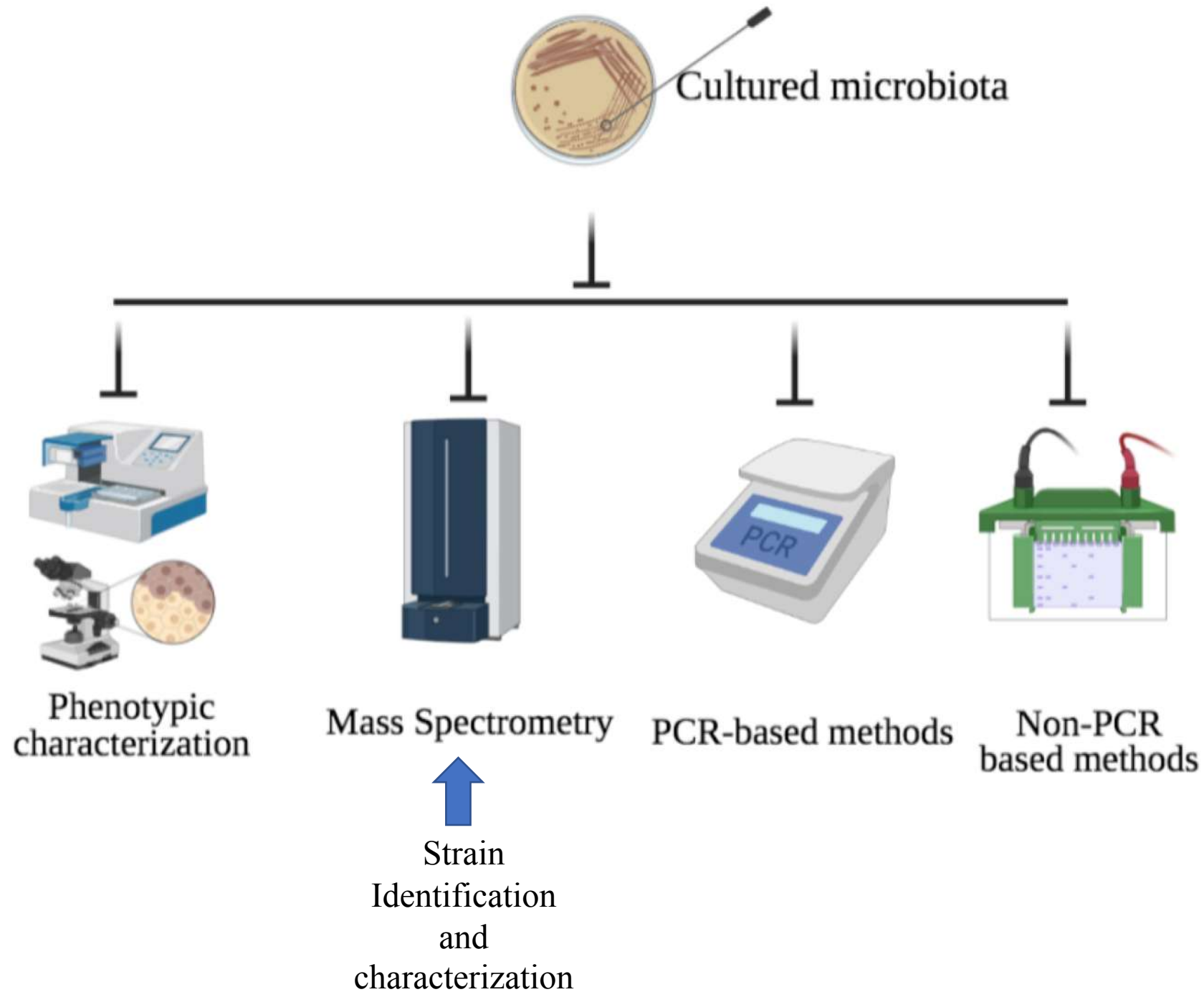
Phenotypic technology

La tecnologia fenotipica fornisce preziose informazioni sulle proprietà dei ceppi. L'analisi si basa sulla capacità dei microrganismi di utilizzare le fonti di carbonio, aminoacidi o produrre metaboliti.

La Microplate identifica i microrganismi ambientali e/o patogeni producendo un modello caratteristico o "impronta digitale metabolica" da reazioni di test discrete eseguite all'interno di una micropiastra da 96 pozzetti.

Le sospensioni di coltura vengono testate con un pannello di saggi preselezionati, quindi incubate, lette e confrontate con i database.

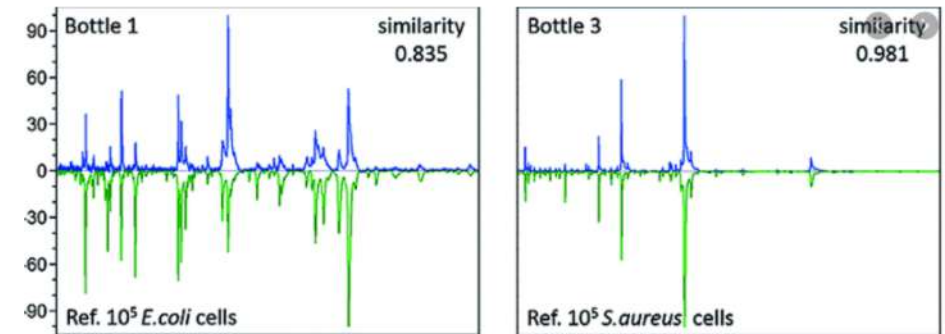
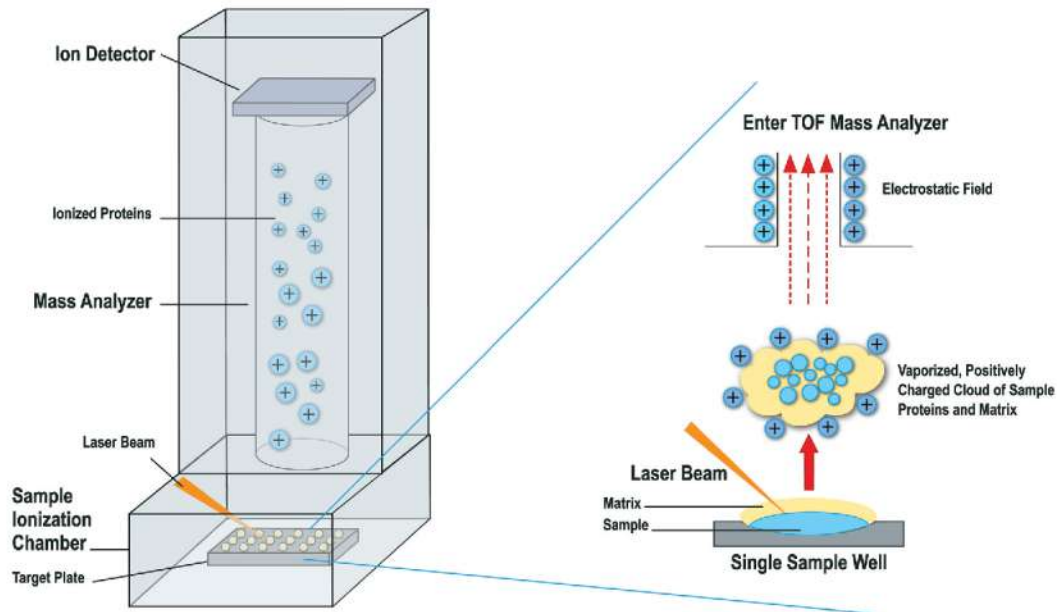




MALDI-TOF Mass Spectrometry

Mass spectrometry is an analytical technique in which samples are ionized into charged molecules and ratio of their mass-to-charge (m/z) can be measured. In MALDI-TOF mass spectrometry, the ion source is matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI), and the mass analyzer is time-of-flight (TOF) analyzer.

MALDI-TOF MS determines the unique proteomic fingerprint of an organism, and matches characteristic patterns with an extensive reference library to determine the organism's identity.



La classificazione tassonomica che prevede il riconoscimento della famiglia, genere, specie e sottospecie di appartenenza di un determinato microrganismo molto spesso non è in grado di descrivere in maniera appropriata la diversità del mondo microbico. Infatti, all'interno di una stessa specie sono presenti gruppi di individui che presentano delle differenze importanti dal punto di vista fisiologico e genetico. Per questo motivo la tipizzazione microbica ha come scopo quello di distinguere all'interno della stessa specie ceppi diversi che possono essere definiti come biotipi.

La tipizzazione è stata utilizzata anche nell'ambito della sicurezza igienico-sanitaria per differenziare ceppi appartenenti a specie pericolose, ma con potenziali patogenici differenti (es. *L. monocytogenes*), oppure nelle fermentazioni alimentari come strumento per individuare ceppi in grado di guidare processi trasformativi ed essere quindi considerati come potenziali starter microbici.

Mentre tradizionalmente la tipizzazione veniva effettuata principalmente sfruttando dei caratteri fenotipici, come la crescita a diverse temperature o la capacità di trasformare definiti substrati, oppure la diversa sensibilità ai batteriofagi (fagotipizzazione), oggi le metodiche che sono più spesso utilizzate si basano su principi molecolari o immunologici.

Why typing:

Pathogens:

- epidemiology (diffusion of *Salmonella typhimurium* DT104, multiresistant to antibiotics)
- differentiation of virulent strains (*Listeria monocytogenes*)
- Non pathogenic

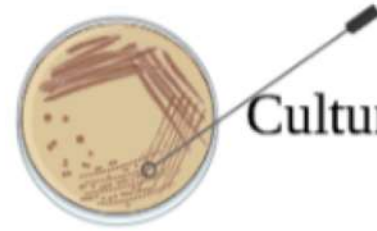
Technological important microorganisms (LAB, yeasts, ecc)

- Strain dynamics during fermentation
- Microbial selection
- Quality control

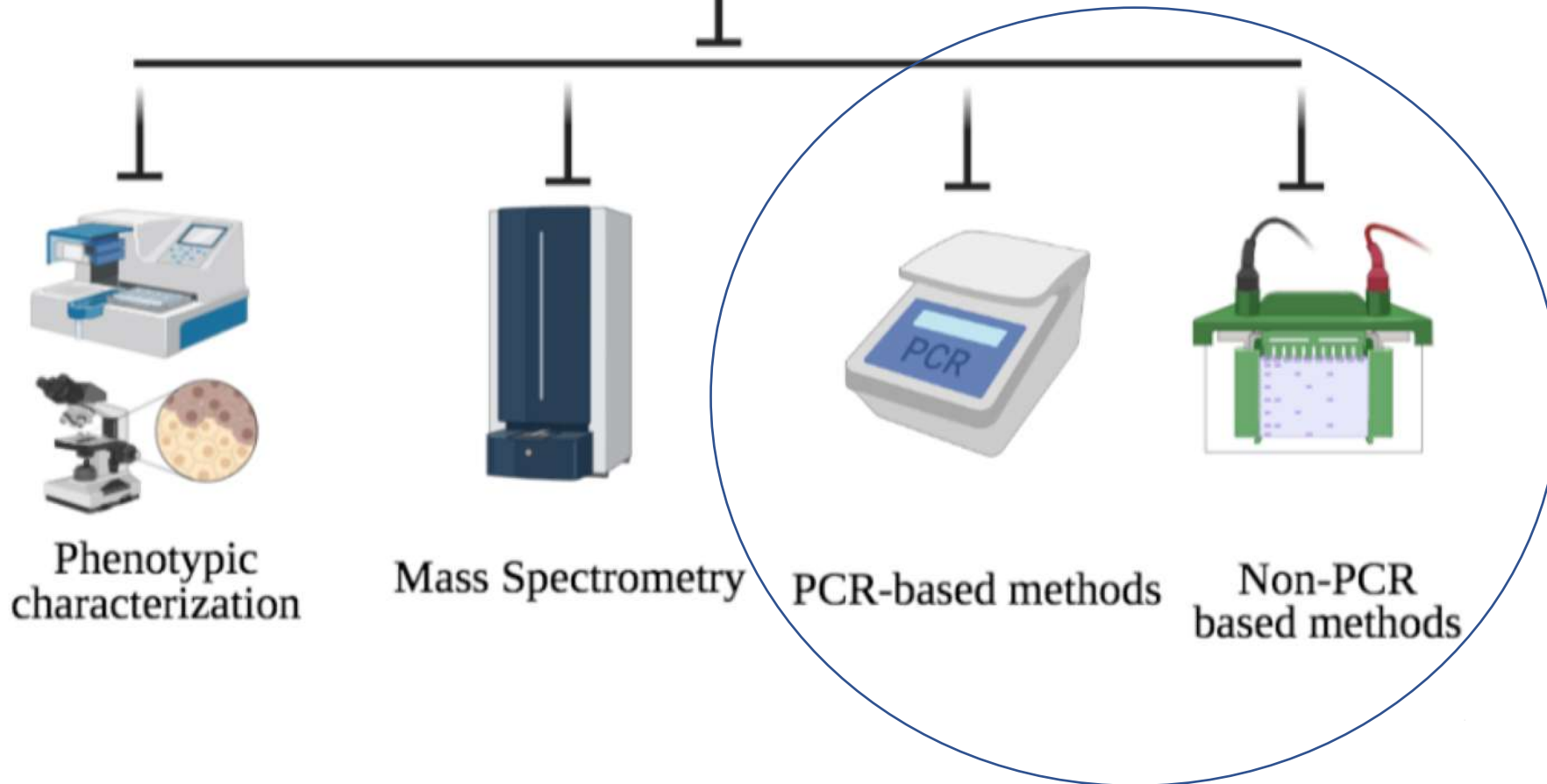
La tipizzazione su base molecolare sfrutta in generale la diversità, a livello di sequenza del DNA, che i microrganismi possiedono, anche se appartenenti alla stessa specie.

Per questo motivo il target dell'analisi è la molecola del DNA, la quale può essere sottoposta a sequenziamento, oppure può essere analizzata mediante tecniche in grado di produrre dei profili o impronte digitali (fingerprint), i quali sono sottoposti ad analisi con software specifici al fine di individuare la similarità tra diversi ceppi.

Nella prima categoria di metodiche si possono includere le tecniche WGS, che hanno preso piede grazie alla diminuzione dei costi di sequenziamento, e la multi locus sequence typing (MLST), metodica che ha assunto molta importanza in ambito epidemiologico, in modo specifico per alcuni patogeni alimentari come *Campylobacter jejuni* e *L. monocytogenes*.

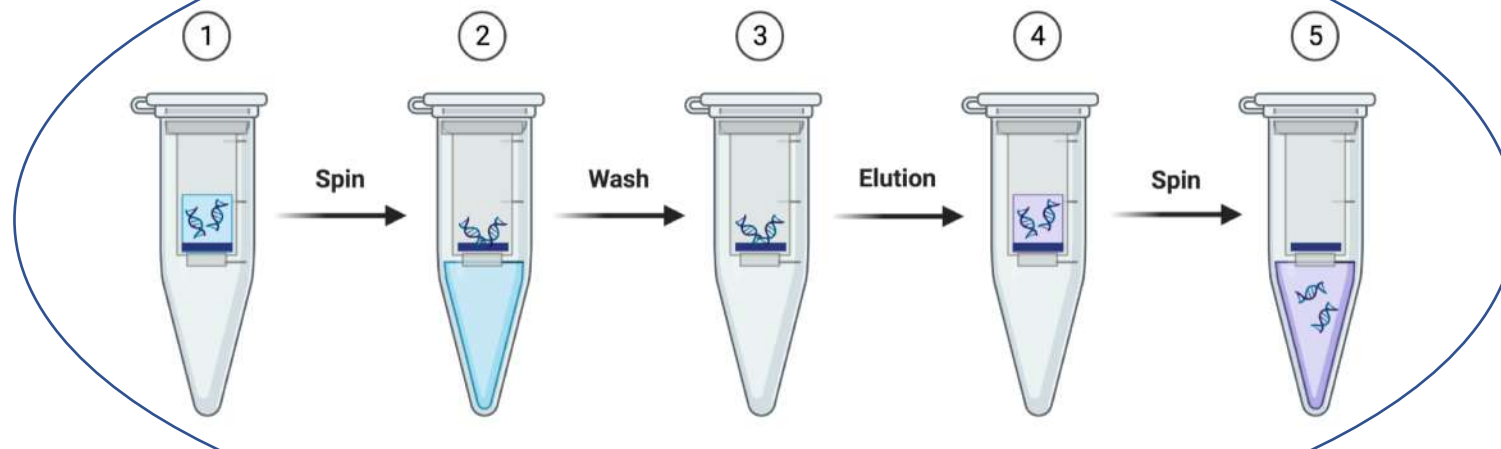
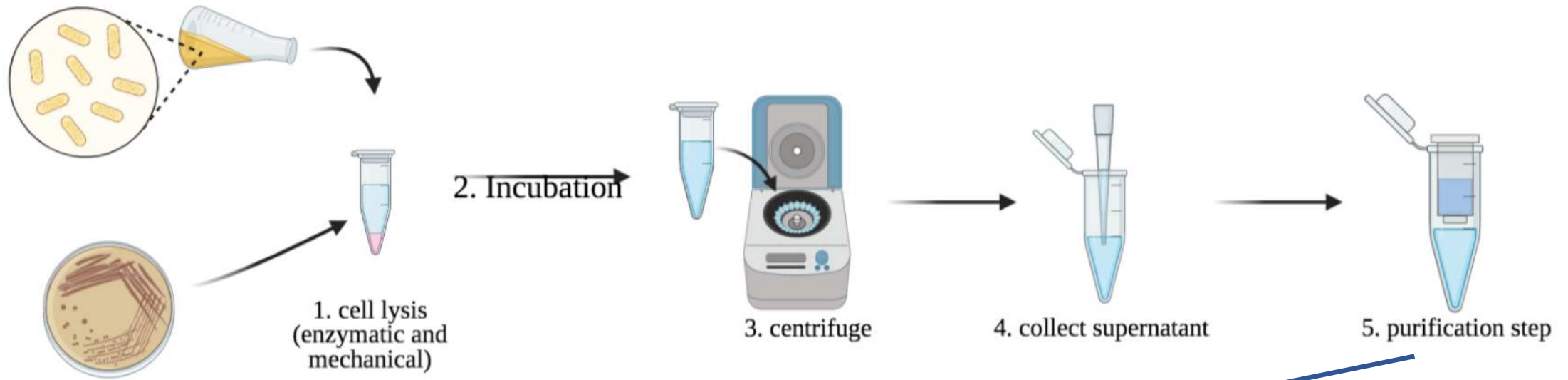


Cultured microbiota



DNA or RNA extraction
step!!

DNA or RNA Extraction



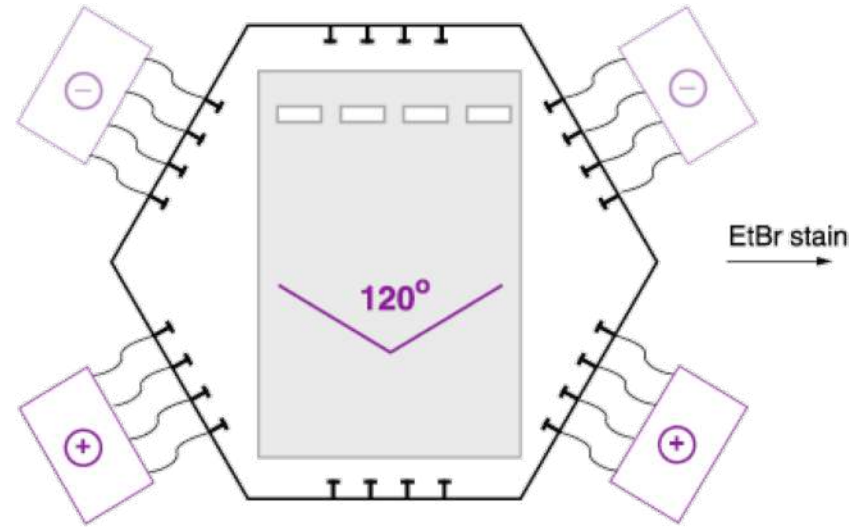
Non-PCR Based:

- RFLP, PFGE

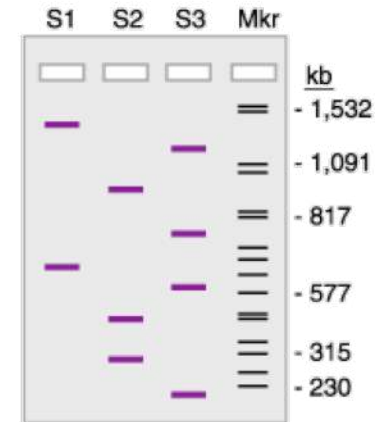
PCR Based:

- PCR as preparative method:
 - REA, MLRT, MLST, ARDRA, SSCP
- PCR as analytical method:
 - RAPD, REP, ERIC, AFLP

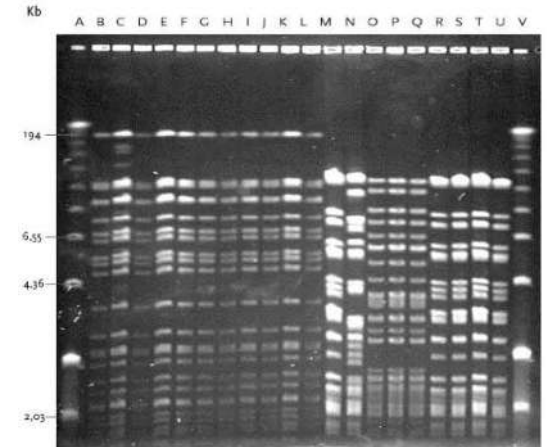
NON PCR BASED: Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)



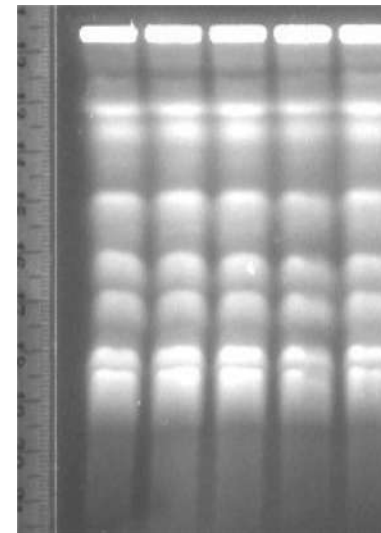
Electric field alternates 120° every 90 seconds for 18 to 24 hours at 14° C



bacteria



yeasts



The DNA fragments produce a DNA fingerprint with a specific pattern.

L'elettroforesi su gel d'agarosio in campo pulsato (PFGE) è senz'altro la metodica che a tutt'oggi è ancora considerata come quella in assoluto migliore per la tipizzazione microbica. È molto robusta e i risultati che si ottengono sono altamente ripetibili, per questo facilmente confrontabili fra diversi laboratori. Le molecole di DNA sono separate su di un gel d'agarosio sottoposto a un campo elettrico che cambia direzione, seguendo un angolo di 120°, secondo un intervallo deciso dall'operatore. In questo modo il DNA non migra in maniera uniforme secondo una traiettoria lineare, ma subirà degli "sbandamenti" che aumentano l'efficienza di separazione.

La PFGE è una tecnica utilizzata per separare le molecole di DNA in base al peso molecolare dei diversi frammenti, rappresentati dai diversi cromosomi nel caso degli eucarioti (in questo caso la metodica analizza il cariotipo del microrganismo), o dai frammenti di restrizione ottenuti dalla digestione enzimatica del genoma batterico, in quanto i batteri, presentano un solo cromosoma.

A livello mondiale sono state sviluppate delle banche di profili PFGE di microrganismi patogeni, come *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ed altri (Pulsenet dei Centers for Disease Control americani), con lo scopo di tracciare i ceppi responsabili di epidemie in diverse parti del nostro pianeta.

Un totale di **495 ceppi di *Listeria monocytogenes***, raccolti in modo temporale e geografico da **casi clinici umani, alimenti, allevamenti di ruminanti e ambienti urbani e naturali**, è stato utilizzato per studiare la **diversità dei tipi genetici** tramite elettroforesi su gel a campo pulsato (PFGE).

L'analisi PFGE ha discriminato **310 diversi tipi genetici** (PFGE types)

Un'analisi spaziale di 13 tipi PFGE ha mostrato che **due tipi erano specifici di un singolo stabilimento di lavorazione**

Nove tipi PFGE erano diffusi geograficamente e presenti in più fonti.

Ad esempio, un tipo PFGE identico a quelli coinvolti in **focolai di listeriosi a Los Angeles e in Svizzera** è stato trovato in ceppi provenienti da **allevamenti (7), casi clinici (4), ambienti (3) e alimenti (1)**.

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Mar. 2007, p. 865–873
0095-1137/07/\$08.00+0 doi:10.1128/JCM.01285-06
Copyright © 2007, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 45, No. 3

Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Analysis of Temporally Matched *Listeria monocytogenes* Isolates from Human Clinical Cases, Foods, Ruminant Farms, and Urban and Natural Environments Reveals Source-Associated as Well as Widely Distributed PFGE Types[†]

Eric B. Fugett,¹ Dianna Schoonmaker-Bopp,² Nellie B. Dumas,² Joseph Corby,³ and Martin Wiedmann^{1*}

La **Fluorescence In Situ Hybridization** (FISH) è una tecnica molecolare utile per **identificare e tipizzare microrganismi** (inclusi patogeni come *Listeria monocytogenes*) direttamente in campioni complessi, come alimenti, ambienti o tessuti.

Tipizzazione tramite fish

Cioè il riconoscimento di **ceppi o sottotipi diversi di una stessa specie**, si usano **sonde specifiche per geni discriminanti**, come:

- **Geni di virulenza** → Es. *hlyA* o *inlA* in *Listeria monocytogenes*
- **Geni specifici del sierotipo o del gruppo genetico**
- **Mutazioni caratteristiche** di ceppi multiresistenti, come nel caso di *Salmonella typhimurium*

- Distinguere tra ceppi virulenti e non virulenti
- Riconoscere ceppi resistenti agli antibiotici
- Monitorare la presenza di specifici ceppi in un ambiente o alimento

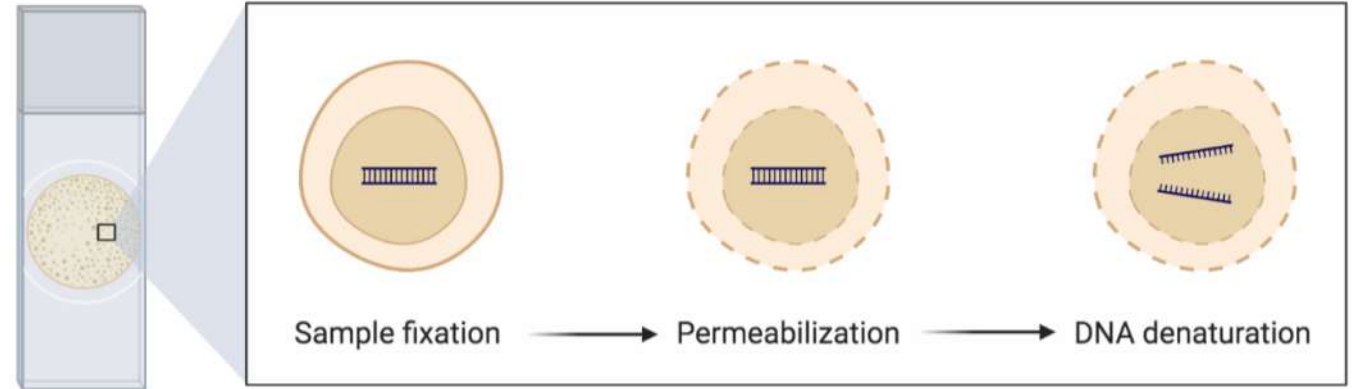
Preparazione del campione

- Fissazione delle cellule su un vetrino.
- Permeabilizzazione delle membrane per far entrare la sonda.

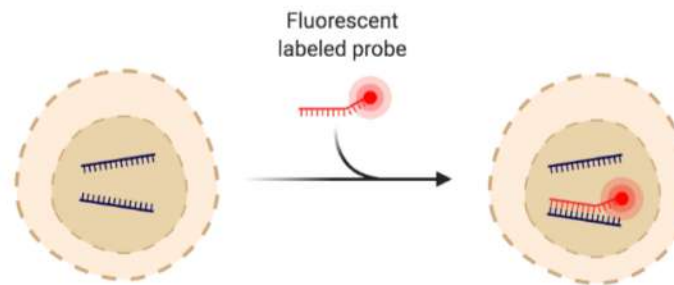
Ibridazione della sonda

- Si applica una sonda fluorescente che riconosce una sequenza genetica specifica del microrganismo (es. *Listeria monocytogenes*). La sonda si lega solo se trova la sequenza complementare.

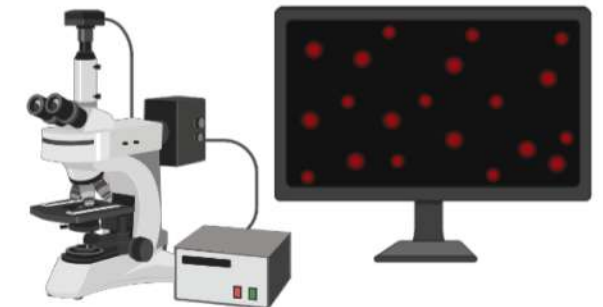
① Sample preparation

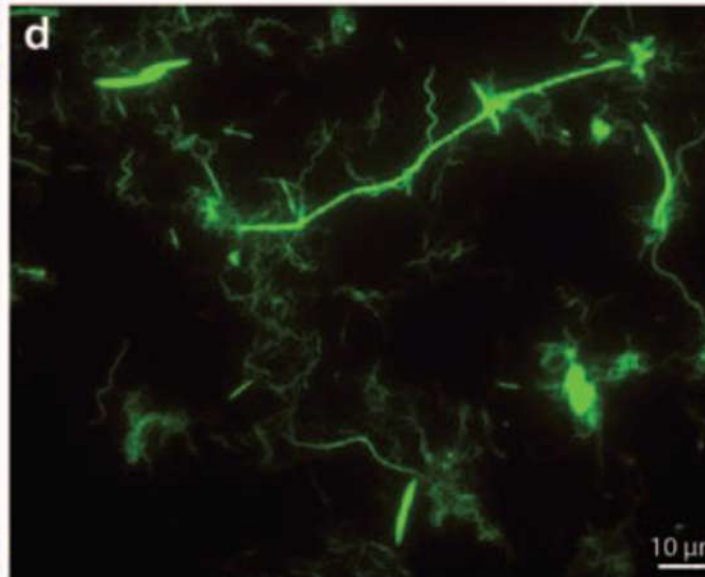
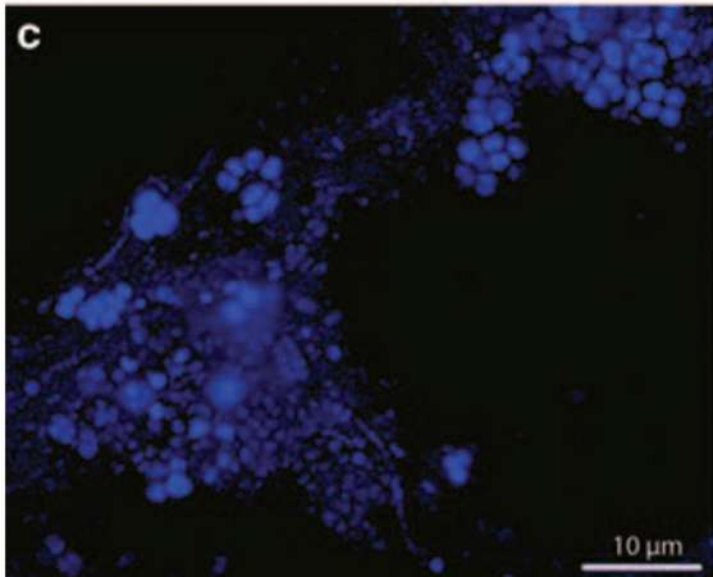
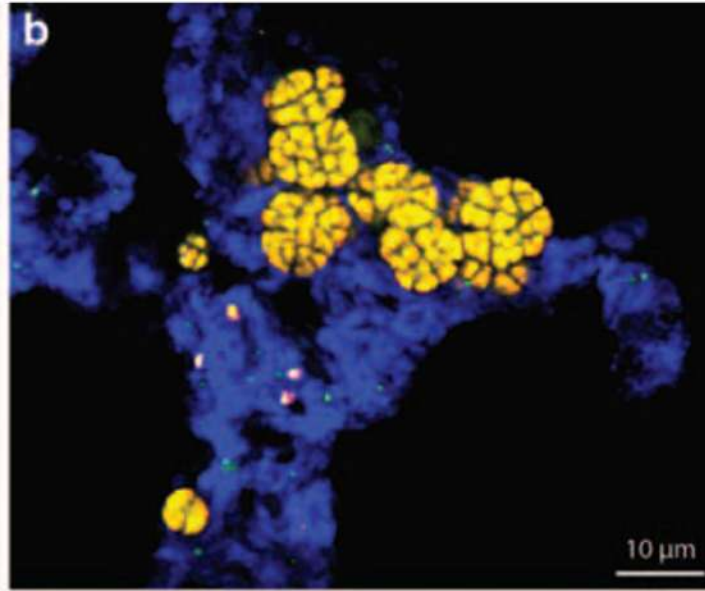
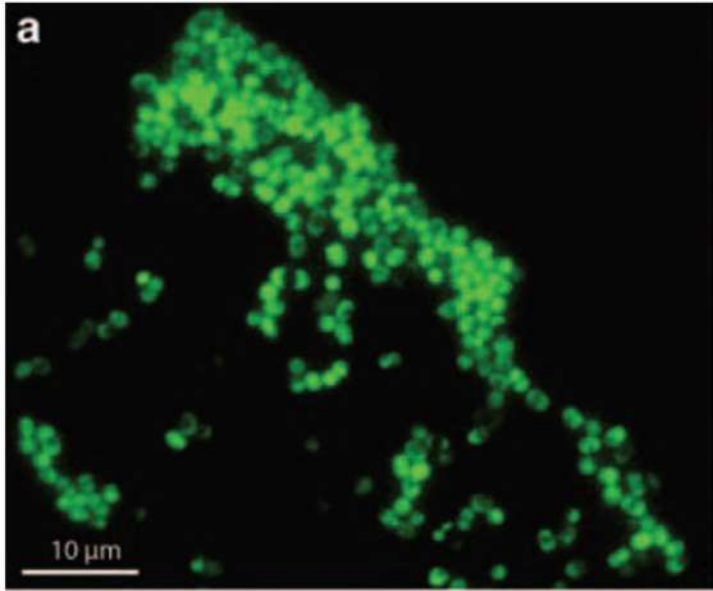


② Hybridization



③ Imaging





Osservazione al microscopio a fluorescenza o confocale

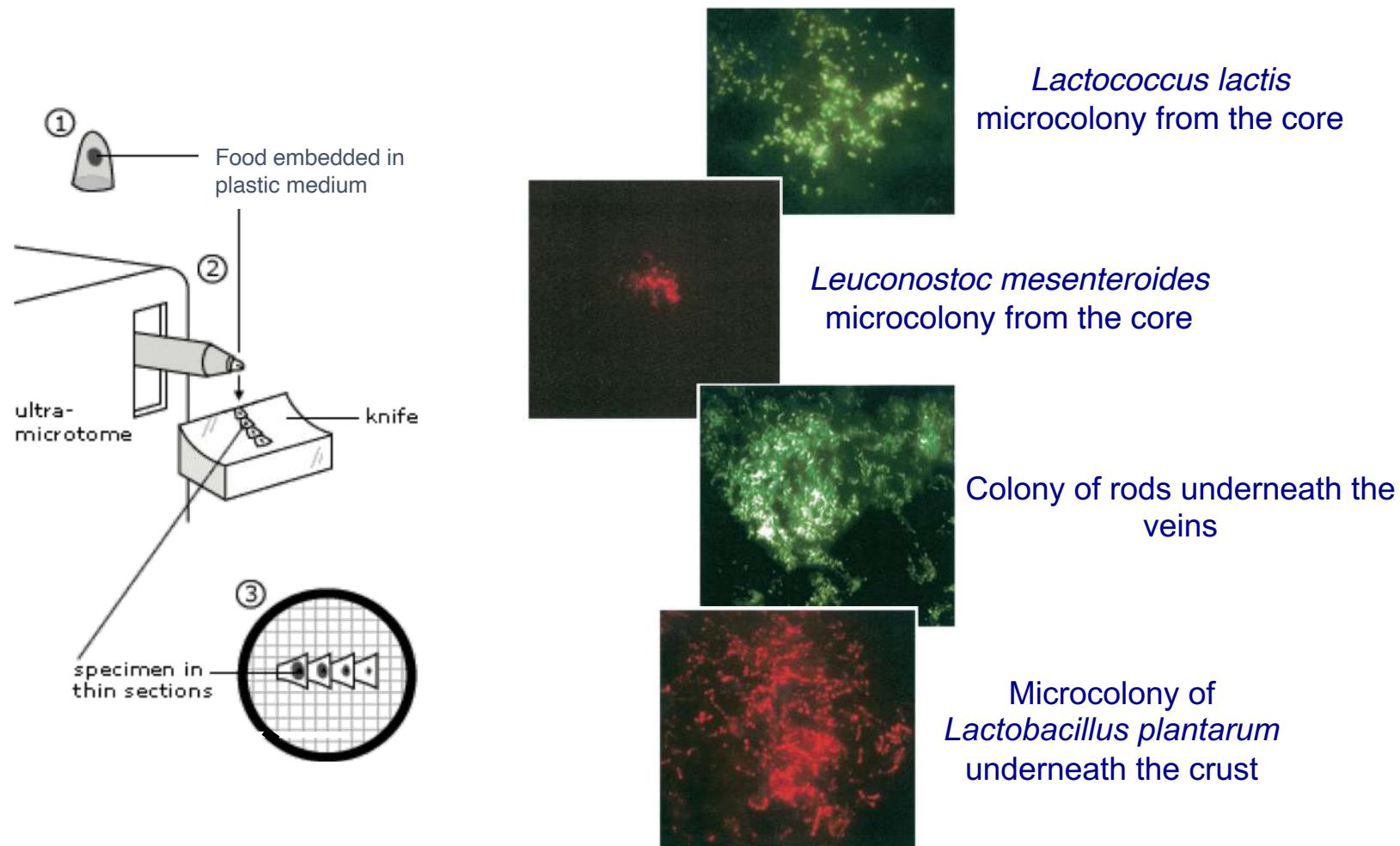
- Le cellule con sequenze bersaglio appaiono **fluorescenti**.
- La localizzazione e l'intensità del segnale danno indicazioni sulla **presenza e abbondanza** del ceppo.

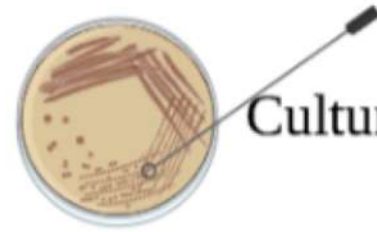
Bacterial Community Structure and Location in Stilton Cheese

Danilo Ercolini,[†] Philip J. Hill, and Christine E. R. Dodd*

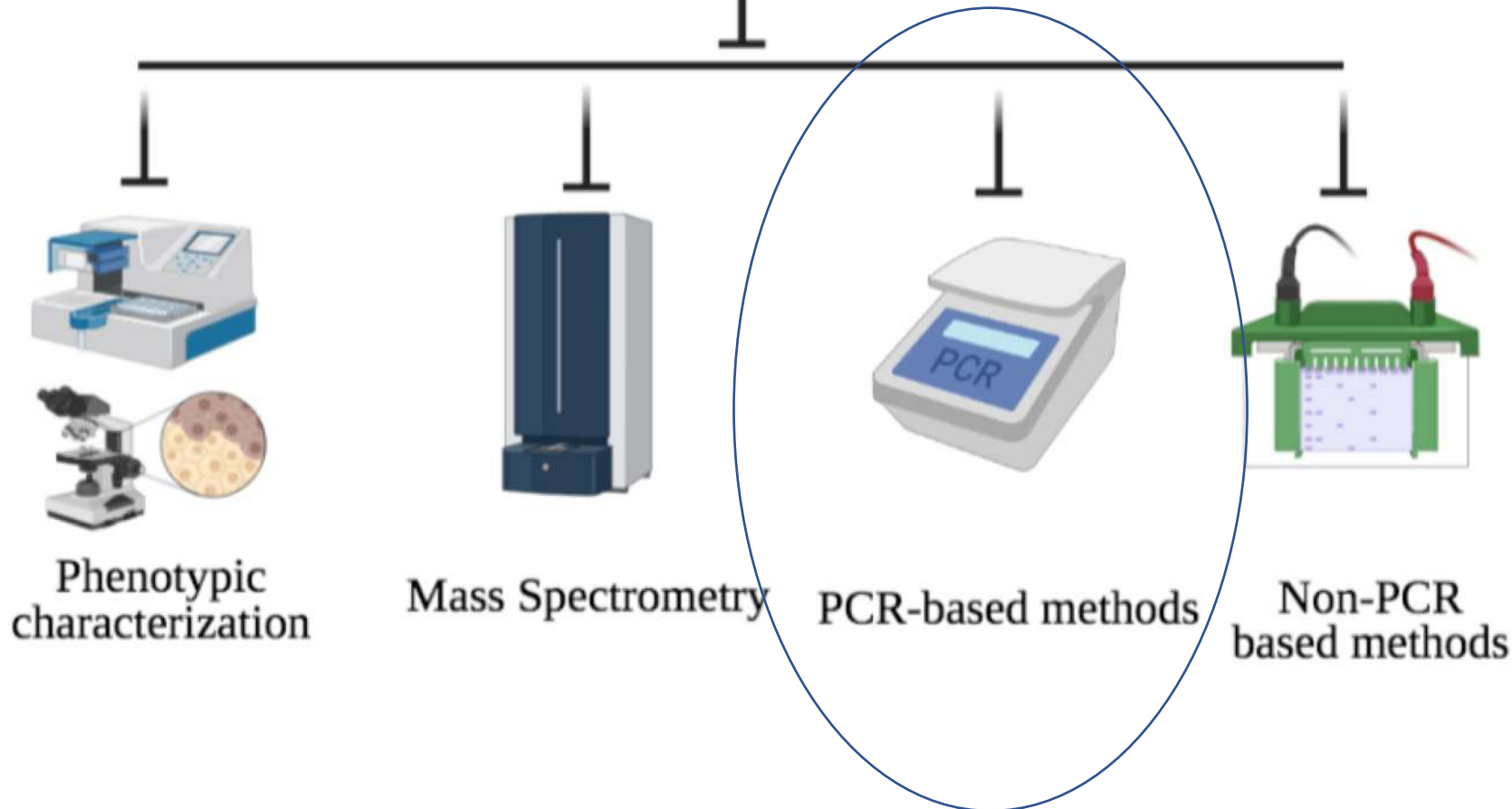
*Division of Food Sciences, School of Biosciences, University of Nottingham, Loughborough,
Leicestershire LE12 5RD, United Kingdom*

Received 19 September 2002/Accepted 27 February 2003





Cultured microbiota



Phenotypic
characterization

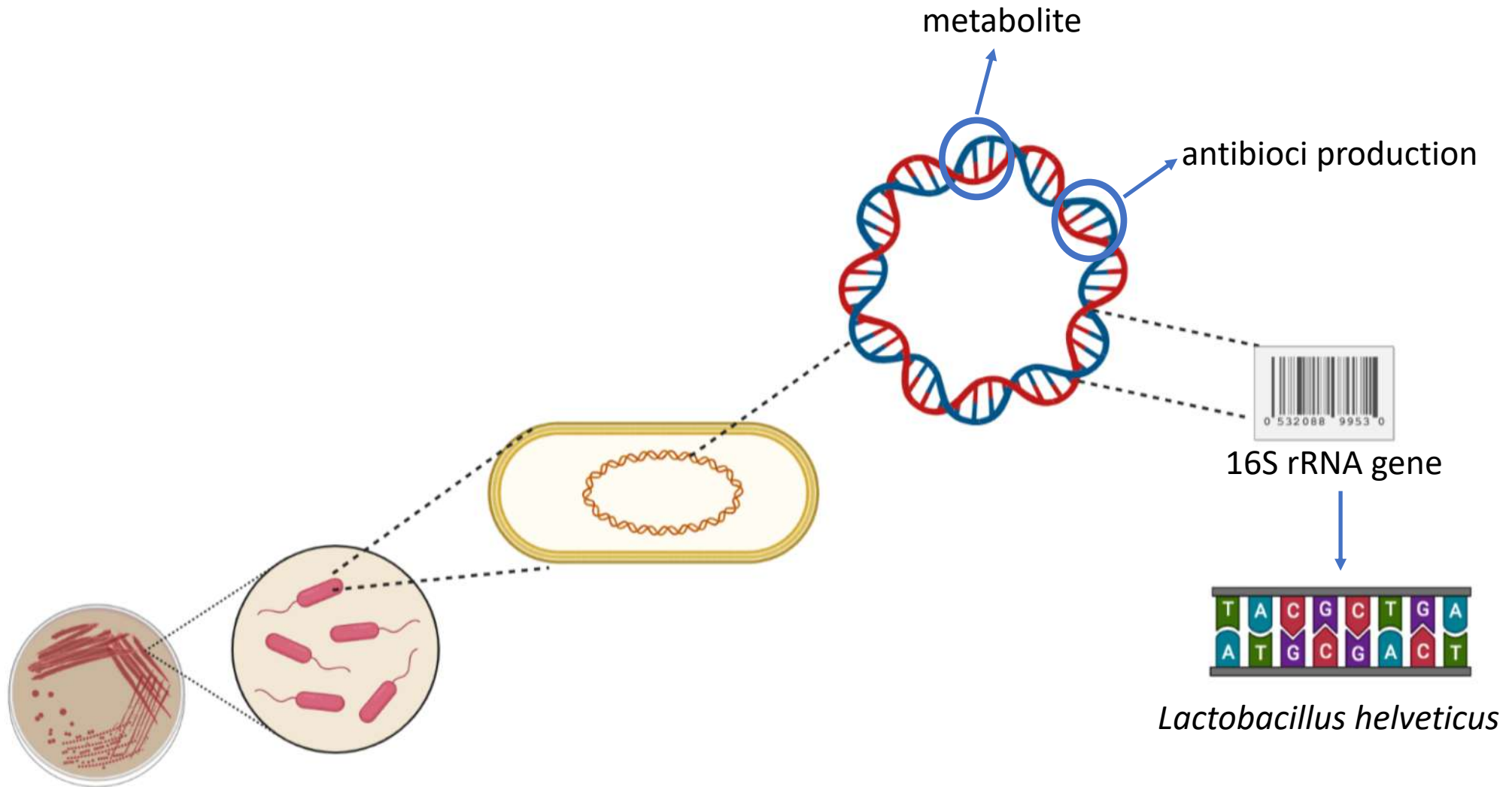
Mass Spectrometry

PCR-based methods

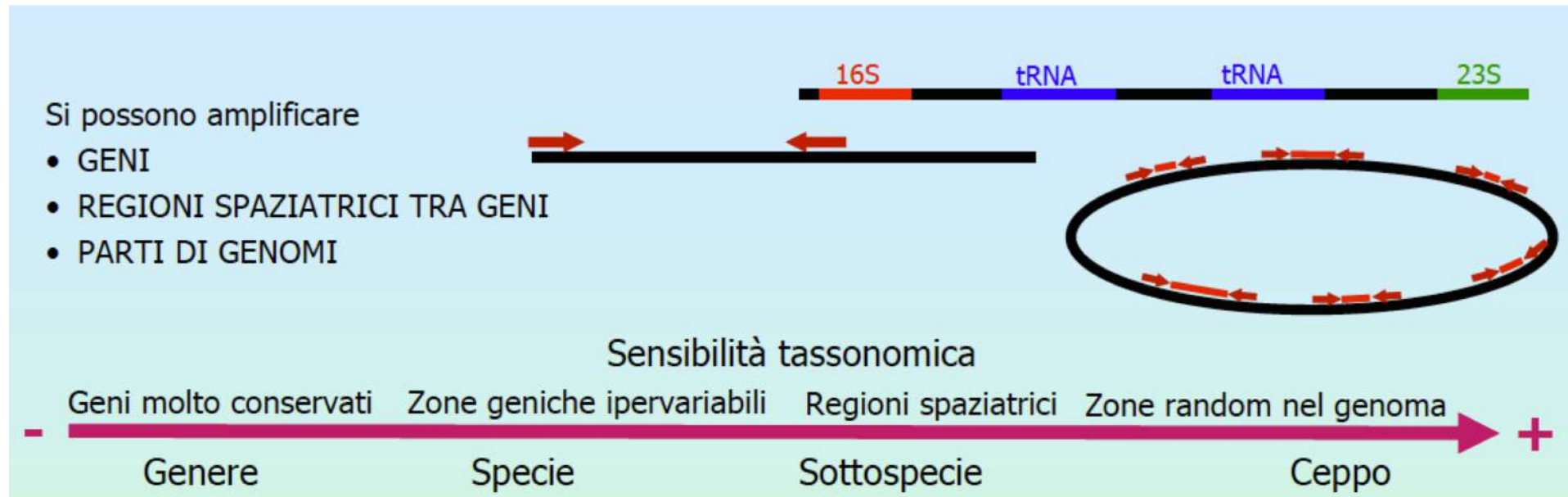
Non-PCR
based methods

DNA or RNA extraction
step!!

PCR BASED: Tipizzazione microbica mediante metodi molecolari



PCR



PCR (Polymerase chain reaction)

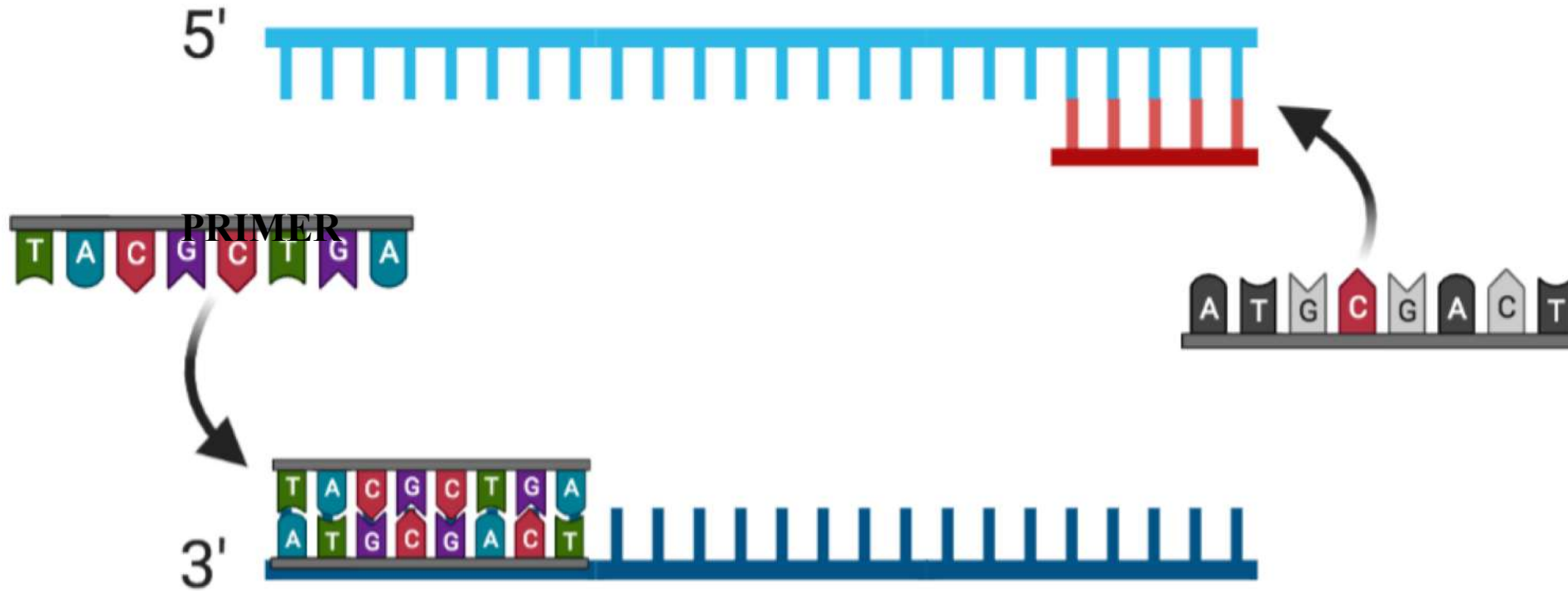
Lo scopo della PCR è quello di produrre un numero esponenziale di copie di una sequenza di DNA (spesso geni o parti di geni).

I principali componenti della PCR sono:

- DNA stampo (Template DNA), che contiene il frammento da amplificare;
- Due primer (Forward e Reverse), che determinano l'inizio e la fine della regione da amplificare;
- DNA Polimerasi, che copia la regione da amplificare (si utilizzano le DNA polimerasi di batteri termofili, stabili ad alte temperature; es. Taq Polimerasi);
- Nucleotidi liberi, necessari per la sintesi del nuovo DNA (A, T, G, C);
- Tampone (Buffer), che fornisce l'ambiente chimico adatto all'attività della DNA Polimerasi.



PCR (Polymerase chain reaction)



PCR (Polymerase chain reaction)

Denaturazione a 94 °C:

Durante la denaturazione, i due filamenti di DNA si separano e tutte le reazioni enzimatiche si fermano (ad esempio, l'estensione del filamento del ciclo precedente).

Appaiamento (Annealing) a 50 - 60 °C:

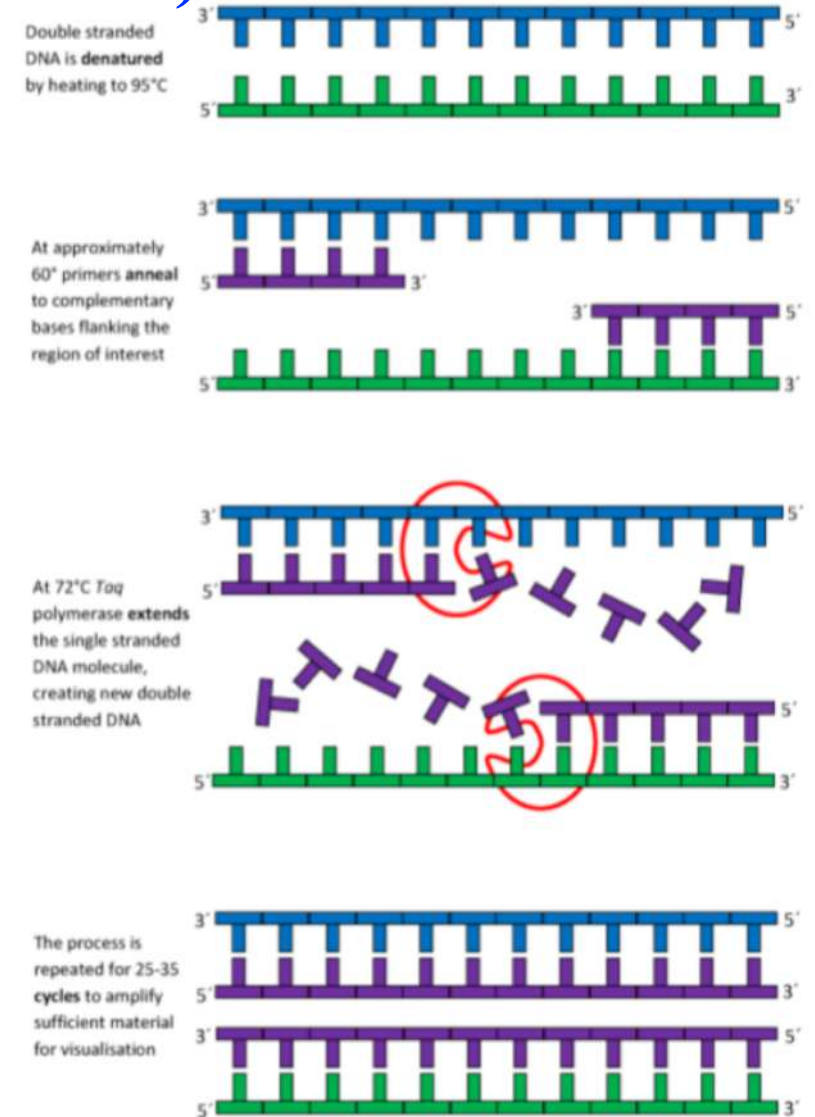
Durante l'annealing, si usano due primer (Forward e Reverse) che si legano ai loro siti specifici. La temperatura di questa fase dipende dai primer utilizzati.

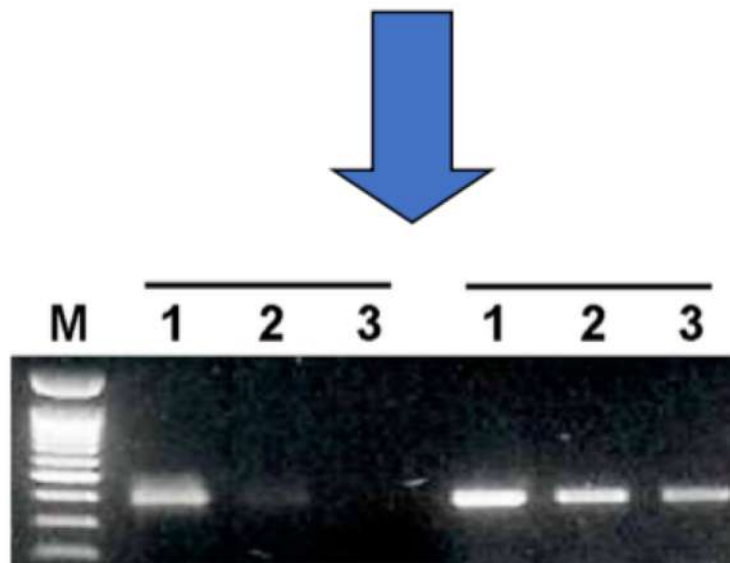
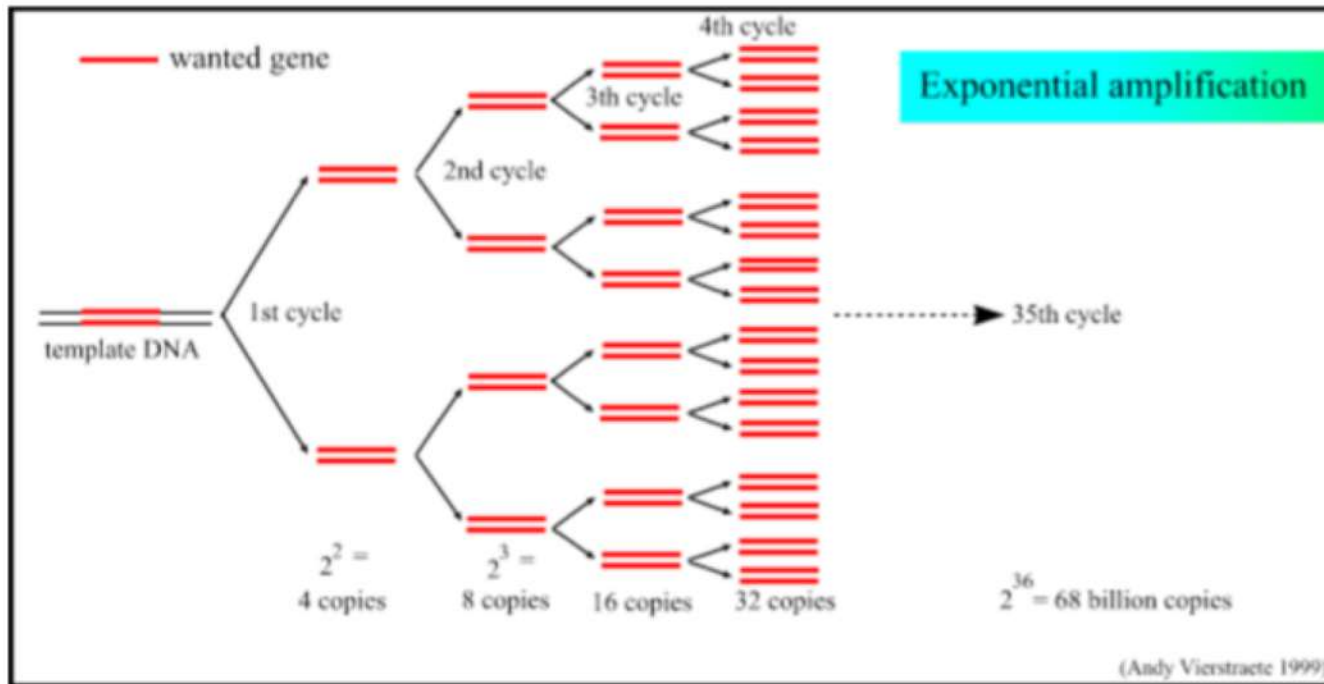
Estensione a 70 - 75 °C (Allungamento):

Durante l'estensione, la Polimerasi allunga i primer aggiungendo le basi (complementari al filamento stampo) all'estremità 3'.

Il risultato è la formazione di **2 copie a doppio filamento** di DNA.

La temperatura di allungamento dipende dalla DNA Polimerasi utilizzata.





Agarose Gel Electrophoresis

- ① Dissolve agarose powder in buffer (TAE or TBE)



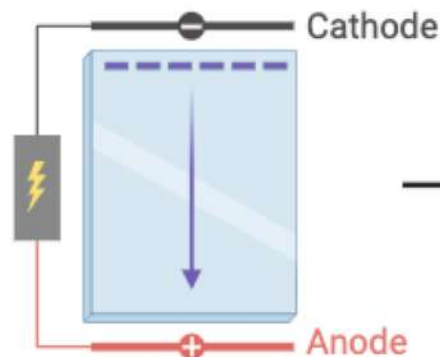
- ② Agarose gel polymerization



- ③ Load DNA samples



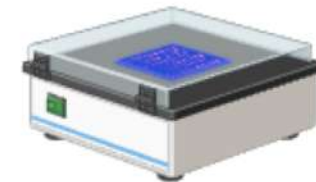
- ④ Apply current to pull DNA toward the positive electrode

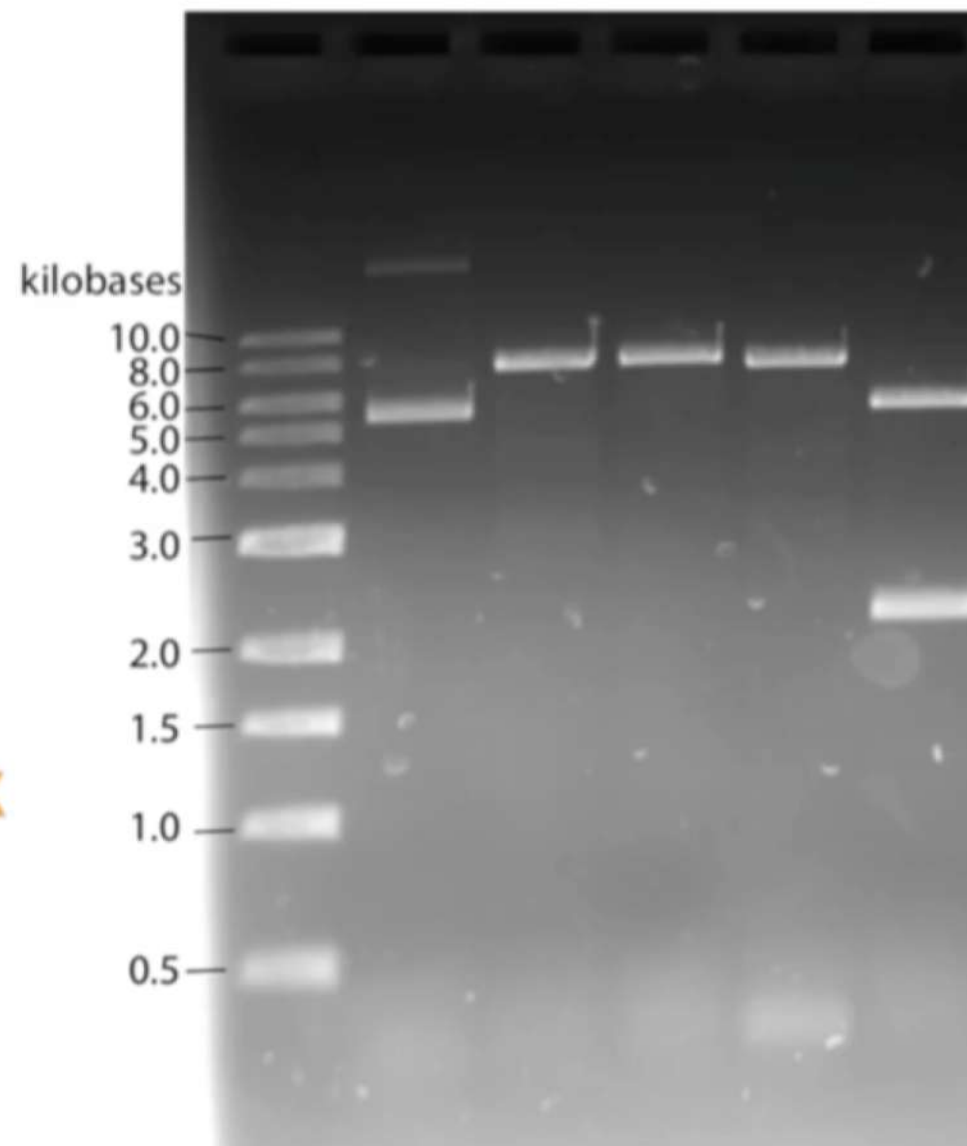


- ⑤ DNA fragments separate based on size



- ⑥ Stain the gel and visualize under UV light





Applicazioni della PCR in ecologia microbica

Tipizzazione tramite fingerprinting (impronta genetica):

Tecniche come RAPD, REP, ERIC permettono di ottenere profili genetici distintivi dei microrganismi, utili per confrontare ceppi diversi o studiare la diversità microbica.

Presenza o assenza di geni specifici:

Rilevamento di geni di virulenza, geni per batteriocine, geni per le ammine biogene, ecc., per valutare le caratteristiche funzionali o di rischio dei microrganismi.

Identificazione di ceppi con primer specifici:

Utilizzo di primer disegnati su sequenze uniche per identificare ceppi particolari all'interno di un campione complesso.

Identificazione di ceppi seguita da sequenziamento:

Dopo l'amplificazione con PCR, il prodotto viene sequenziato per una determinazione precisa del ceppo, ad esempio tramite analisi della regione 16S rRNA o di geni discriminanti.

Tipizzazione tramite fingerprinting

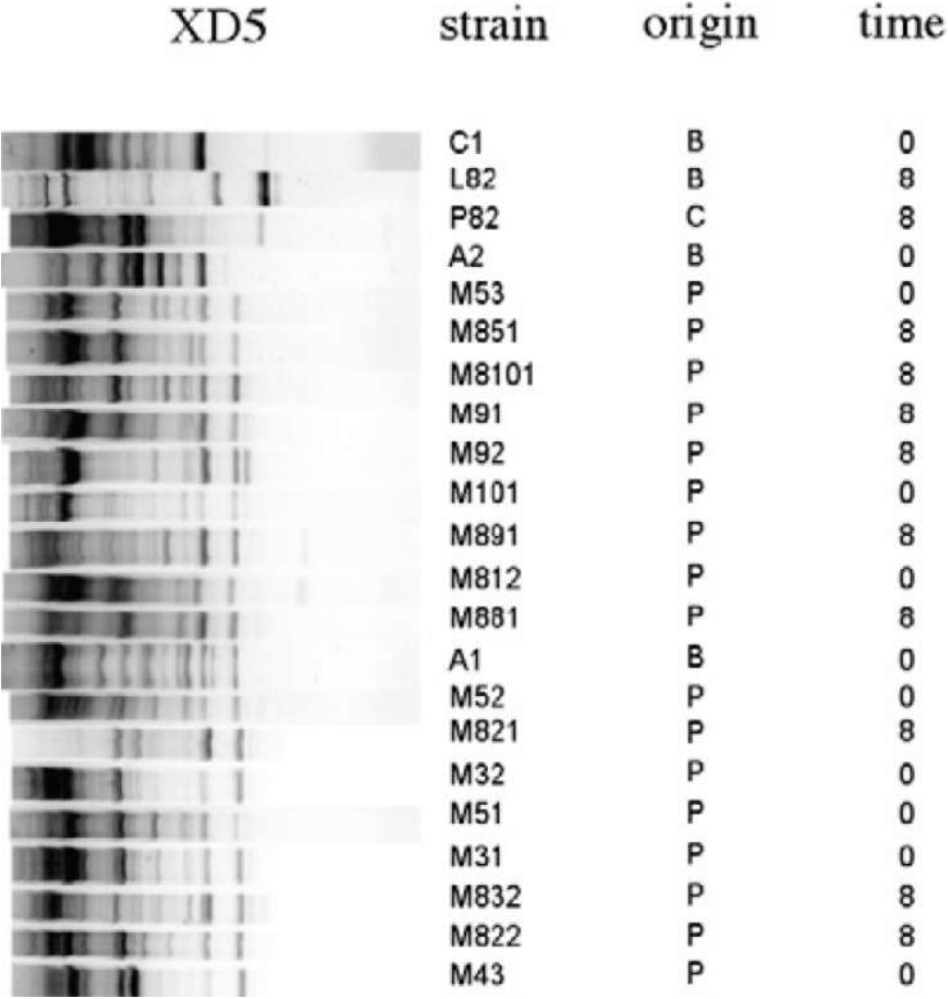
Nella microbiologia degli alimenti, le tecniche più diffuse che impiegano la PCR come metodo analitico sono la

Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) e la

Repetitive Extragenic Palindromic PCR (REP-PCR).

Entrambe le metodiche si basano sull'utilizzo di **primer** in grado di ibridare in differenti regioni del genoma microbico, generando profili di amplificazione che dipendono direttamente dal numero e dalla posizione dei siti di legame. Solo i primer che si appaiano a una distanza non superiore a poche migliaia di coppie di basi possono produrre frammenti amplificati.

La RAPD è definita una metodica “random” poiché amplifica regioni del DNA in modo casuale: il primer si lega a siti distribuiti casualmente lungo il genoma, generando profili caratteristici. Questa tecnica è apprezzata per la sua **semplicità di esecuzione**, ma presenta una **scarsa riproducibilità**, dovuta alle **condizioni di amplificazione poco stringenti**, necessarie per favorire una maggiore frequenza di ibridazione — requisito essenziale per ottenere profili complessi e informativi.



Fingerprinting typing: Repetitive Element Polymorphic DNA (REP)

La REP, amplifica delle regioni ripetute sparse all'interno dei genomi microbici, per cui a differenza della RAPD è una metodica molto più robusta e ripetibile. In questo caso la **numerosità delle bande sarà proporzionale al numero di sequenze ripetute** contenute all'interno del genoma del microrganismo analizzato.

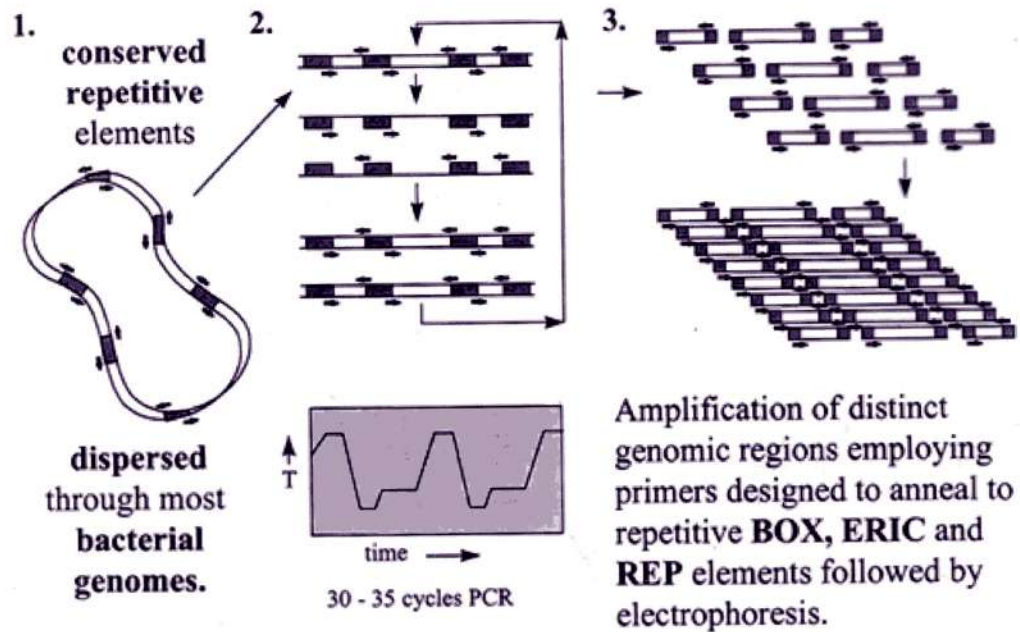
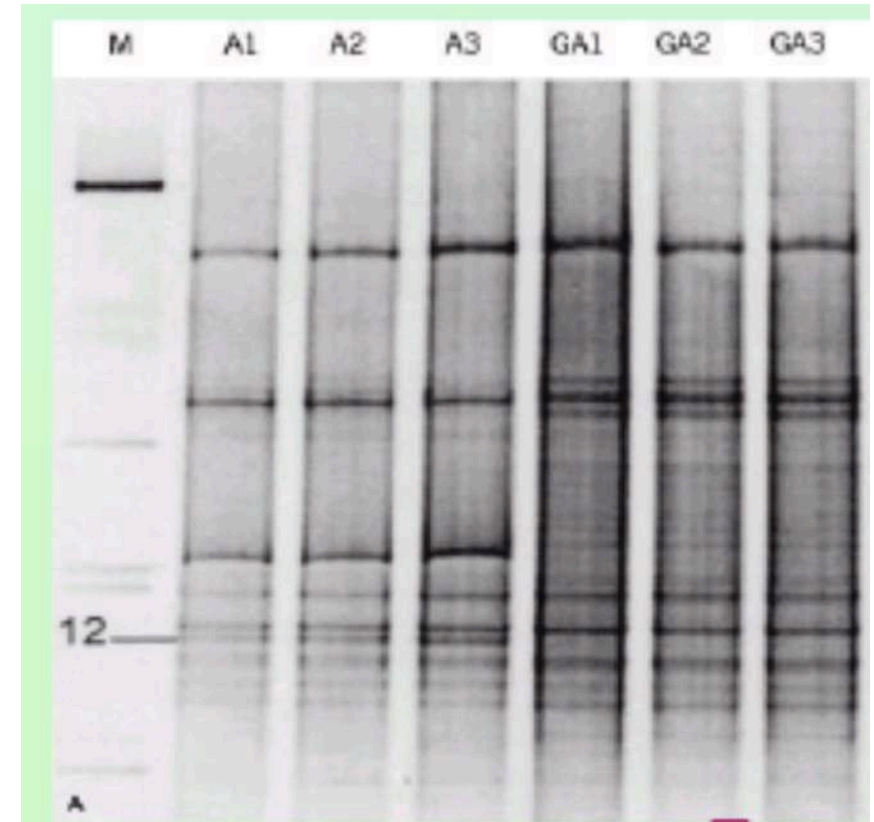


Fig. 1. Principle of rep-PCR genomic fingerprinting.



REP APPLICATION STRAIN TRACKING

L. sakei



Plate count

Sampling time: 0, 3, 7 and 40 days

Serial Decimal Dilution

Strains isolation as pure culture

DNA Extraction

REP-PCR

TYPING



Plate count



TIME 0

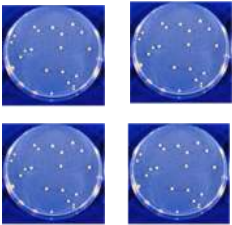


Plate count



TIME 5

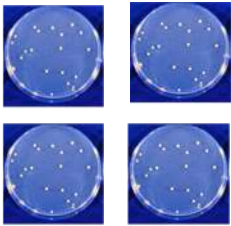
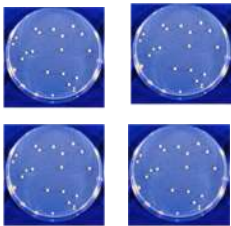


Plate count

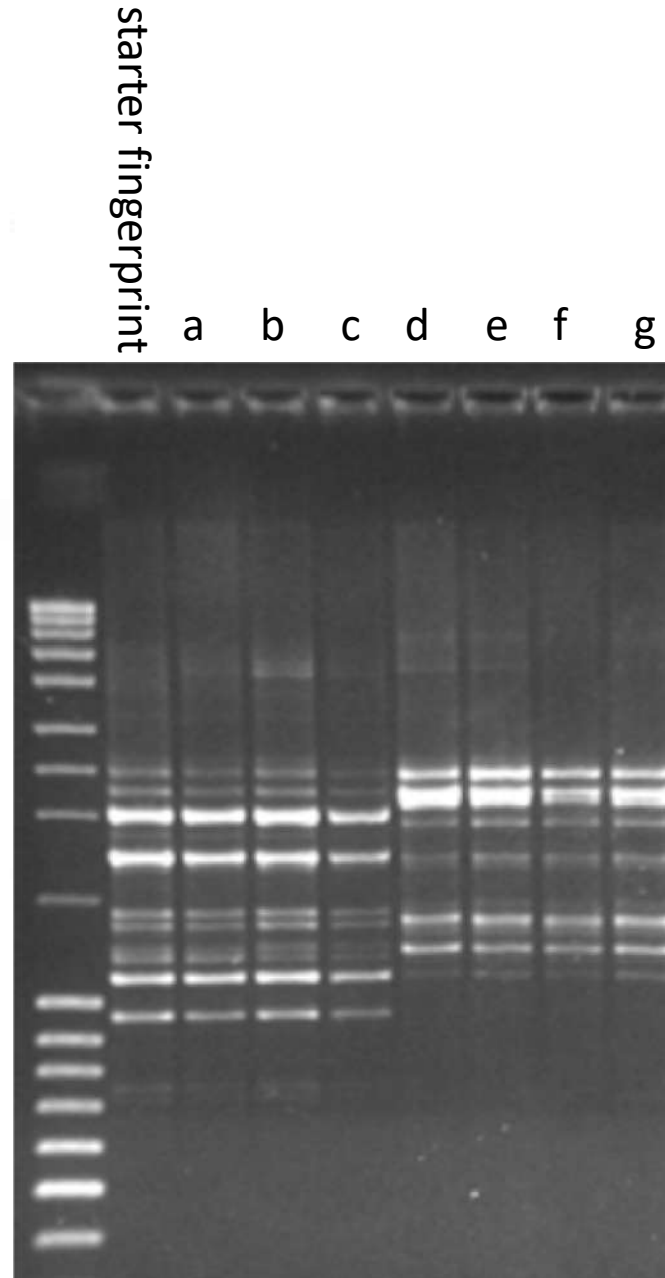
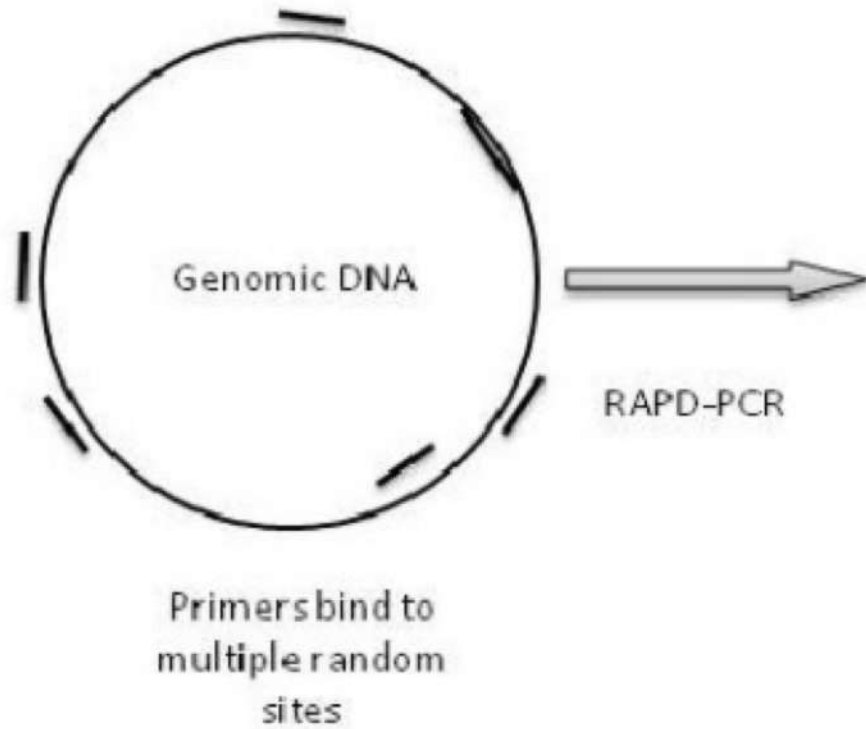


TIME 30



ESTRAZIONE DEL DNA

PCR



a: strain isolated at T0
b: strain isolated at T0
c: strain isolated at T5
d: strain isolated at T5
e: strain isolated at T30
f: strain isolated at T30
g: strain isolated at T30

Identificazione con primer specifici

Principio della PCR specie-specifica

La PCR specie-specifica (o species-specific PCR) è una variante della reazione a catena della polimerasi progettata per identificare in modo selettivo un'unica specie microbica all'interno di un campione complesso.

1. Scelta dei primer

Il principio fondamentale è la specificità dei primer. Vengono progettati per riconoscere sequenze uniche presenti solo nella specie bersaglio e assenti nelle altre specie affini.

2. Amplificazione selettiva

Durante la reazione di PCR:

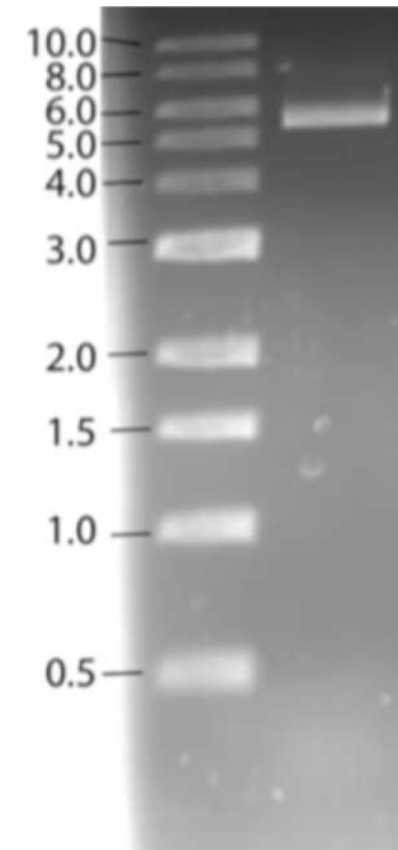
Se nel campione è presente la specie bersaglio, i primer si legano alle sequenze complementari del suo DNA e la DNA polimerasi sintetizza il frammento specifico.

Se la specie non è presente, o se il DNA appartiene ad altre specie, non avviene legame e quindi non si forma alcun prodotto di amplificazione.

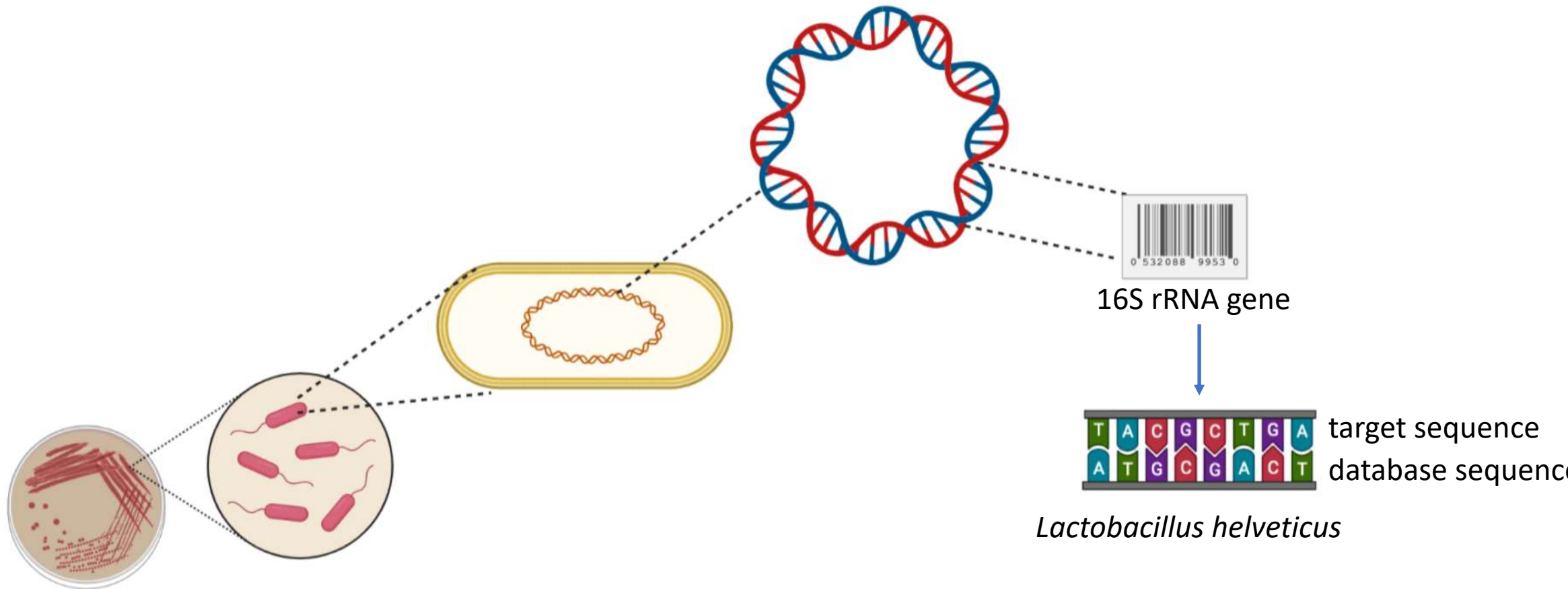
Identificazione con primer specifici

Specie-Specific primer

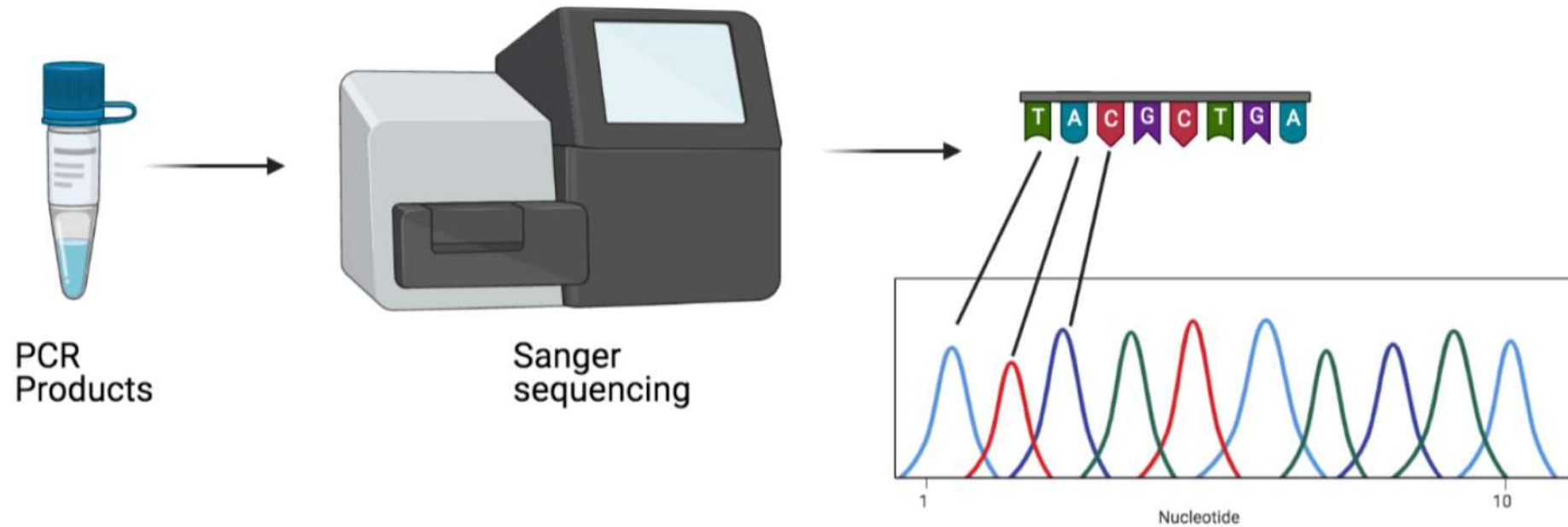
	336	354
<i>Pseudomonas fragi</i>	... AAAGT C G T C A G C A C C G A A A A A G C C T A C G A ...	
<i>P. lundensis</i>	... AAAGT T G T C A G T A C C G A A A A A A C G T A C G A ...	
<i>P. putida</i> type strain	... AAGGT C G T T T C C A C C A A A G A G C G C T A C G A ...	
<i>P. putida</i> biotype A	... AAGGT C G T T T C C A C C A A A G A G C G T T A C G A ...	
<i>P. putida</i> biotype B	... AAAGT C G T C A G C A C C A A A G A G C A A T A C G A ...	
<i>P. fluorescens</i> biotype A	... AAAGT C G T C A G C G T T A A A G A G A A G T A C G A ...	
<i>P. tolaasii</i>	... AAAGT T G T C A G T G T T A A A G A G A A G T A C G A ...	
<i>P. syringae</i>	... AAGGA A G T C T G C A C T A A G G A C A C C T A C G A ...	
<i>P. aureofaciens</i>	... AAGGT C G T C A G T A C C A A G G A A A G C T A C G A ...	
<i>P. fluorescens</i> biotype F	... AAAGT C G T C A G C A C C A A A G A G A A G T A C G A ...	
<i>P. stutzeri</i>	... AAGGA G G T T A G C G T C A A G G A G C G C T A C G A ...	
<i>P. chlororaphis</i>	... AAGGT C G T C A G C A C C A A G G A A A G C T A C G A ...	
<i>P. fluorescens</i> type strain	... AAAGT T G T C A G C G T G A A A G A G A A G T A C G A ...	
<i>P. fluorescens</i> biotype B	... AAAGT C G T C A G C A C C C A G G A A C A G T A C G A ...	
<i>P. aurantiaca</i>	... AAGGT C G T C A G C A C C A A G G A A A G C T A C G A ...	
<i>P. mendocina</i>	... AAGGA A G T C A C C T G C G A C A A G C C T T A C G A ...	
<i>P. cichorii</i>	... AAGGA A G T C A G C A C C A A G G A A A G C T A C G A ...	
<i>P. agarici</i>	... AAAGT C G T C A G C A C C A G G G A A A A G T A C G A ...	
<i>P. resinovorans</i>	... AAGGT G G T G T C C T G C G A A G A A C G T T A C G A ...	
<i>P. marginalis</i>	... AAAGT C G T C A G C G T C A A A G A G A A G T A C G A ...	
<i>P. flavesens</i>	... AAGGA A G T C A G C T G T A G C G A G C G C T A C G A ...	
<i>P. aeruginosa</i>	... AAGGA G G T C A C C A C C G C C G A G C G C T A C G A ...	
<i>P. fluorescens</i> biotype G	... AAAGT C G T C A G C G T T A A A G A G A A G T A C G A ...	
<i>P. fluorescens</i> biotype C	... AAAGT C G T C A G C A C C A A A G A A C A G T A C G A ...	



Identificazione mediante sequenziamento

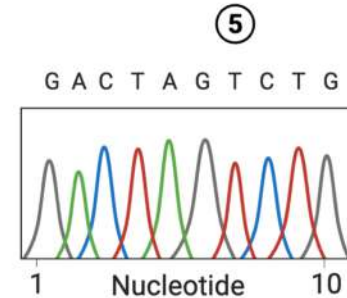
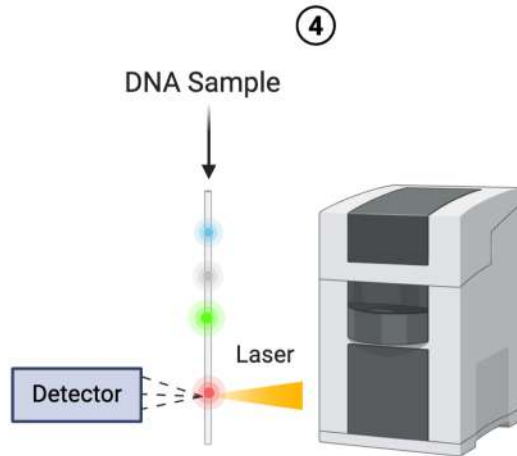
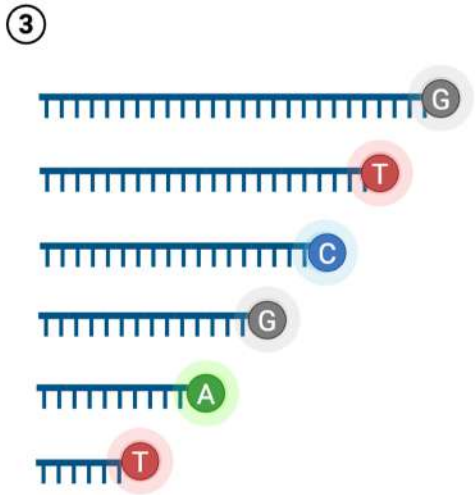
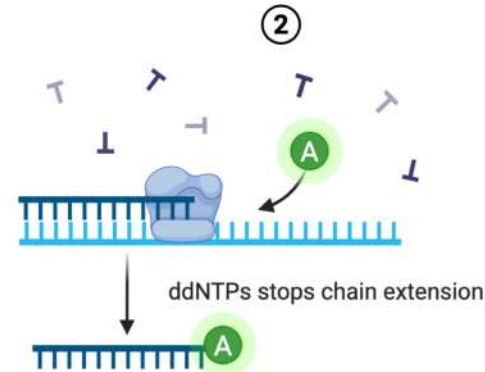
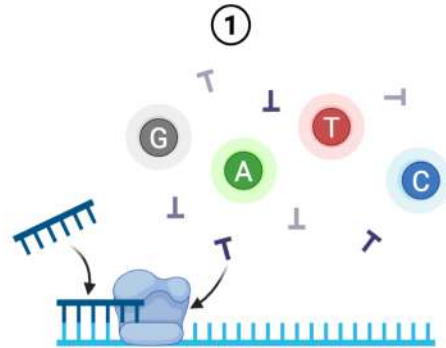
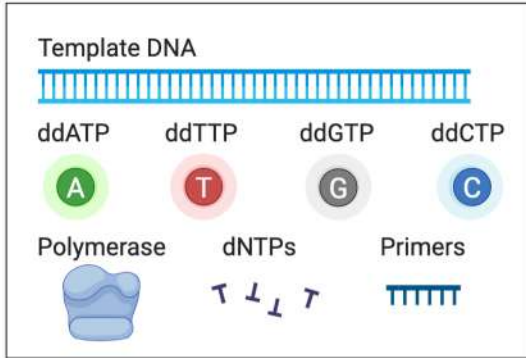


Identificazione mediante sequenziamento



Sequenziamento del DNA con metodo Sanger

Reagenti

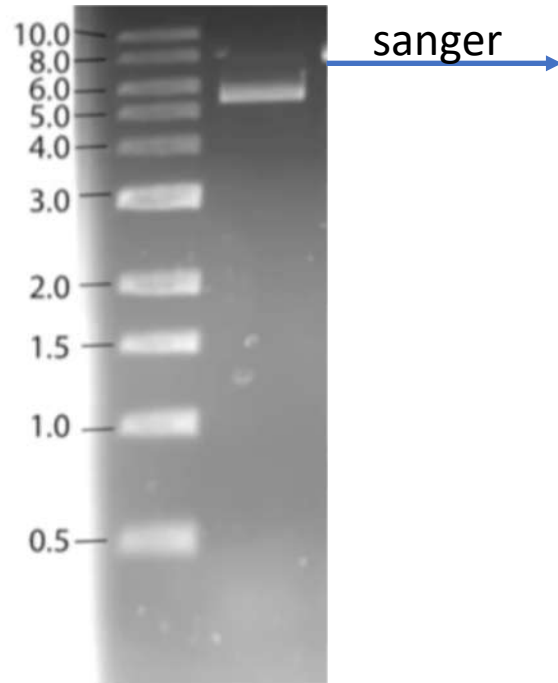


1) l'aggancio del primer alla sequenza bersaglio e l'estensione della catena da parte della DNA polimerasi.

2-3) L'inserimento casuale di nucleotidi modificati (ddNTP), marcati con fluorocromi, interrompe la sintesi generando frammenti di diversa lunghezza.

4) Questi frammenti vengono separati per elettroforesi capillare e analizzati tramite rilevamento fluorescente.

5) Il risultato è un cromatogramma che consente di ricostruire la sequenza nucleotidica originale.



AAGTTTGATTATTGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCACTCTCGTTTAGATTGAAGGAGCTTGCTCCTGATTGATAAACATT
TGAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCCTAAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAAACCTAACACCGCAT
GGTGTAGGGTTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTTAGGATGGACCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGACCGTGATGCATAGCCGA
CCTGAGAGGGTAATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCA
ACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGTATCTGATAGTAACTGATCAGGTAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGC
CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTG
AAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATG
GAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGATGTCTGGTCTGTAACGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTA
AACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGG
AATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGC
TTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTACTAGTTGC
CAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC
TACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTTTAGCTAATCTCTTAAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAA
TCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCCAAAGCCGGTGAGGT
AACCTTCGGGGAGCCAGCCGTCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTC

Database comparison

BLAST

- The number of DNA and protein sequences in public databases is very large

NCBI Protein database has ~38,500,000 protein sequences

- Searching a database** involves **aligning the query sequence to each sequence in the database**, to find significant local alignments

 Download ▾ [GenBank](#) [Graphics](#)

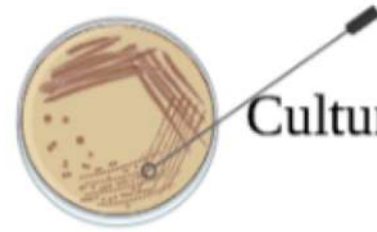
Homo sapiens RNA, 45S pre-ribosomal 5 (RNA45S5), ribosomal RNA

Sequence ID: [ref|NR_046235.1|](#) Length: 13357 Number of Matches: 1

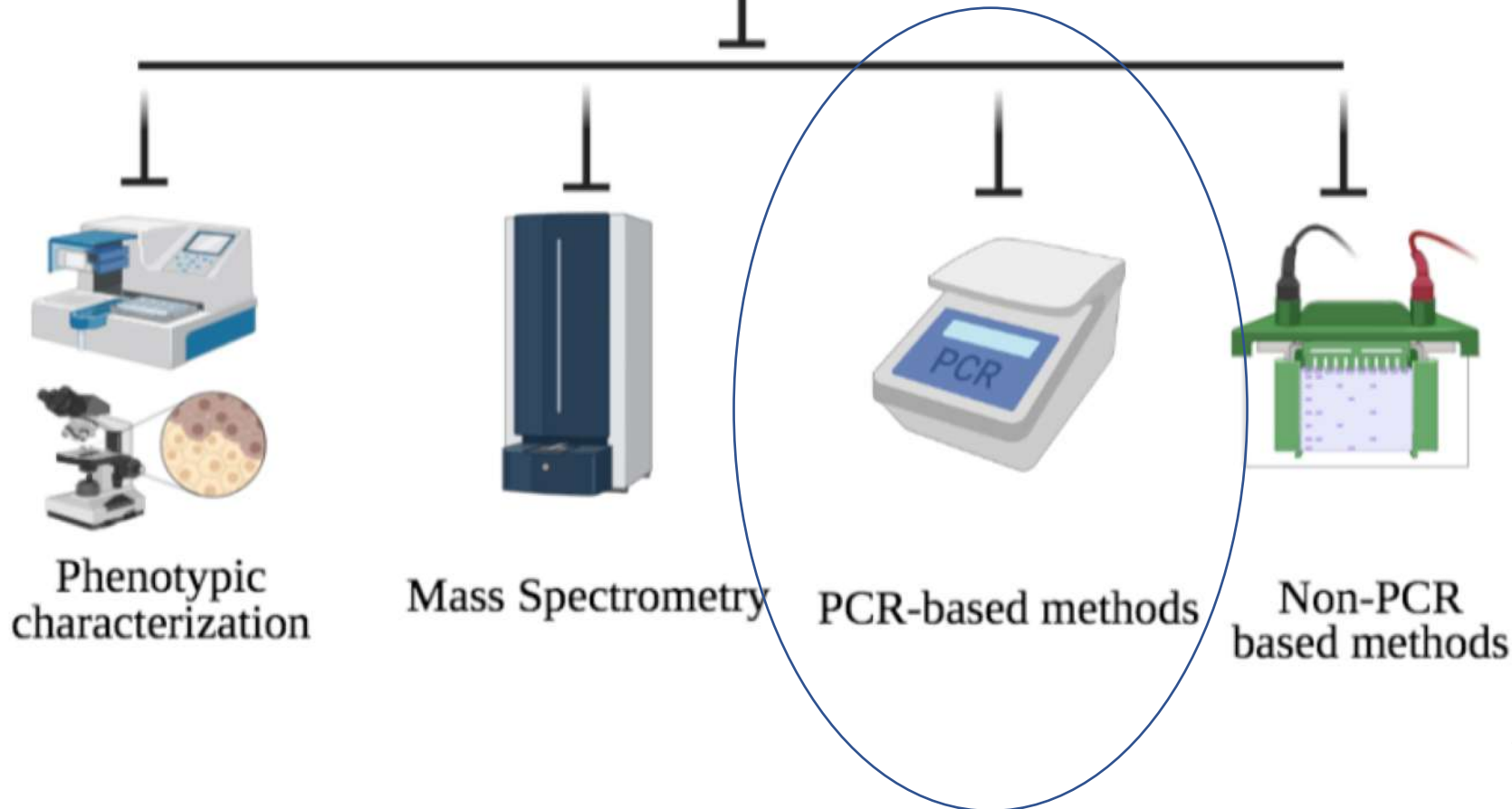
Range 1: 10714 to 10835 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
213 bits(115)	5e-52	120/122(98%)	1/122(0%)	Plus/Minus
Query	39	CCGACCGACCCAGCCCTTAGAGCCAATCCTTATCCCGAAGTTACGGATCCGGCTTGCCGA	98	
Sbjct	10835	CCGACCGACCCAGCCCTTAGAGCCAATCCTTATCCCGAAGTTACGGATCCGGCTTGCCGA	10776	
Query	99	CTTCCCTTACCTACATTGTTCCAACATGCCAGAGGCTGTTACCTTGGAGACCTACTG-G	157	
Sbjct	10775	CTTCCCTTACCTACATTGTTCCAACATGCCAGAGGCTGTTACCTTGGAGACCTGCTGCG	10716	
Query	158	GA	159	
Sbjct	10715	GA	10714	



Cultured microbiota



Phenotypic
characterization

Mass Spectrometry

PCR-based methods

Non-PCR
based methods

DNA or RNA extraction
step!!

Quantitative PCR o Real Time PCR

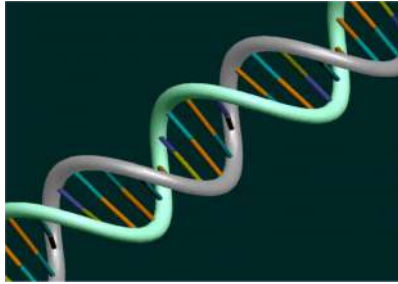
Tecnica che consente la simultanea amplificazione e quantificazione del DNA target

AMPLIFICAZIONE: prevede essenzialmente gli step di una classica PCR

QUANTIFICAZIONE: effettuata aggiungendo composti la cui fluorescenza emessa ad ogni ciclo di reazione è proporzionale alla quantità di amplificato

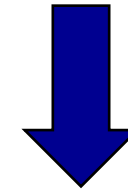
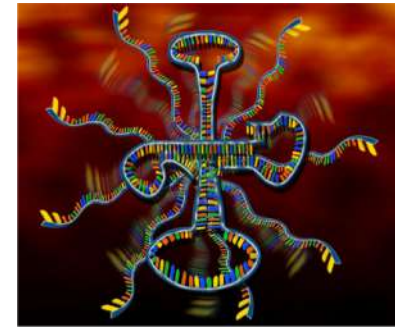
Significato dei target molecolari nello studio delle ecologie microbiche

DNA



Diversità

RNA



ATTIVITA'

Stato vitale non
colturabile?

Applicazioni nella Diagnostica Molecolare

- Microbiologia clinica e microbiologia degli alimenti
- Espressione genica
- Quantificazione virale
- Analisi dei polimorfismi a singolo nucleotide (SNP)
- Oncologia clinica
- Cancro
- Analisi della risposta immunitaria cellulare nel sangue periferico
- Aberrazioni cromosomiche

Identificazione e quantificazione di microrganismi patogeni (batteri, virus, lieviti) in campioni clinici o alimentari.

Rileva **RNA microbico o virale**, anche quando i microrganismi non sono coltivabili.

Permette di distinguere cellule **vive (attive)** da **morte**, poiché l'RNA è presente solo in cellule metabolicamente attive.

*Esempio: rilevazione di *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* o virus enterici negli alimenti.*

Studio del livello di espressione di geni specifici.

L'RNA messaggero (mRNA) viene retrotrascritto in cDNA. Si quantifica quanto un gene è espresso confrontando il suo livello di mRNA con quello di un gene di riferimento.

Esempio: valutazione dell'espressione di geni di virulenza in *Staphylococcus aureus* o di geni di stress ossidativo in batteri lattici.

Single Nucleotide Polymorphism (SNP) analysis

Identificazione di variazioni di singoli nucleotidi nel genoma (mutazioni puntiformi).

Si utilizzano **sonde specifiche** che riconoscono alleli diversi (mutato vs normale).

La RT-PCR rileva la presenza del polimorfismo in geni espressi a livello di RNA.

Esempio: studio di varianti geniche batteriche legate a resistenza agli antibiotici

Real-Time PCR: la reazione

COMPONENTI DELLA REAZIONE:

- 1) DNA target
- 2) DNA polimerasi
- 3) Due oligonucleotidi
- 4) dNTPs
- 5) **Fluorocromo**

Chimiche Real-time PCR

Tutte le chimiche fanno uso di fluorocromi che emettono fluorescenza se eccitati da una luce a determinata λ

Coloranti intercalanti

- ◆ SYBR green
- ◆ Etido bromuro

Sonde specifiche ad ibridizzazione

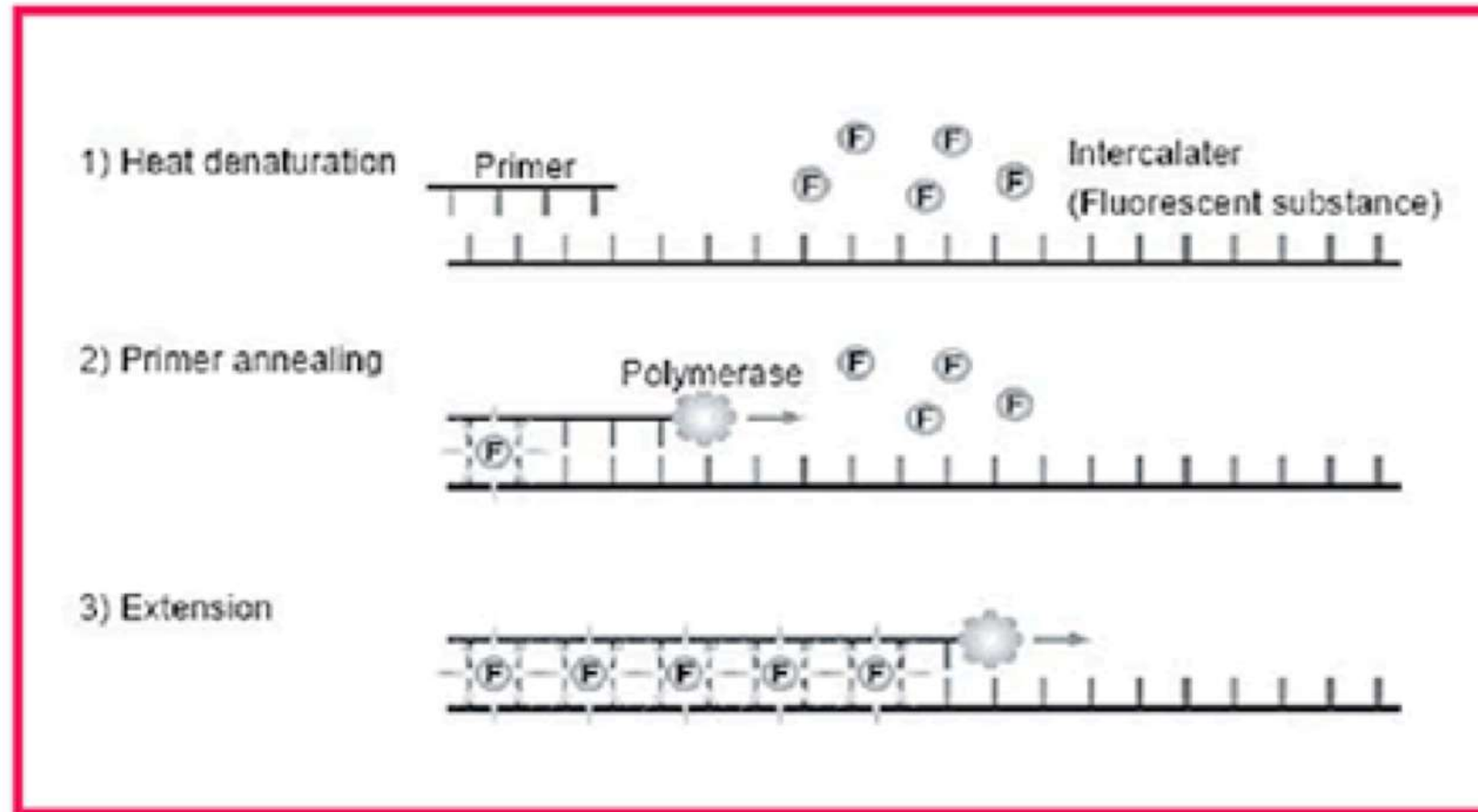
- ◆ TaqMan (sonde di ibridazione con idrolisi)
- ◆ FRET (sonde di ibridazione senza idrolisi)
- ◆ Molecular beacons
- ◆ Scorpion (sonde incorporate nei primers)

Strumentazione Real-time

- ◆ **Termocicizzatore**
- ◆ **Sorgente laser**
- ◆ **Detector**



Chimica della qPCR: SYBR Green



SYBR GREEN

- ◆ L'intercalante emette una bassa fluorescenza quando non è legato a dsDNA
- ◆ Durante l'estensione SYBR Green si lega a dsDNA: il segnale aumenta
- ◆ Durante la denaturazione SYBR Green torna in soluzione: il segnale diminuisce

Chimica della qPCR:

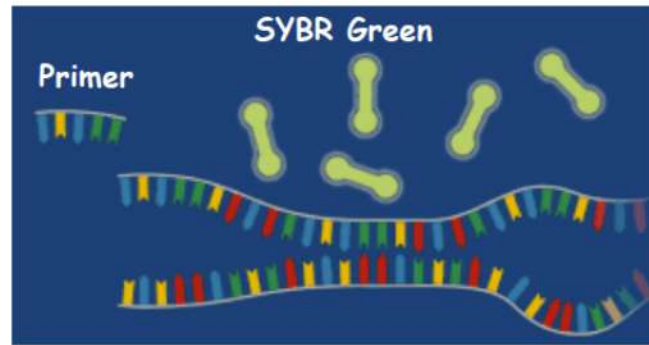
SYBR Green

SYBR Green

E' un colorante fluorescente che si lega solo al DNA a doppio filamento ed emette la fluorescenza solamente in queste condizioni.

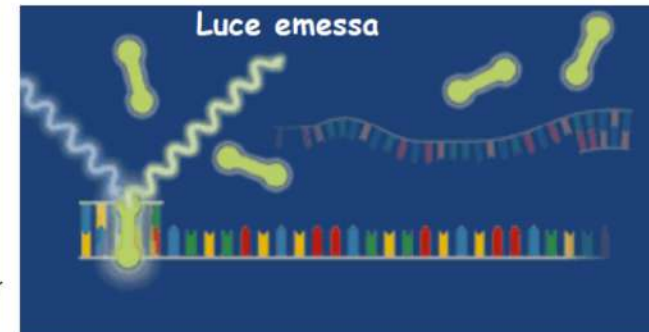
DENATURAZIONE

Non viene rilevata fluorescenza



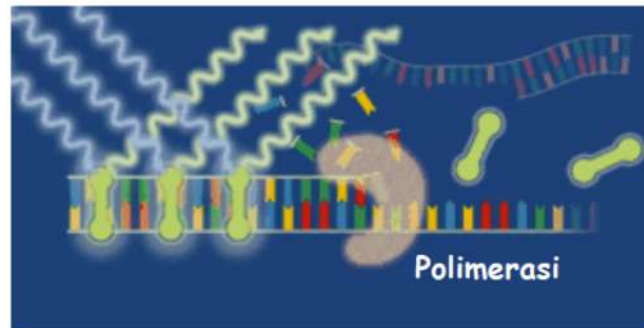
ANNEALING

L' intensità della fluorescenza comincia ad aumentare



ALLUNGAMENTO

L' intensità della fluorescenza continua ad aumentare e diventa massima al termine della fase di allungamento



L' AUMENTO DELLA FLUORESCENZA E' REGISTRATO A 530_{nm}

RT-PCR quantitativa

La fluorescenza emessa ad ogni ciclo di amplificazione viene rilevata e analizzata tramite computer

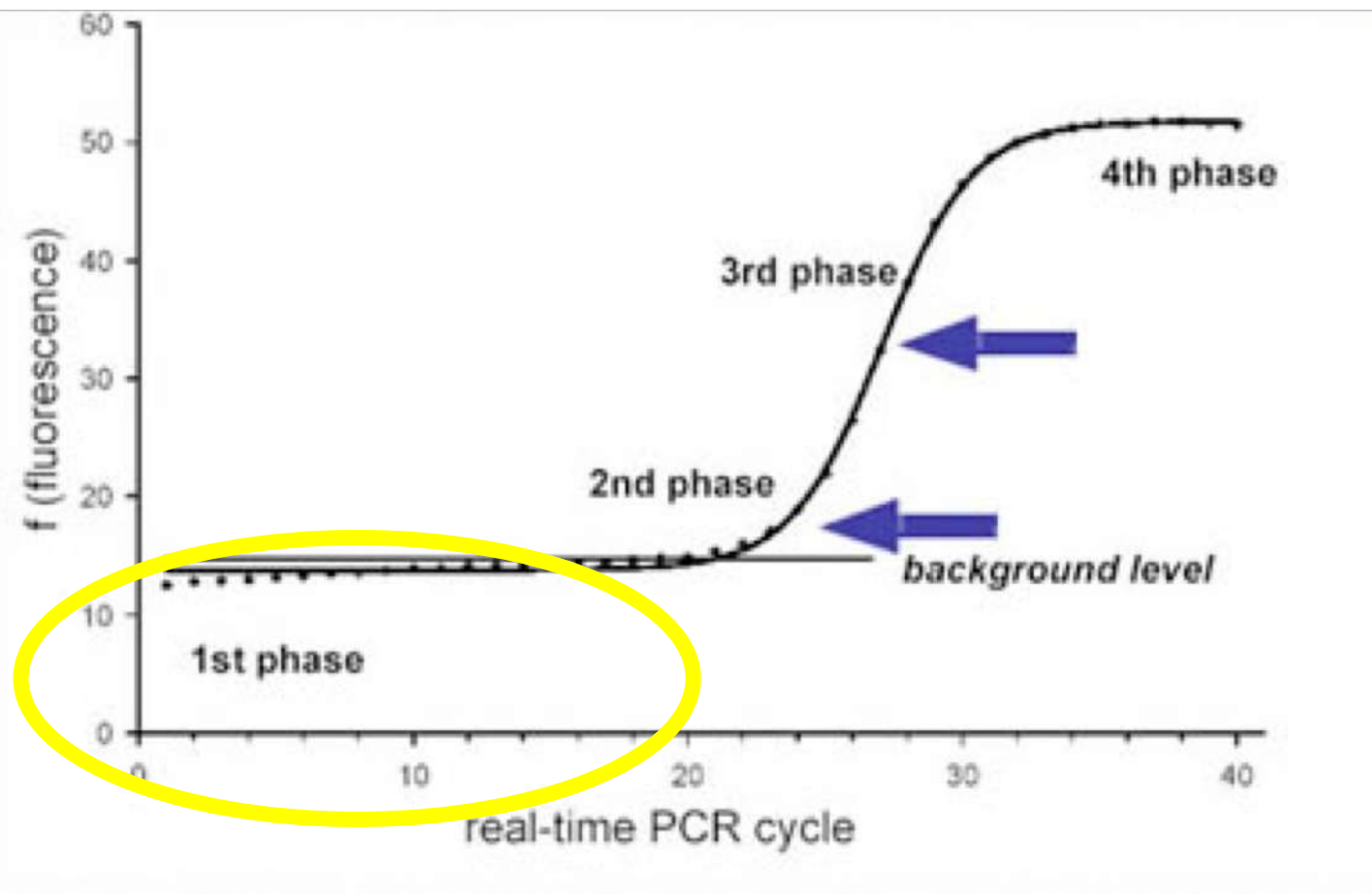
Plot lineare



Cicli di PCR

Durante la reazione, la quantità di DNA prodotto **non cresce linearmente**, ma segue un **andamento caratteristico a fasi**, che si può rappresentare come una **curva sigmoide** (a “S”).

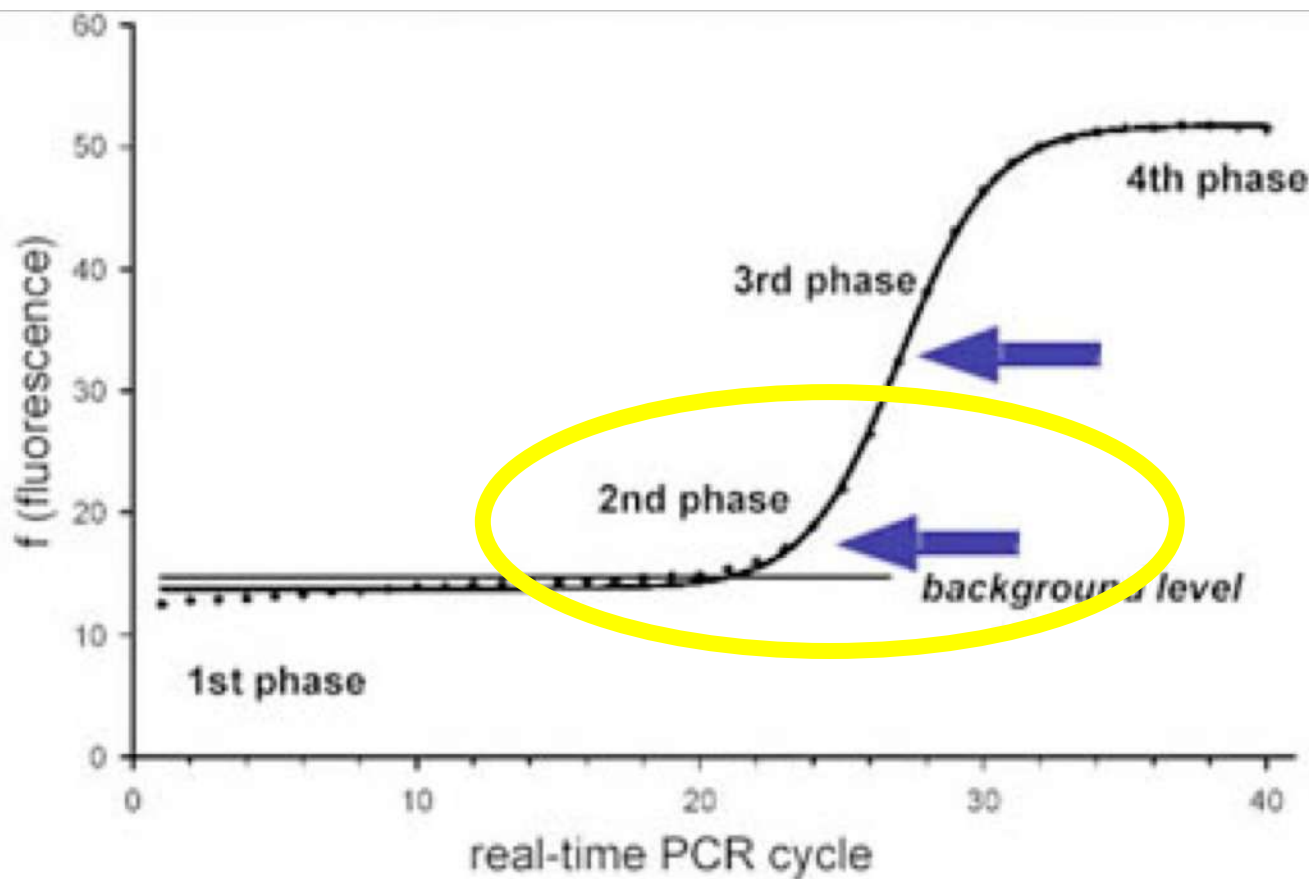
Questa curva descrive come varia la **fluorescenza** (cioè la quantità di DNA amplificato, marcato da coloranti o sonde) in funzione del **numero di cicli** di amplificazione.



1. Fase di background (iniziale o lag phase)

Nei **primi cicli** (circa 1–10), la quantità di DNA è molto bassa.

- La fluorescenza è indistinguibile dal rumore di fondo (background).
- Non si può ancora rilevare un segnale significativo.
- *In questa fase, l'amplificazione avviene, ma il DNA prodotto è troppo poco per essere misurato.*

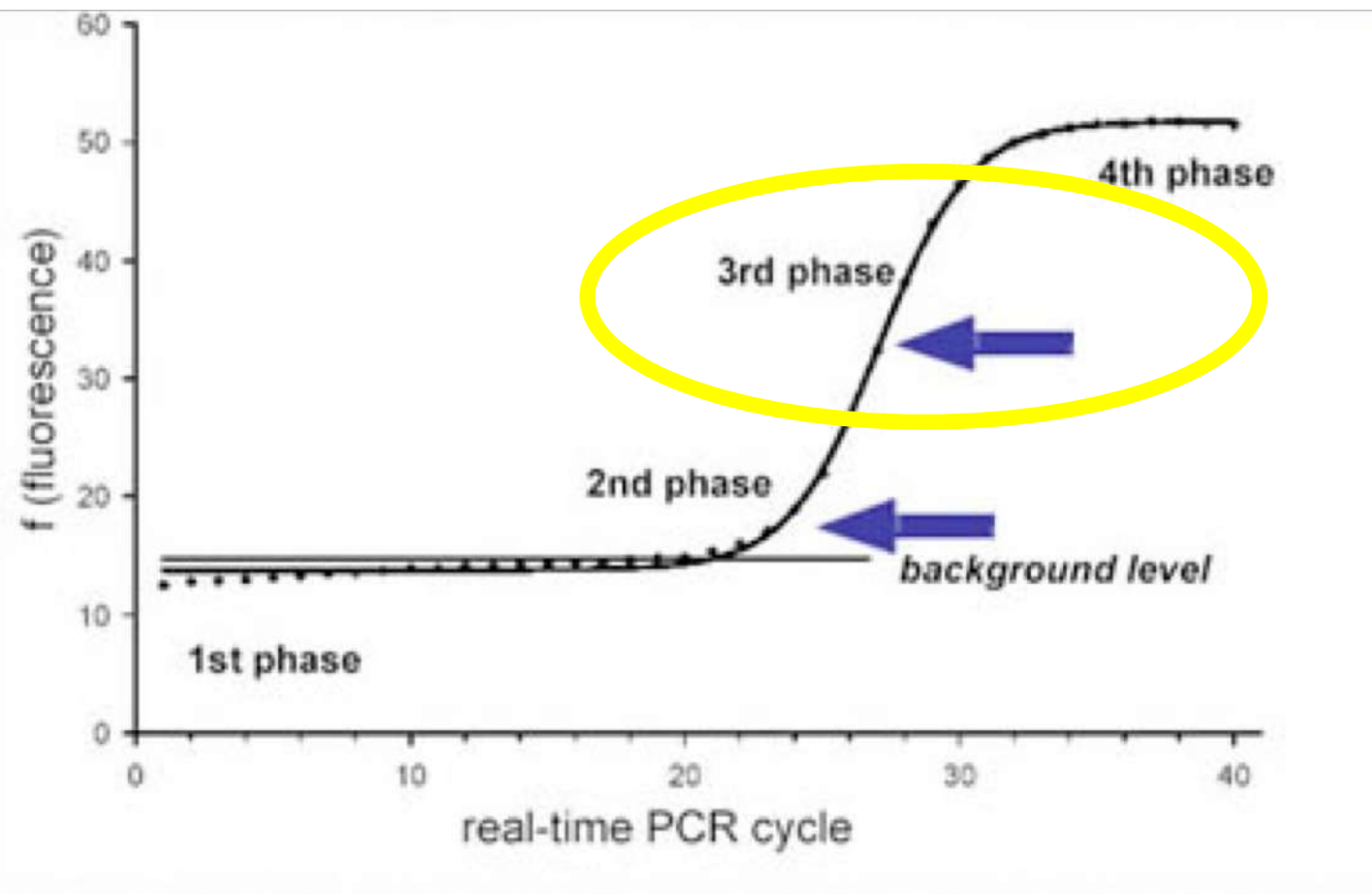


Fase esponenziale

È la parte **centrale e più importante** della curva.

In questa fase, la reazione è **altamente efficiente**: in teoria, ad ogni ciclo la quantità di DNA **raddoppia** (efficienza $\approx 100\%$). La fluorescenza aumenta rapidamente in modo **esponenziale**.

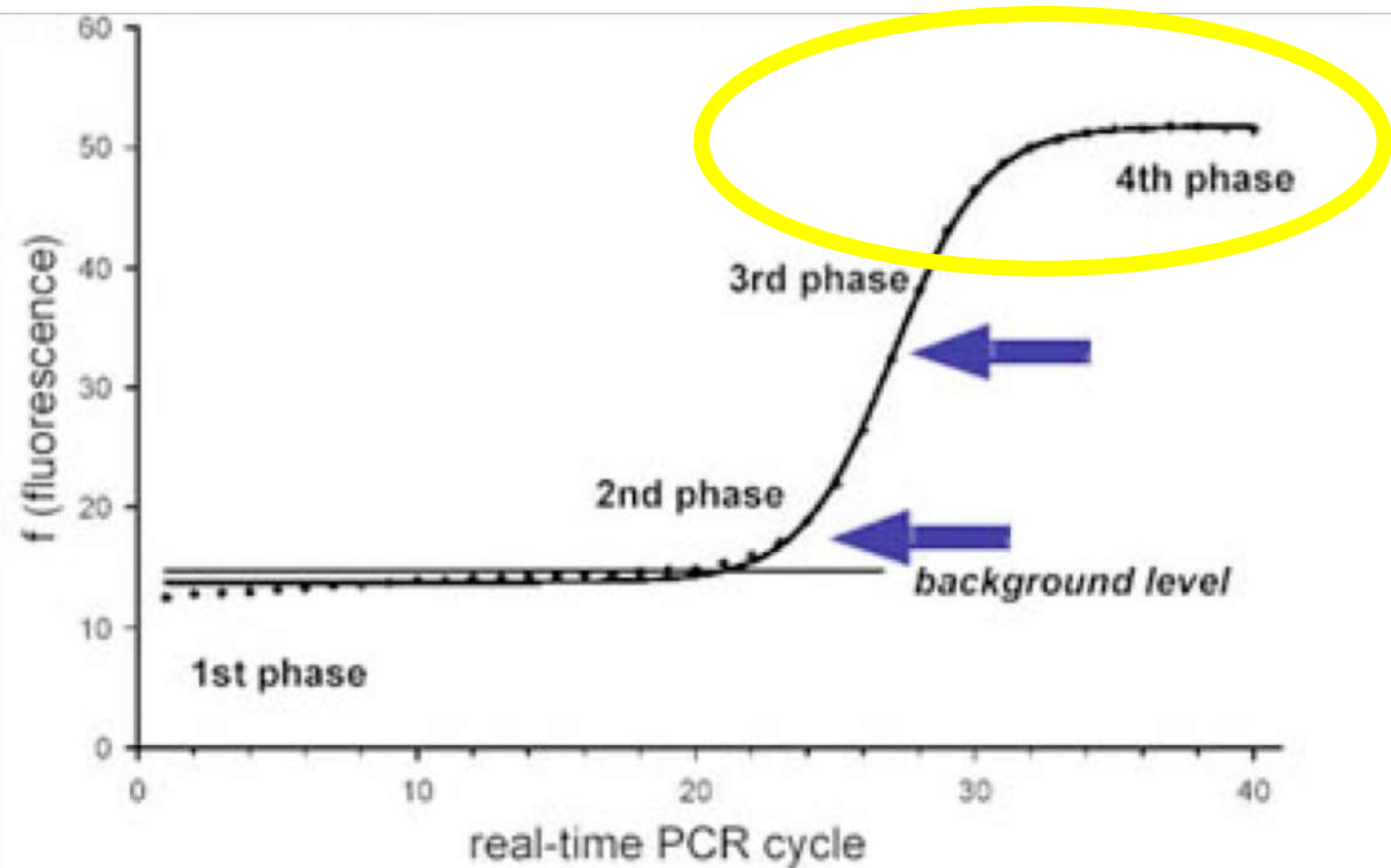
È la fase in cui si misura il segnale per quantificare il DNA iniziale, perché qui la relazione tra quantità di DNA e numero di cicli è lineare su scala logaritmica.



Fase lineare

L'efficienza comincia a **diminuire** perché i reagenti (primer, nucleotidi, enzimi) si stanno esaurendo e i prodotti di PCR iniziano a interferire con la reazione.

L'aumento del segnale rallenta: la crescita non è più esponenziale.

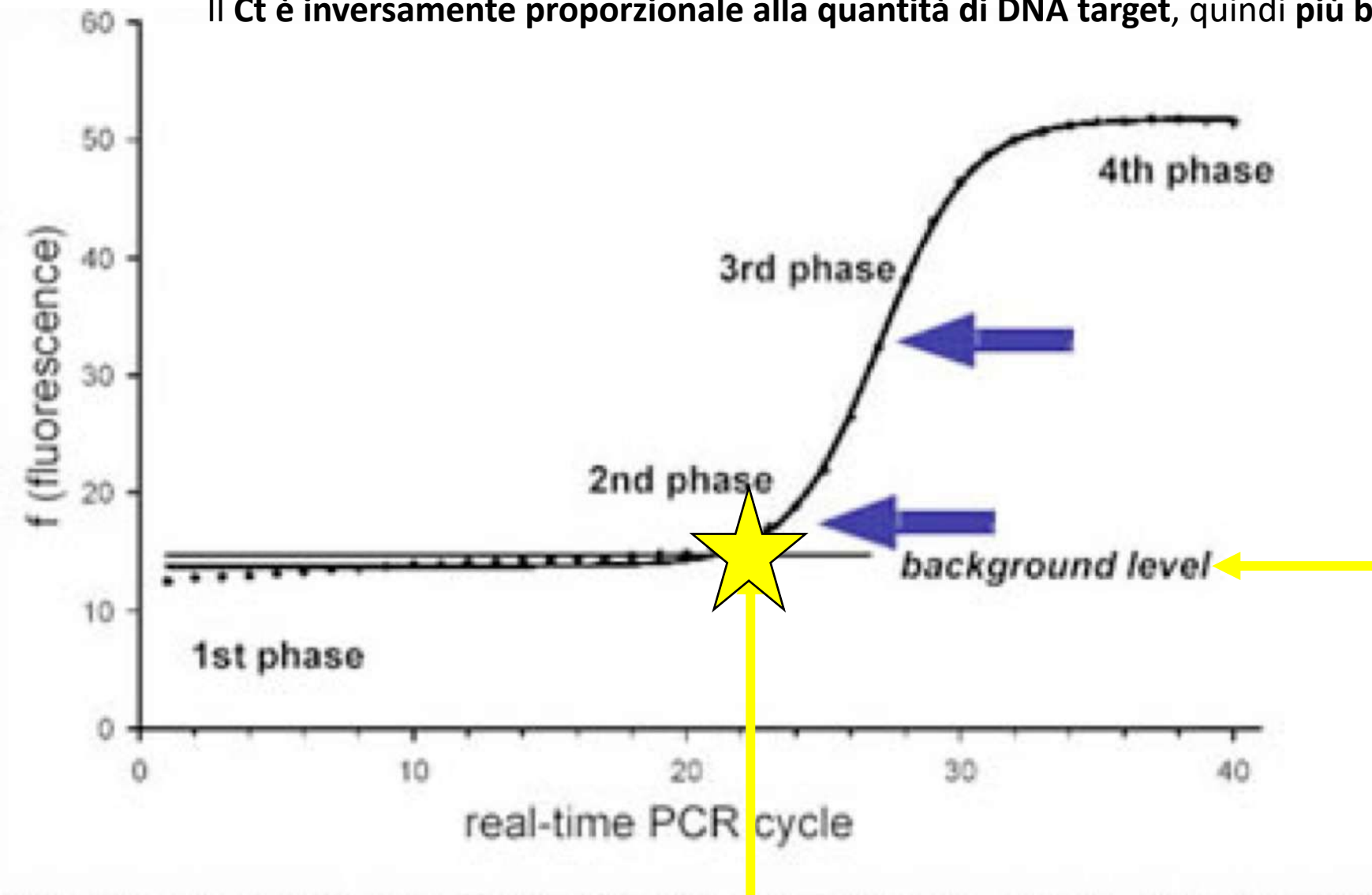


Fase di plateau (saturazione)

Tutti i reagenti sono quasi consumati e l'attività dell'enzima DNA polimerasi cala.

La produzione di nuovi ampliconi si arresta: la fluorescenza si **stabilizza**. Non è più possibile dedurre alcuna informazione quantitativa da questa parte della curva.

Il Ct è inversamente proporzionale alla quantità di DNA target, quindi più basso è il Ct, maggiore è la carica microbica

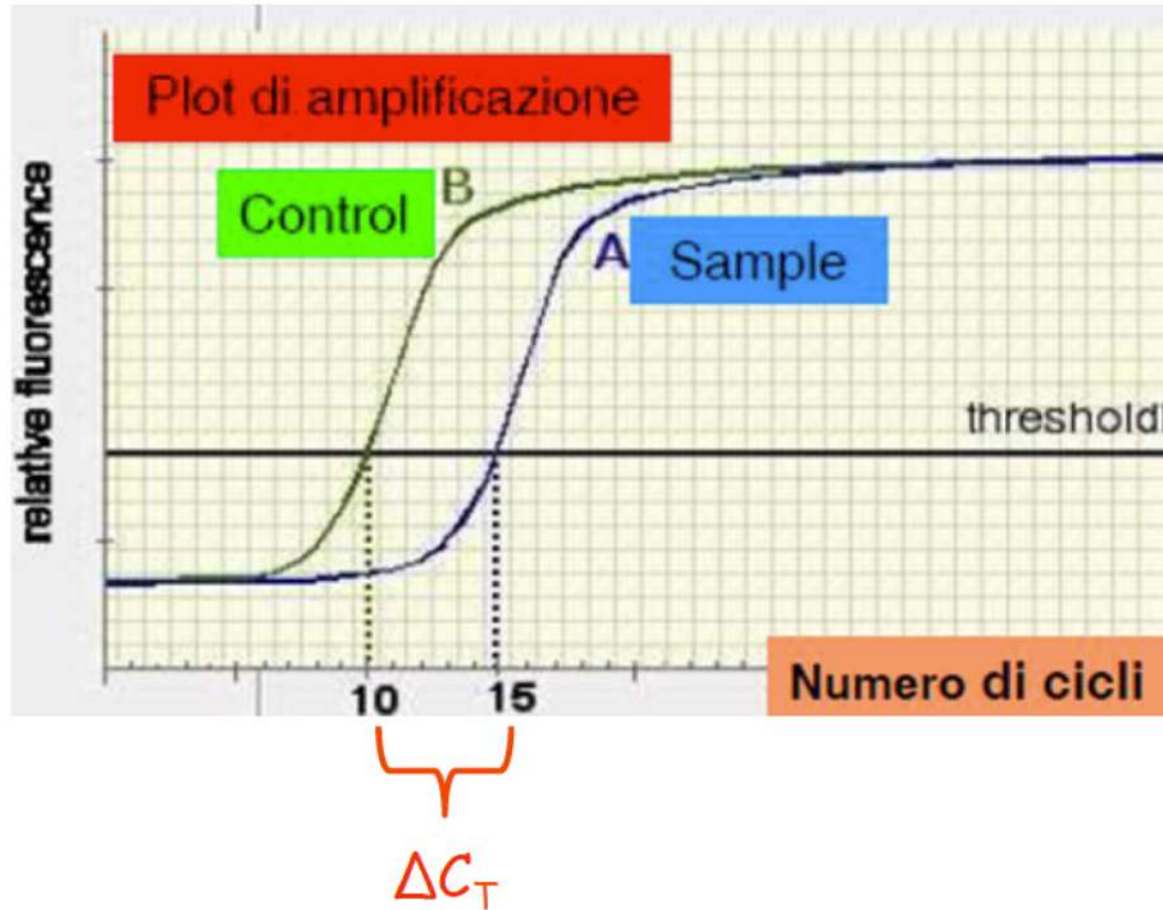


Nella **qPCR**, si definisce un valore di soglia (threshold) che corrisponde a un livello di fluorescenza significativamente superiore al rumore di fondo.

Il **Ct (Cycle threshold)** è il numero di ciclo in cui la curva supera il threshold.

Più **bassa** è la quantità iniziale di DNA, più **tardi** (cioè a un Ct più alto) la curva supera la soglia. Viceversa, campioni con **molto DNA iniziale** mostrano un Ct **più basso**. Il Ct è inversamente proporzionale alla quantità di DNA target, quindi più basso è il Ct, maggiore è la carica microbica

QUANTITATIVA RELATIVA



ΔC_T (Delta Ct) è un concetto chiave nella PCR quantitativa in tempo reale (qPCR), usato per confrontare l'espressione genica o quantificare differenze tra campioni in modo normalizzato.

Serve a **normalizzare** la quantità di un gene di interesse rispetto a un **gene di riferimento** (anche detto *housekeeping gene*), che ha un'espressione stabile in tutte le condizioni sperimentali.

Un ΔC_t basso \rightarrow il gene target ha un C_t simile o inferiore a quello del gene di riferimento \rightarrow quindi è più espresso / più abbondante.

Un ΔC_t alto \rightarrow il gene target ha un C_t molto più alto \rightarrow quindi è meno espresso / meno abbondante.

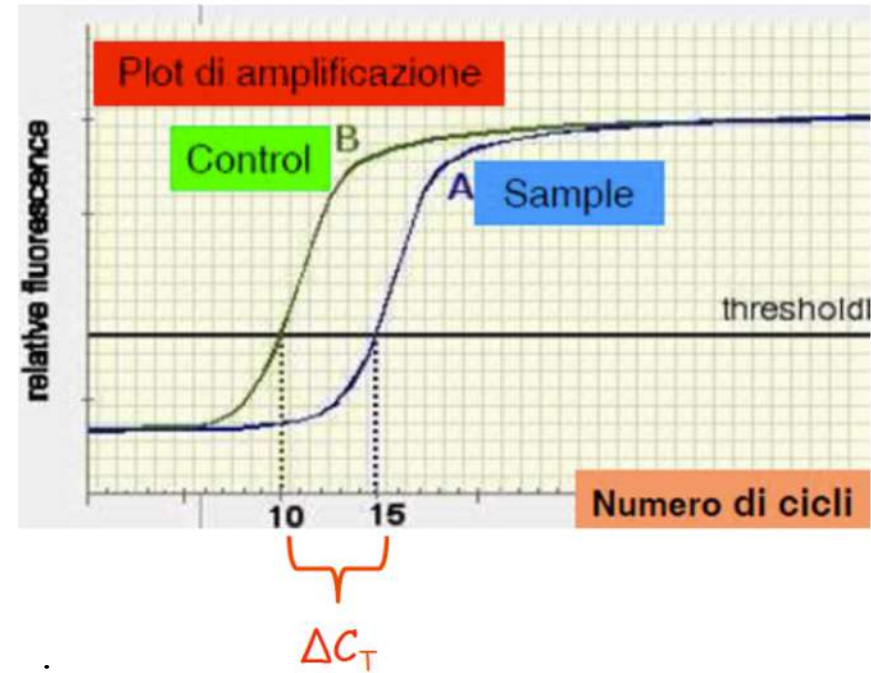
Listeria monocytogenes

- **Obiettivo:** distinguere *L. monocytogenes* (patogena) dalle altre *Listeria spp.*
- **Gene target:** *hlyA* (codifica la listeriolisina O, presente solo in *L. monocytogenes*)
- **Gene di riferimento:** gene 16S rRNA (presente in tutte le *Listeria*).
- **Applicazione ΔC_t :**

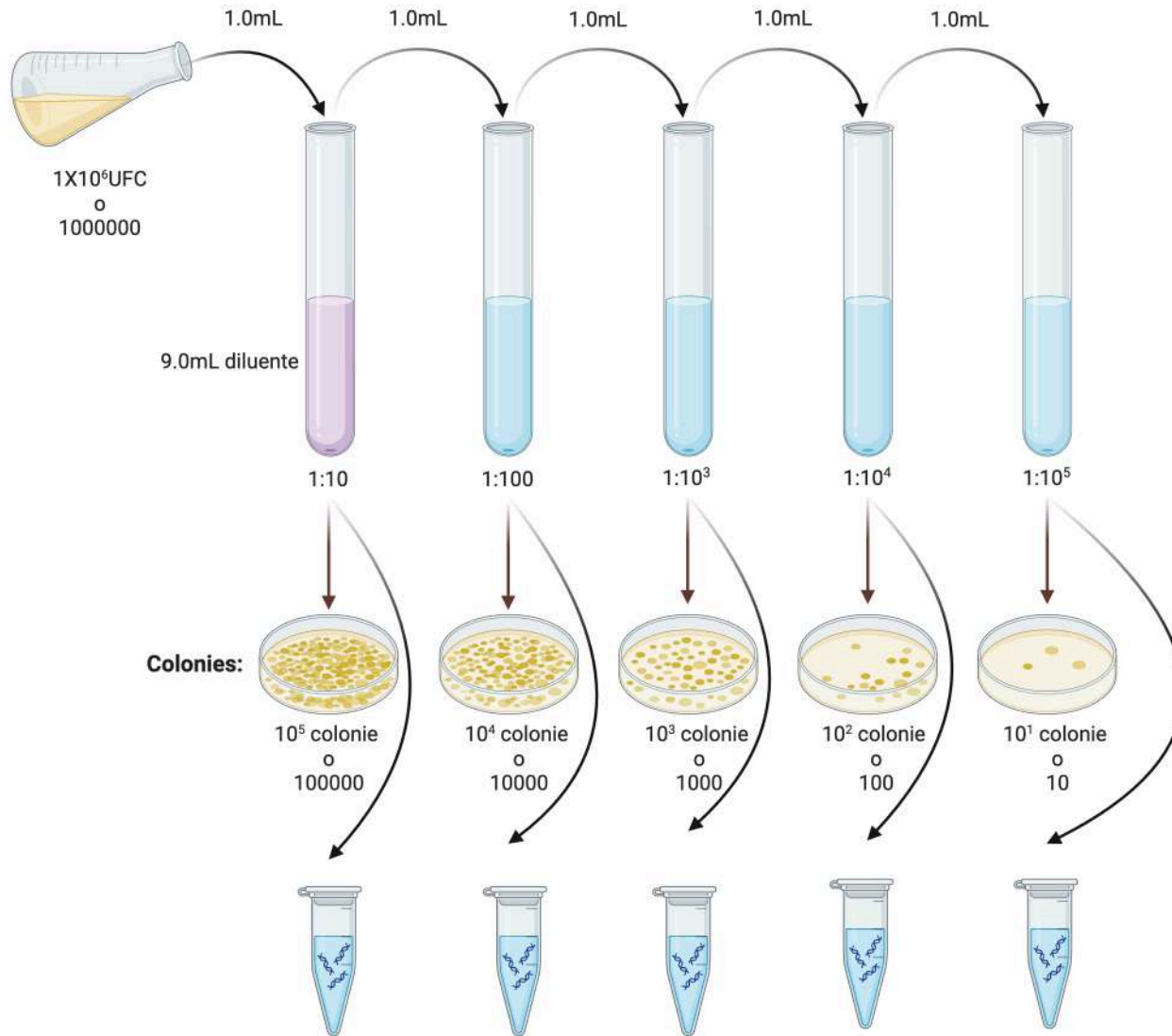
Se il ΔC_t tra *hlyA* e 16S è basso \rightarrow significa che *L. monocytogenes* è presente in quantità significativa.

Se è alto \rightarrow DNA target poco o nulla rilevato \rightarrow assenza o bassa concentrazione del patogeno.

QUANTITATIVA RELATIVA



Real Time PCR quantitativa



Preparare il campione originale

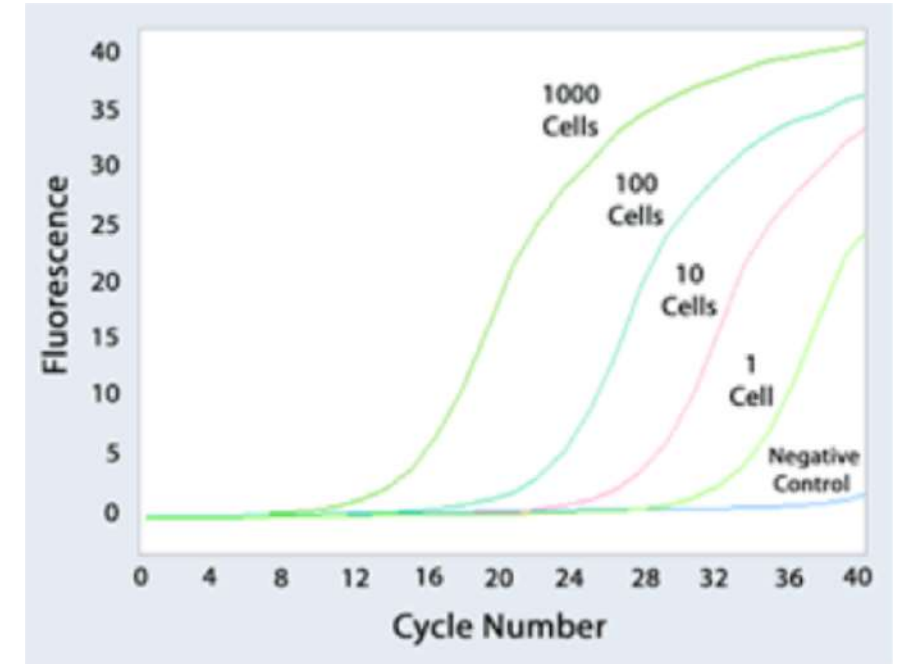
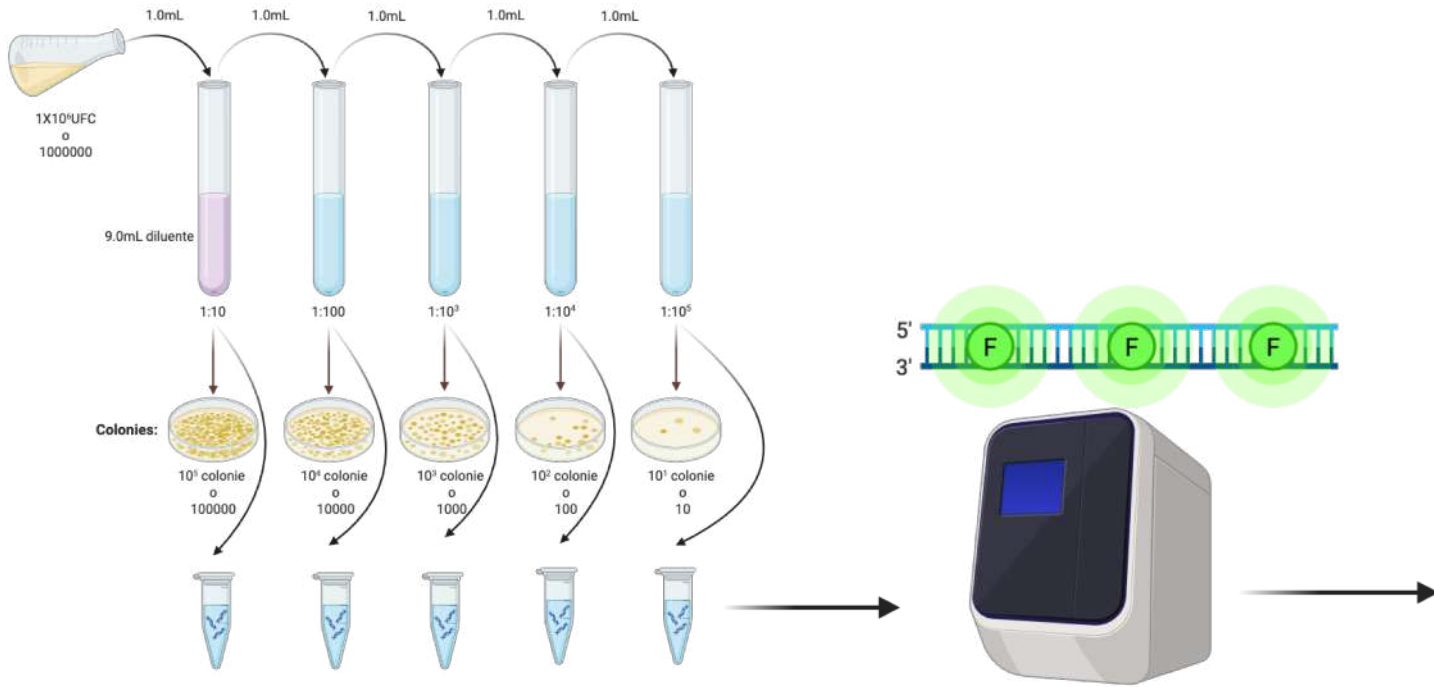
Eeguire diluizioni seriali decimali (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , ...)

Seminare su piastra (preferibilmente in triplicato per ciascuna diluizione).

Incubare e conteggiare le colonie

Calcolare CFU/g per ciascuna diluizione (media dei replicati).

Estrarre DNA da aliquote corrispondenti alle stesse diluizioni

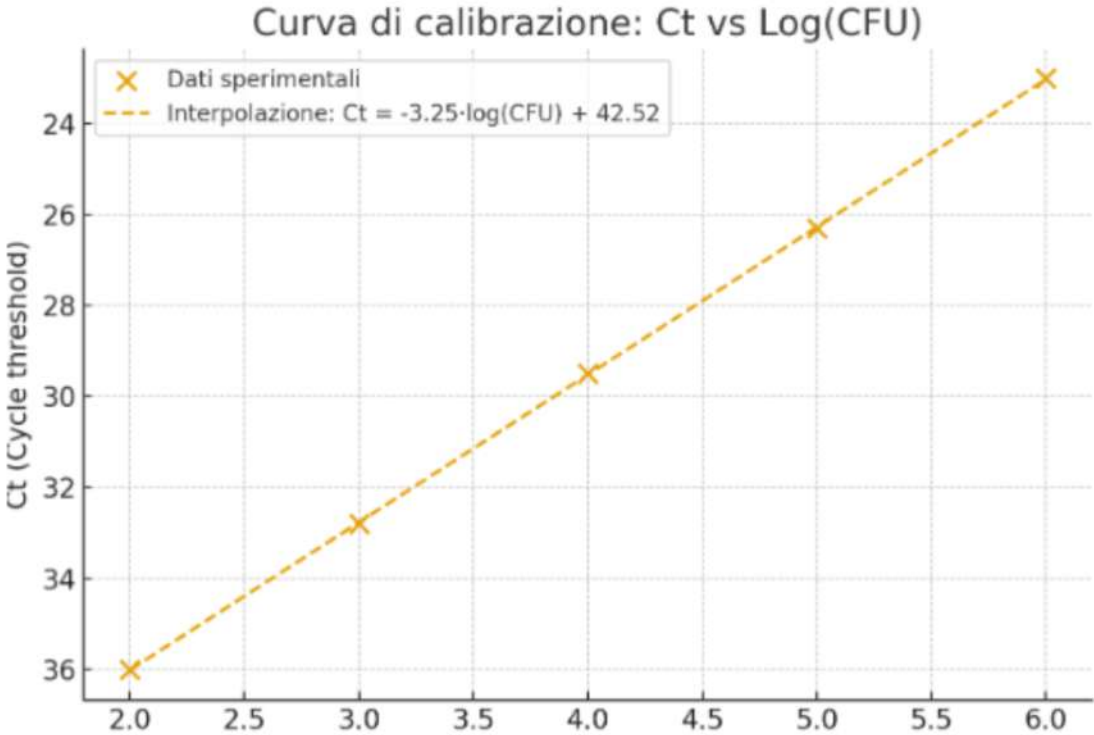


Eseguire RT-qPCR sulle diluizioni e registrare i Ct

Registrare i dati dei CT

costruire una curva standard Ct vs log(CFU) e usarla per stimare una carica incognita.

Campione	Log ₁₀ CFU/g (conteggio culturale)	Ct (real-time PCR)
A	2.0	35.8
B	3.0	32.5
C	4.0	29.2
D	5.0	26.0
E	6.0	22.8
F	7.0	19.5





TAQMAN PROBES

Il sistema TaqMan è costituito da 2 primers + 1 sonda (probe)

Sfrutta l'attività 5' -3' esonucleasica di alcune polimerasi (Taq, Tth, Tfl)

Il probe è costituito da un oligonucleotide marcato con fluorocromi alle estremità 5' e 3'

- *Fluorocromo 5'*  **REPORTER**
- *Fluorocromo 3'*  **QUENCHER**

Durante la reazione polimerasica a catena, l'attività 5'-3' esonucleasica della TAQ polimerasi, libera il reporter con emissione di fluorescenza proporzionale alla quantità del prodotto amplificato.

Sonde usate nella qPCR:

Taqman

TAQMAN PROBES

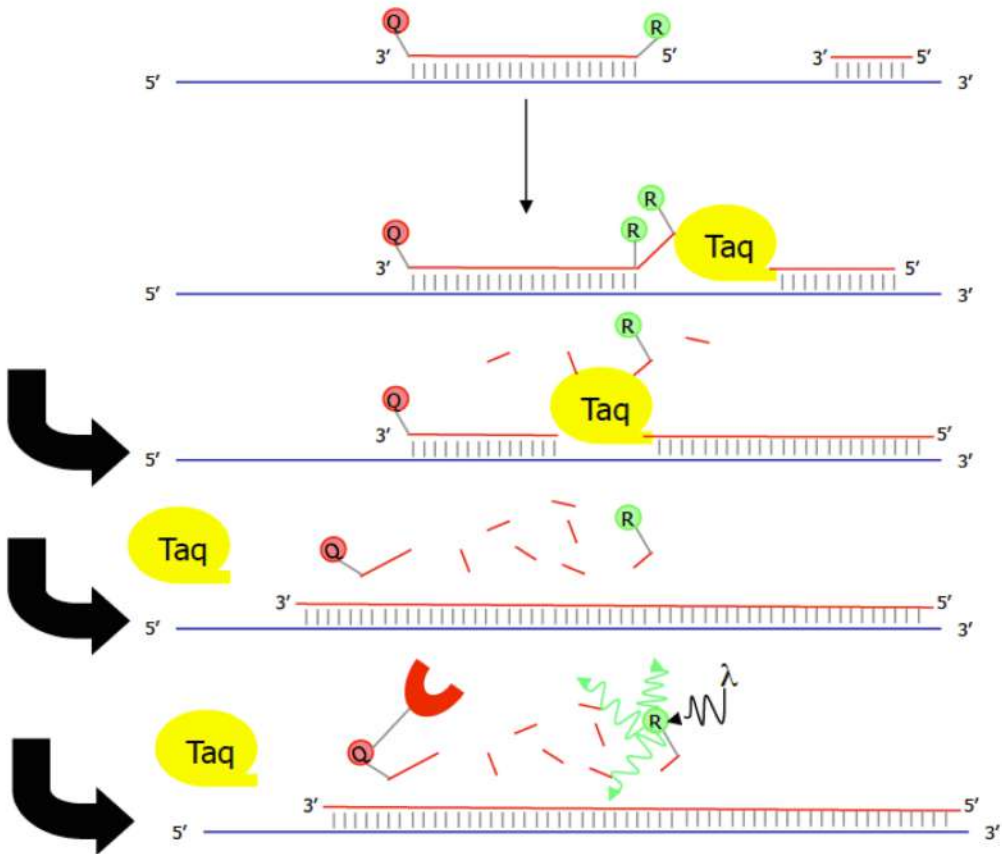
Extension Step

1. Strand Displacement

2. Cleavage

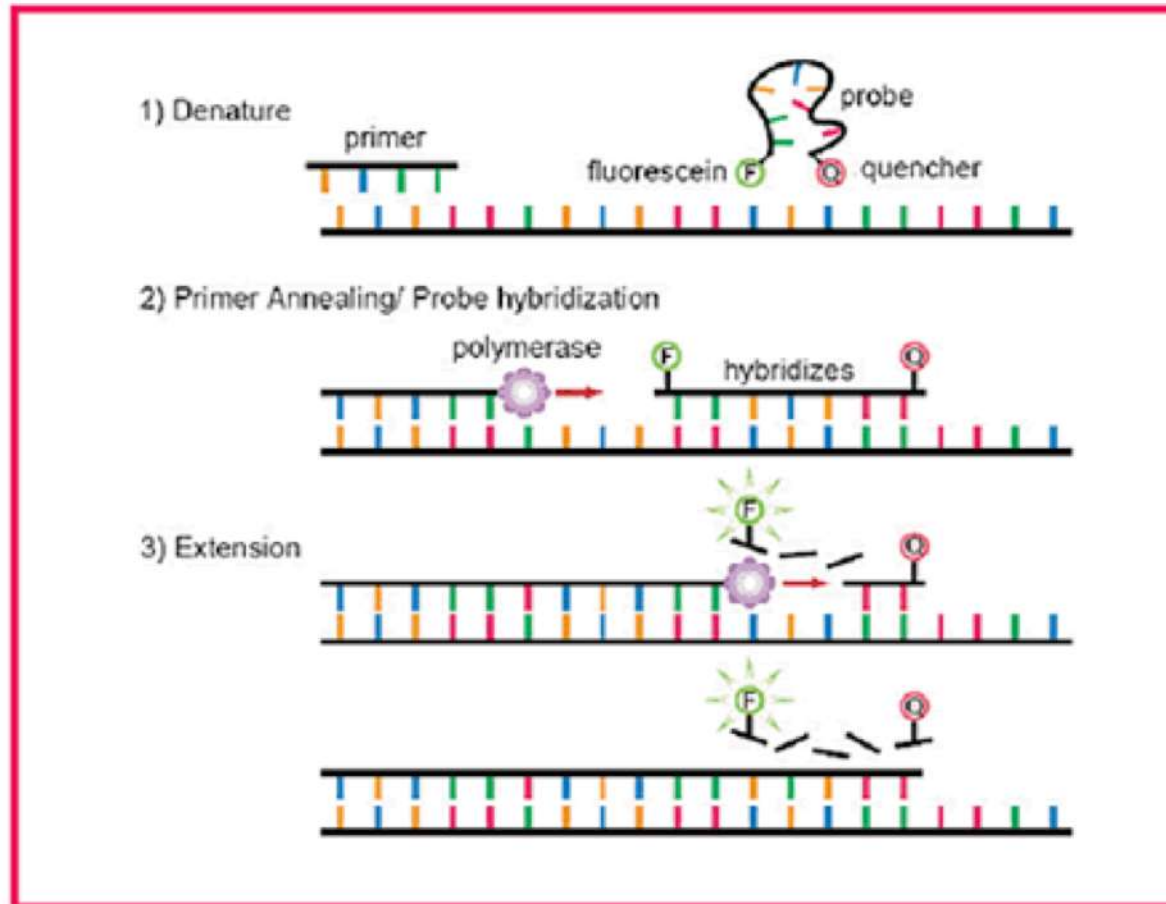
3. Polymerization Complete

4. Detection



La sonda si lega al DNA target **tra i due primer**. Durante l'amplificazione, la **Taq polimerasi** estende il primer. Quando incontra la sonda legata, la polimerasi **taglia la sonda** grazie alla sua attività esonucleasica. Il **reporter** viene liberato dal quencher → emette fluorescenza. L'intensità della fluorescenza aumenta proporzionalmente alla quantità di DNA amplificato.

Chemistry of the qPCR: probes



TaqMan® Probe Method

La sonda TaqMan
è un sensore
fluorescente che
“accende la luce”
solo quando il
DNA target viene
amplificato

Vantaggi

- Il sistema TaqMan produce un robusto segnale cumulativo
- Chimica più utilizzata in real-time
- Mix precostituite per molti saggi TaqMan

Svantaggi

- Il quencher emette fluorescenza
- Elevato background

1. Rilevamento di patogeni alimentari

- *Salmonella spp.*
- *Listeria monocytogenes*
- *Escherichia coli O157:H7*
- *Campylobacter*

2. Quantificazione della carica microbica

Utile per monitorare standard igienico-sanitari.

Serve in studi di shelf-life o deterioramento alimentare

3. Rilevamento di geni di resistenza

Le sonde TaqMan possono mirare a **specifici geni**, come:

Antibiotico-resistenza

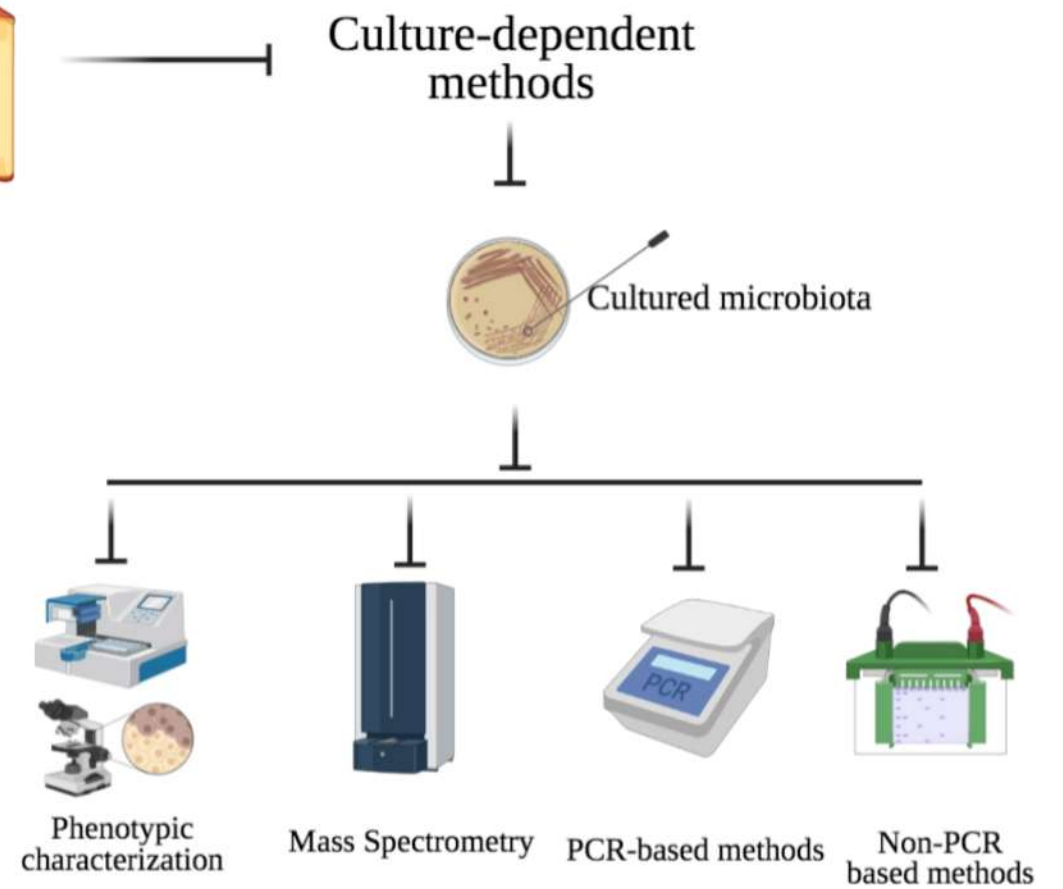
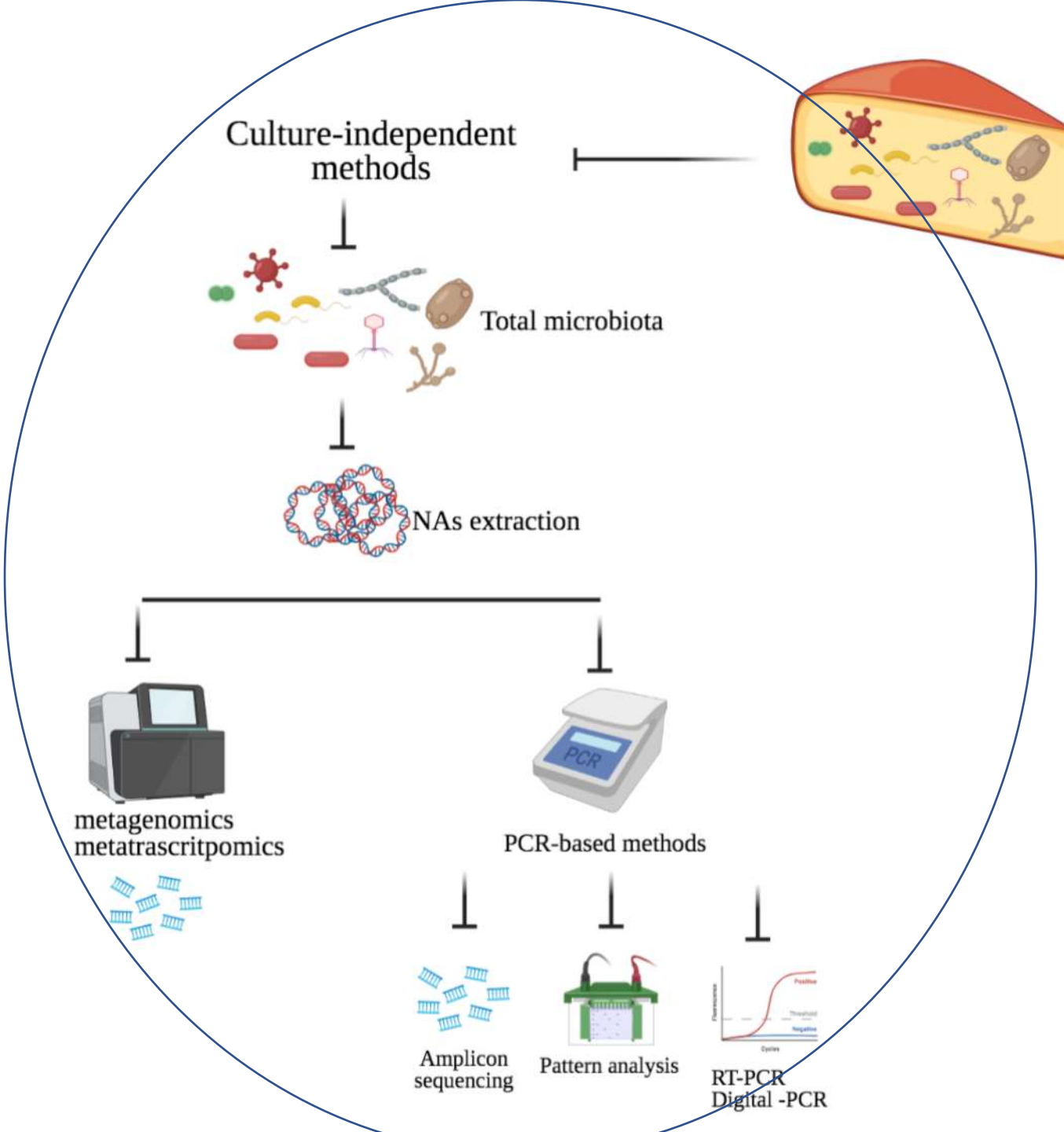
Produzione di tossine (es. geni di enterotossine stafilococciche)

4. Controllo della fermentazione

In alimenti fermentati (yogurt, formaggi, salumi):

Permette di monitorare la popolazione dei microrganismi starter.

Aiuta a mantenere la qualità e la consistenza del prodotto.



L'avvento delle tecniche di biologia molecolare in microbiologia ha essenzialmente rivoluzionato il modo di studiare i microrganismi. Parte della comunità scientifica si è occupata di sviluppare metodiche per l'identificazione e il monitoraggio dei microrganismi negli ecosistemi naturali senza ricorrere al tradizionale isolamento di questi in coltura pura.

Ciò ha lo scopo di risolvere i problemi legati alla difficoltà di isolare i microrganismi, in quanto non sempre è possibile riprodurre in laboratorio le condizioni presenti nella matrice di origine, necessarie per una loro crescita su terreni sintetici.

In altre parole, anziché isolare, purificare e poi identificare i microrganismi, in un approccio coltura-indipendente si procederà direttamente all'estrazione del DNA o RNA microbico dall'ambiente oggetto di studio; l'identificazione tassonomica e l'eventuale monitoraggio saranno realizzati a partire dagli acidi nucleici senza ricorso a mezzi di coltura.