P.O.R.: S.A.F.E.R

Relazione conclusiva

PROPONENTE: ORTOROMI SOCIETA' COOPERATIVA AGRICOLA

VIA PIOVEGA 55
35010 BORGORICCO (PD)
TEL.: +39.049.7480700
FAX.: +39.049.7480800

REFERENTE ORTOROMI: Dr Luca Sgardiolo
mail: luca.sgardiolo@ortoromi.it

REFERENTE VENETO NANOTECH: Dr.ssa Erica Cretaio
mail: erica.cretaio@venetonanotech.it

Il progetto SAFER ha lo scopo di differenziare la produzione della Ditta Ortoromi S.c.a. rispetto a quella dei suoi concorrenti puntando sul controllo della qualità, sicurezza e composizione dei prodotti distribuiti dall'azienda stessa. Infatti, in accordo con le più recenti indagini commissionate dall'EFSA e con l'adeguamento delle normative vigenti, una delle possibili strategie per implementare e consolidare l'espansione di un settore come quello dei prodotti di IV gamma risiede nella possibilità di diversificare i propri prodotti offrendo maggiori garanzie sulla qualità e composizione degli stessi. Questa strategia è perseguibile solo se si sviluppano tecniche innovative che consentano in tempi rapidi e compatibili con la *shelf-life* di questi prodotti di offrire risposte relativamente all'aspetto microbiologico (virus e batteri) e all'assenza di OGM.
I sistemi innovativi basati sullo sviluppo di metodiche di diagnostica molecolare come la RT-PCR consentano di verificare e certificare la sicurezza e la composizione dei prodotti. Queste tecnologie permettono di identificare in modo specifico la presenza di un determinato tratto genetico, associabile a microrganismi o sequenze genomiche di interesse come quelle degli OGM. La tecnologia è in grado non solo di identificare in modo specifico i target di interesse ma anche di stimare il numero di copie presenti. Scopo del progetto è stato quello di disegnare ed ottimizzare tali metodiche su una serie di target di interesse, inoltre si è provveduto a verificare l'idoneità delle metodiche stesse e delle procedure di preparazione del campione in funzione delle specifiche esigenze della ditta Ortoromi S.c.a.
L'attività è stata suddivisa in distinti work packages (WP) (tab.1) di cui vengono sinteticamente decritti i risultati più significativi.

Tabella 1: elenco dei WP

WP1	Ricerca bibliografica
WP2	Disegno in silico RT-PCR
WP3	Validazione RT-PCR mediante genomi
WP4	Disegno e realizzazione ampliconi
WP5	Definizione protocolli processamento campioni
WP6	Verifica campioni artificiali
WP7	Valutazione packaging
WP8	Monitoraggio
WP9	Formazione personale e trasferimento protocolli RT-PCR

Nel primo WP1 è stata effettuata una ricerca bibliografica al fine di individuare tratti genetici riconducibili ai patogeni previsti da normativa, tratti genetici utilizzati nella produzione di OGMs e tratti genetici riconducibili a virus di interesse . Per quanto riguarda i target batterici tale ricerca è stata svolta su:
- *Escherichia coli* e un microrganismo a forma di bastoncello, gram-negativo, aerobio e anaerobio facoltativo, non sporigeno, appartiene al gruppo degli enterobatteri. Al suo interno si distinguono almeno *171 sierotipi* caratterizzati da diverse combinazioni degli *antigeni* O, H, K, F. La sequenza genica di **uidA** e una costante per la specie *E. coli*, che e classificata infatti come beta-D-glucuronidasi- positiva.
- *Escherichia coli EHEC.*COLI ENTERICI (EC) cioè *E. coli* capaci di causare infezioni e tossinfezioni nell'uomo. Tra i patotipi patogenici il ceppo di maggiore interesse risulta essere quello degli STEC, di cui fanno parte anche gli EHEC (come ad esempio *E. Coli* O157:H7). Il fattore di virulenza tipico per tale ceppo di EC risultano essere le cosidette SHIGA-TOXIN (formalmente note come Shiga-like toxin o verotoxin) ***stx1 ed stx2***. E' tuttavia emerso che dalla pratica su campo, in un numero piuttosto significativo di casi la positivita

SEDE LEGALE: Piazza Salvemini, 13 I-35131 Padova
C.F., n.ro iscrizione Reg. Imprese e P.IVA: 03845260284
PEC: certificata@pec.venetonanotech.it
www.venetonanotech.it

SEDE AMMINISTRATIVA:
c/o CNR, Corso Stati Uniti, 4 I-35127 Padova
Tel. +39 049 8538800 fax +39 049 8538803
info@venetonanotech.it

ad stx1 ed stx2 di un campione non e sufficiente a portare all'identificazione di *E. coli* enteropatogeno, in quanto tali fattori di virulenza possono essere trasportati tramite fagi lisogeni: l'eventuale positività ad stx1 e 2 potrebbe quindi essere indicativa della presenza di *E. coli* enteropatogeno, ma anche solamente di fagi lisogeni Si è ritenuto quindi opportuno valutare la possibilità di affiancare lo *screening* di stx1 e 2, fattori classici di virulenza per EHEC, alla presenza del gene ***eaeA*** (*intimin adherence protein*), gene localizzato su cromosoma di *E. coli* EHEC e tipicamente quindi non veicolato da fagi lisogeni.
- Listeria e un genere di batteri che comprende ad oggi dieci specie conosciute alcune innocue alcune patogeniche. Per quanto riguarda Listeria specie il gene **23S** risulta essere la regione più conservata capace di permettere un 'identificazione della specie.
-*L. monocitogenes*, batterio Gram positivo, asporigeno, aerobio-anaerobio facoltativo, mobile a 28 °C per la presenza di flagelli peritrichi (da 1 a 5), catalasi positivo ma ossidasi negativo. La sua denominazione deriva dal quadro di monocitosi ematica tipico dell'infezione, causata attraverso un meccanismo non completamente noto. il gene di patogenicità **hly** risulta essere il tratto più selettivo per l'identificazione di questo patogeno.
- *Salmonelle* sono bacilli Gram-negativi, asporigeni, anaerobi facoltativi. Fermentano il glucosio, producendo gas (acido solfidrico), riducono i nitrati e non producono citocromo-ossidasi. La maggior parte non fermenta il lattosio. Possedendo flagelli peritrichi, sono tutte mobili tranne S.Gallinarum-Pullorum.
La regione di maggior interesse codificante un fattore di virulenza conservato è quella dell' ***InvA*** (*Invasion factor A*) su cui si è deciso di disegnare la reazione di RT-PCR .
I target virali oggetto di analisi appartengono al gruppo dei virus a ssRNA (Norovirus e Virus dell'epatite A).
-*Norovirus* sono virus a singolo filamento di RNA, appartenenti alla famiglia dei *Caliciviridae* e responsabili della patogenesi infettiva di gastroenteriti di origine alimentare. Si tratta di virus non coltivabili attualmente suddivisi in quattro genotipi da GI a GIV. Il Per quanto riguarda i *Norovirus GI e GII* la regione di interesse per il disegno della RT-PCR è la regione **RdRp.**
- *Virus epatite A (HAV)* . Si tratta di virus a RNA appartenente agli *Hepatovirus*, un genere della famiglia dei Picornaviridae. HAV si trasmette quasi esclusivamente per via oro-fecale, generalmente mediante l'ingestione di acqua o cibo contaminato. Il tratto genetico di maggior interesse per il disegno della reazione di RT-PCR è la regione **5' NTR** (5' untranslated region).
Gli organismi geneticamente modificati (OGM) sono contraddistinti dalla presenza di tre caratteristiche genetiche: presenza di un plasmide (molecola di DNA circolare a doppio filamento) contenente sequenze codificanti per il gene d'interesse (transgene) , sequenze che fungono da promotori per l'espressione del transgene ,sequenze di selezione (in genere una resistenza a particolari antibiotici) che permettono l'identificazione dei semi trasfettati . Gli GM per radicchio (*Cichorium intybus*) non sono attualmente in commercio in Europa, ma esistono 3 radicchi GM identificati dagli eventi di trasformazione e nominati come RM3-3, RM3-4, RM3-6. Queste varianti presentano un plasmide contenete come transgene la il glufosinato e come sequenza di selezione il gene nptII (neomycin phosphotransferase II). Il tratto genetico su cui è stato effettuato il disegno della RT-PCR è il gene nptII.
Nel WP2 e WP4 si è proceduto al disegno e alla verifica *in silico* mediante metodologie bioinformatiche delle reazioni di RT-PCR cioè delle coppie di primers e probe necessari e all'identificazione dei tratti genetici di interesse.

Tabella 2: primers e probe RT-PCR.

	Primer Fw	Primer Rev	Probe
E.coli uidA	GTGTGATATCTACCCGCTTCGC	AGAACGGTTTGTGGTTAATCAGGA	FAM-TCGGCATCCGGTCAGTGGCAGT-TMR
E.coli	GTTCCGGAATGCAAATCAGTC	CTCTGTATCTGCCTGAAGCGTAA	FAM-CAGAGCAGTTCTGCGTTT–TMR

SEDE LEGALE: Piazza Salvemini, 13 I-35131 Padova
C.F., n.ro iscrizione Reg. Imprese e P.IVA: 03845260284
PEC: certificata@pec.venetonanotech.it
www.venetonanotech.it

SEDE AMMINISTRATIVA:
c/o CNR, Corso Stati Uniti, 4 I-35127 Padova
Tel. +39 049 8538800 fax +39 049 8538803
info@venetonanotech.it

eaeA		G	
E.coli Stx1	CTGGATTTAATGTCGCATAGCG	AAGAACGCCCACTGAGATCATC	FAM-CTGACGCAGTCTGTGG-TMR
E.coli Stx2	GTTCCGGAATGCAAATCAGTC	CTCTGTATCTGCCTGAAGCGTAAG	FAM-CAGAGCAGTTCTGCGTTT–TMR
Lis. Sp	AGGATAGGGAATCGCACGAA	TTCGCRAGAAGCGGATTT	FAM-TCTCACACTCACTGCTTGGACGC-TMR
Lis. mono.	CATGGCACCACCAGCATCT	ATCCGCGTGTTTCTTTTCGA	FAM-CGCCTGCAAGTCCTAAGACGCCA-TMR
Salmonella	AGGAAACGTTGAAAAACTGAGGA	TCGTCATTCCATTACCTACC	FAM-TCTGGTTGATTTCCTGATC-TMR
Noro GI	CCATGTTCCGCTGGATGC	TCCTTAGACGCCATCATCAT	FAM-TGGACAGGAGAYCGCRATCT-TMR
Noro GII	CAAGAGCCAATGTTCAGRTGGATGAG	TCGACGCCATCTTCATTCACA	FAM-TGGGAGGGCGATCGCAATCT-TMR
HAV	AGGCTACGGGTGAAACCT	AATATCCGCCGCTGTTACC	FAM-CCAARGCATCTCTTCATAGAAGTATTAGCC-TMR
nptII	CGAGGATCTCGTCGTGACACAT	GATAGCGGTCCGCCACAC	FAM-TTTCCACCATGATATTCGGCAAGCAGG-TAMRA

Parallelamente si è inoltre proceduto (WP4) al disegno e alla validazione degli ampliconi cioè di tratti genetici contenenti le reazioni da produrre mediante l'impiego di coppie di primers esterni e quindi fiancheggianti la regioni entro cui è sono disegnate le varie RT-PCR. Tali sequenze di DNA sintetiche prodotte mediante PCR sono utilizzate per valutare le performance della metodica e fungono da controlli positivi della reazione.

Tabella3: primers ampliconi

	Primer Fw	Primer Rev
E.coli uidA	CGGGTGAAGGTTATCTCTA	CTTCAGCGTAAGGGTAATG
E.coli eaeA	ACATTGACTCCCGCTTTACG	AATGCCGGATATGACGGTAG
E.coli Stx1	ACCACGTTACAGCGTGTTG	TCCATGATAGTCAGGCAGG
E.coli Stx2	TACCACTCTGCAACGTGTCG	CCCACTCTGACACCATCCTC
Lis. Sp	GATGGACAACAGGTAGAGATTCC	CCGAGTTCCTTAACGAGAGTTC
Lis. mono.	GGCAAACGGTATTTGGCATTAT	GCACATTTGTCACTGCATCTC
Salmonella	CTATCGCCAATAACGAATTGC	GATTCTGGTACTAATGGTGATGATC
Noro GI	TGATTTCACTTCTAGGGGAAGC	ATCCATTGCAAGAGGGTCAG
Noro GII	ACGGCCCAACATTCTACAGT	CAGGGGTCAATCACATTTTG
HAV	ATCTTCCACAAGGGGTAGGC	ACCTCAGAGGCAAACACCAC
nptII	TTCGACCACCAAGCGAAAC	CGCCAAGCTCTTCAGCAATA

Infatti la reazione di amplificazione condotta in presenza dello specifico amplicone è in grado di stabilire quale è il limite di rilevabilità della metodica, valutare l'integrità dei singoli componenti e quindi agire da controllo interno evidenziando possibili deterioramenti dei consumabili che si associa ad una diminuzione nelle performance della metodica. Inoltre questi tratti sono stati impiegati anche come *spike* , cioè come contaminati per verificare ed ottimizzare le procedure di processamento dei campioni.
La congruità degli ampliconi prodotti rispetto all'atteso è stata valutata sia mediante elettroforesi capillare che mediante procedure di sequenziamento (fig.1)

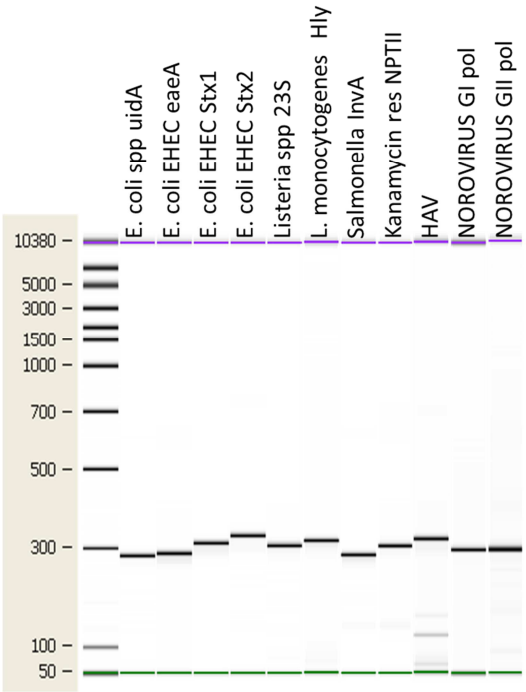

Fig.1 Elettroforesi capillare degli ampliconi.

Le attività sperimentali di ottimizzazione dei protocolli e di verifica delle performance delle metodiche sono state svolte entro il WP3 mediante impiego degli ampliconi e ove possibile anche di genomi ATCC o isolati ambientali. Ciascuna metodologia è stata quindi ottimizzata in termini di concentrazioni dei singoli reagenti e dei buffer in modo da ottenere un unico protocollo di analisi del campioni indipendentemente dalla matrice di origine o dalla tipologia di target da analizzare. Lo schema di reazione per ciascun comune è schematizzato nella tabella 4.

Tabella 4: ciclo termico RT-PCR

Ciclo termico			
Fasi	**Temperatura (°C)**	**Tempo**	
Step 1	50	5 min	Retro trascizione
Step 2	95	20 sec	Inattivazione RT/Attivazione Taq
45 cicli	95	3 sec	Denaturazione
	60	30 sec	Anealing e estensione: rilevazione fluo

Per ciascun target oggetto di studio è stata verificata la performance della metodologia mediante realizzazione di una retta di taratura impiegando diverse concentrazione di ampliconi, i risultati di tale ottimizzazione sono riportati in fig.2 e tabella 5.

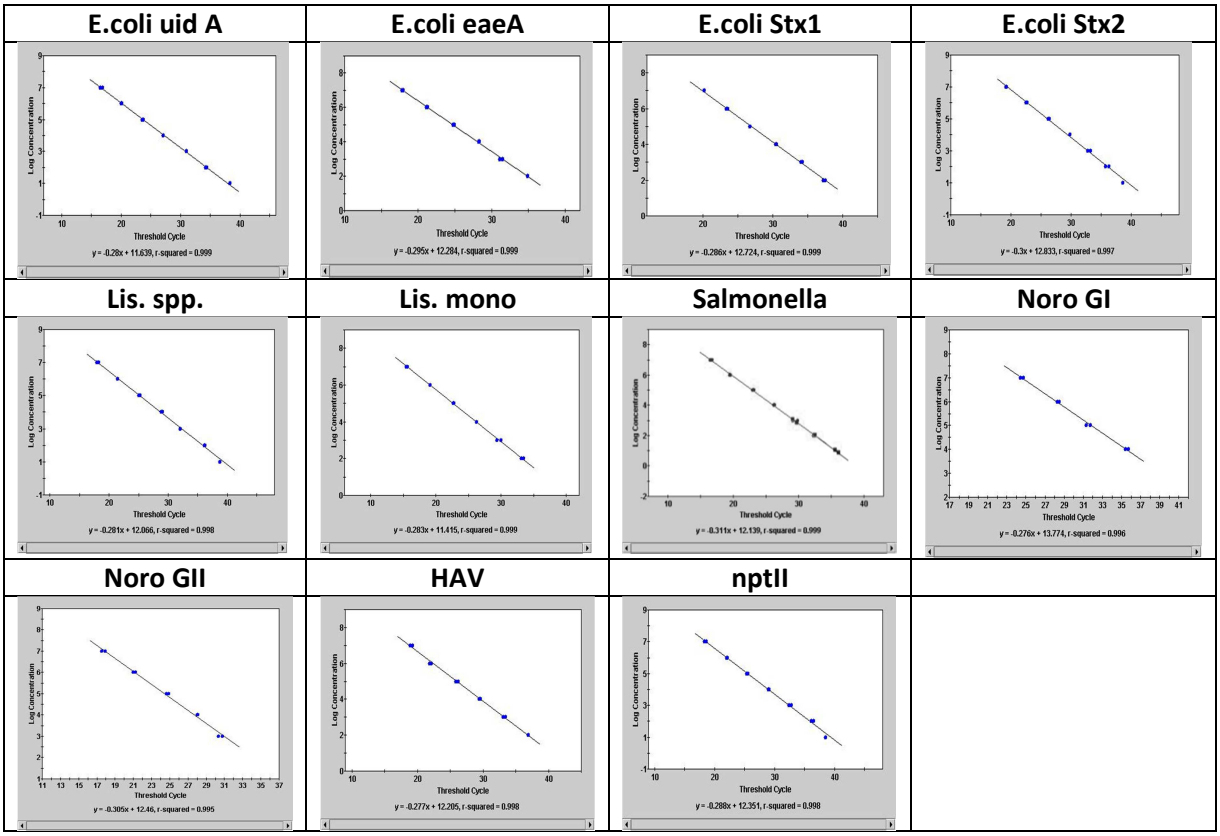

Figura. 2: Rette di taratura realizzate mediante impiego di ampliconi a diverse concentrazioni

Tabella 5: risultati ottimizzazione procedure

Target	Sensibilità	Protocollo di reazione
BATTERI		
E coli spp	10	TaqMan
E coli EHEC		
Stx1	10^2	TaqMan
Stx2	10	TaqMan
eaeA	10^2	TaqMan
Listeria		
Listeria spp	10	TaqMan
L. monocytogenes	10^2	TaqMan
Salmonella	10^3	TaqMan
VIRUS		
Noro GII	10^3	TaqMan
Noro GI	10^4	TaqMan
	10	Sybr

HAV	10^2	TaqMan
OGM		
NptII	10	TaqMan

I risultati evidenziano che nel caso di tre dei tredici target in oggetto le performance della reazioni risultano poco soddisfacenti, infatti sia per la *Salmonella* che nel caso del *Noro GI e Noro GII* si raggiungono sensibilità rispettivamente dell'ordine del 10^3, 10^4 e 10^3. Si è quindi deciso di procedere ad un ridisegno dei primers e/o delle probe al fine di poter incrementare la sensibilità delle procedura diagnostica. Nella tabella 6 sono riportate le sequenze dei primers e delle probe ridisegnati e il nuovo *detection limit*.

Tabella 6: primers, probe e *detection limit* delle reazioni ridisegnate

	Primer Fw	Primer Re	Probe	Sensibilità
Salmonella	AAACGTTGAAAAACTGAGGA	TCGTCATTCCATTACCTACC	FAM-TCTGGTTGATTTCCTGATCGCA-TMR	10^2
Noro GI	CGCTGGATGCGNTTCCAT	CCTTAGACGCCATCATCATTTA	FAM-TGGGACAGGAGAYCGCRATCT-TMR	10^2
Noro GII	CAAGAGTCAATGTTTAGGTGGATGAG	TCGACGCCATCTTCATTCACA	FAM-TGGGAGGGCGATCGCAATCT-TMR	10^2

In seguito alla procedure di ridisegno è stato , quindi possibile ottenere metodiche capaci di rilevare i target oggetto di analisi con sensibilità che sono pari o inferiore alle 100 copie/ 5 ul di campione analizzato. Questo approccio consente l'analisi in contemporanea di diverse tipologie di target sul medesimo campione permettendo una notevole flessibilità nell'impiego delle metodologie. La scelta infatti anche della stessa coppia "quencher-reporter "per ogni sonda elimina la limitazione del canale garantendo facilità e flessibilità di utilizzo della metodica. Questo aspetto che risulta di scarsa rilevanza in un laboratorio di analisi la cui attività è caratterizzata dall'analisi di uno stesso target su un numero elevato di campioni, diventa invece critico nelle procedure di autocontrollo caratterizzate piuttosto dalla necessità di analizzare più target su un medesimo campione.
Si è quindi proceduto a d ottimizzare i protocolli di estrazione dei genomi dalle diverse matrici cercando anche in questo caso di coniugare le esigenze di una elevata percentuale di recupero con quelle della facilità flessibilità di utilizzo oltre che della dotazione strumentale. Nello scegliere disegnare ed ottimizzare le procedure si è infatti tenuto conto del conto che un laboratorio interno ad una azienda che non si occupi di ricerca ma svolga funzioni di autocontrollo non possa essere dotato di strumentazione complessa e quindi sia necessario scegliere ed adeguare oi protocolli anche in funzioni di quelle che sono le dotazioni strumentali presenti. Per quanto riguarda l'estrazione del DNA genomico totale necessario all'individuazione di eventuali OGM si è scelto di impiegare un kit che prevedesse una prima fase di digestione del campione mediante Stomacher (in dotazione all'azienda) seguita da una procedura di estrazione con colonnine a matrice di silice impiegando un kit commerciale. Nel caso dei batteri si è deciso di uniformare le procedure disponibili per l'estrazione di genomi batterici derivanti da gram negativi o gram positivi al fine di sviluppare un unico protocollo di processamento seguito anche esso da un 'estrazione con kit commerciali. Nel caso dei virus, invece si è proceduto ad ottimizzare alcune procedure necessarie alla concentrazione del campione mediante precipitazione PEG-mediata dei virus da attuarsi o su campioni

SEDE LEGALE: Piazza Salvemini, 13 I-35131 Padova
C.F., n.ro iscrizione Reg. Imprese e P.IVA: 03845260284
PEC: certificata@pec.venetonanotech.it
www.venetonanotech.it

SEDE AMMINISTRATIVA:
c/o CNR, Corso Stati Uniti, 4 I-35127 Padova
Tel. +39 049 8538800 fax +39 049 8538803
info@venetonanotech.it

precedentemente sottoposti a trattamento con Stomacher nel caso di matrici alimentari o mediante precipitazione diretta nel caso di acqua.
La bontà delle procedure è stata verificata mediante analisi di campione artificialmente contaminati *(spike)* al fine di poter verificare la bontà della procedura di estrazione e la presenza entro le matrici di eventuali interferenti che possano modificare la resa della reazione.
Le analisi sono state condotte sul campione 897 come NT (estratto tal quale), *Salmonella* (sottoposto a procedura di arricchimento per salmonella) e Listeria (procedura di arricchimento per Listeria). I campioni sono stati più o meno artificialmente contaminati con amplicone di UidA in concentrazione pari a 10^5 cfu (tabella 7).

Tabella 7: RT-PCR UidA su campione 897

Campione	Protocollo	Spike (*E coli* 10^5 cfu)	RT-PCR (ciclo)	Commenti
897 *Salmonella*	B	SI	25.89	
	C	SI	26.22	
	C	NO	25.81	
897 *Listeria*	B	SI	28.50	Curva con derivata seconda anomala
	C	SI	27.39	
	C	NO	Negativo	
897 NT	B	SI	28.81	
	C	SI	27.70	
	C	NO	Negativo	
E coli 10^5 cfu	B	SI	26.01	
	C	SI	26.67	
Ampl 10^5 copie			23.74	

Rispetto all'amplicone di controllo, le 10^5 cfu di *E. coli* estratte mostrano positività con uno scarto di 3 cicli, forse a causa di una relativa perdita di campione o errore nello spike inziale (quota di cellule morte, frammentate, bassa qualità del genoma).
I dati dimostrano una maggiore resa nell'estrazione utilizzando il protocollo C (lisi termica+lisi fisica). Mentre il campione 897 *Salmonella* presenta positività per *E. coli,* l'omogenato 897 *Listeria* invece non risulta positivo in RT-PCR per *E. coli* così come il campione NT. Questo dato indica che il terreno half fraser non permette una crescita quantificabile di *E. coli* ma sostiene soprattutto *Listeria*, oppure il campione contiene contaminanti che interferiscono nella rivelazione di bassi quantitativi del gene UidA. Tale interferenza è riscontrabile anche nel caso in cui sia analizzata la semplice presenza di *Listeria* rendendo complessa una precisa interpretazione dei risultati. In particolare gli esperimenti condotti evidenziano che è possibile effettuare una ricerca di *L. spp., L. mono*. e *E.coli* anche sui campioni NT ed arricchiti per *Salmonella* , poiché tale procedura di arricchimento non risulta esclusivamente selettiva per *Salmonella*.
I dati riportati nella tabella 7 evidenziano che l'omogenato 897 *Salmonella* e 897 NT presentano positività con uscita del campione intorno ai 32-33 e 39 cicli, rispettivamente, l'omogenato 897 selezionato in half fraser broth presenta, come atteso, positività con valori consistenti con la presenza di circa 10^5 copie di

SEDE LEGALE: Piazza Salvemini, 13 I-35131 Padova
C.F., n.ro iscrizione Reg. Imprese e P.IVA: 03845260284
PEC: certificata@pec.venetonanotech.it
www.venetonanotech.it
SEDE AMMINISTRATIVA:
c/o CNR, Corso Stati Uniti, 4 I-35127 Padova
Tel. +39 049 8538800 fax +39 049 8538803
info@venetonanotech.it

Listeria spp, ma con risultato attendibile solo quando il campione è trattato con protocollo C (protocollo combinato lisi termica e fisica), come dimostrato anche per *E. coli.*

Tabella 8 : RT-PCR Listeria Spp.

Campione	Protocollo	Spike (*E coli* 10^5 cfu)	RT-PCR (ciclo)	Commenti
897 *Salmonella*	B	SI	31.91	
	C	SI	33.29	
	C	NO	33.55	
897 *Listeria*	B	SI	13.38	Curva con derivata seconda anomala
	C	SI	21.14	
	C	NO	21.28	
897 NT	B	SI	38.63	
	C	SI	39.28	
	C	NO	Non positivo (>40)	
E coli 10^5 cfu	B	Si	negativo	
	C	SI	negativo	
Ampl 10^5 copie			23.10	

Questi dati evidenziano che :

- è possibile effettuare un analisi di tutti i target di interesse sul campione NT (estrazione immediatamente successiva alla digestione con Stomacher).
- è possibile effettuare un analisi di tutti i target di interesse sul campione arricchito per *Salmonella* poiché permette la crescita dia di Listeria che E.coli, riducendo i tempi di analisi e consentendo di distinguere ceppi vitali da ceppi non vitali (diminuzione dei Ct).
- Tale capacità di crescita è dimostrata dallo scarto di 6-7 Ct tra NT e arricchito per *Salmonella* ed ancora maggiore nel caso dell'arricchimento per *Listeria* che viene condotto rispetto a quello per *Salmonella* per tempi più lunghi (24 ore invece che 18) e su un terreno selettivo con esclusiva diponibilità di nutrienti per Listeria.
- Il protocollo di estrazione C dimostra una migliore capacità di rimuovere eventuali contaminanti e aumentare la lisi delle cellule batteriche presenti nell'omogenato.

Il medesimo approccio è stato seguito per quanto riguarda la valutazione dei protocolli di estrazione per DNA genomico per il controllo di OGM e genoma virale per il controllo dei virus a RNA di interesse . i dati della analisi in RT-PCR in presenza o meno di *spike* sono riportati nelle tabelle 9 e 10.

Tabella 9: RT-PCR nptII

	NtpII Ct	*NtpII Ct con spike NptII*
Radicchio 1	negativo	21.44
Radicchio 2	negativo	21.73
Radicchio 3	negativo	21.87
Radicchio 4	negativo	21.24

SEDE LEGALE: Piazza Salvemini, 13 I-35131 Padova
C.F., n.ro iscrizione Reg. Imprese e P.IVA: 03845260284
PEC: certificata@pec.venetonanotech.it
www.venetonanotech.it

SEDE AMMINISTRATIVA:
c/o CNR, Corso Stati Uniti, 4 I-35127 Padova
Tel. +39 049 8538800 fax +39 049 8538803
info@venetonanotech.it

Radicchio 5	negativo	21.52
NptII	21.09	

Tabella 10: RT-PCR target virali

	HAV Ct	*Adeno Ct*	*Noro GI Ct*	*Noro GII Ct*	*Noro GII Ct con spike RNA Noro GII*
Sample 1	negativo	negativo	negativo	negativo	21.31
Sample 2	negativo	negativo	negativo	negativo	21.33
Sample 3	negativo	negativo	negativo	negativo	21.64
Sample 4	negativo	negativo	negativo	negativo	21.29
Sample 5	negativo	negativo	negativo	negativo	21.82
RNA Noro GII	negativo	negativo	negativo	21.11	

Conclusa la fase di ottimizzazione dei protocolli ed analisi dei campioni artificialmente contaminati si è proceduto al monitoraggio, cioè all'analisi dei campioni raccolti durante il progetto ed analizzati parallelamente secondo lo schema riportato in tabella 11.

Tabella 11: Schema analisi

Target	Procedura	Esecutore
Batteri	Microbiologia classica	Ortoromi
	RT-PCR	Ortoromi/Veneto Nanotech
Virus	RT-PCR	Ortoromi/Veneto Nanotech
OGM	RT-PCR	Ortoromi/Veneto Nanotech

Di seguito vengono riportai i risultati del monitoraggio congiunto in tabelle separate riguardanti rispettivamente batteri, virus ed OGM (tabella 12,13-a,13-b, 14 e 15).
Per quanto concerne la batteriologia i campioni analizzati con metodiche di microbiologia tradizionale analisi in piastra risultano negativi per *E.coli, Salmonella e L.monocytogenens*. Questi risultati sono pienamente conformi con quelli ottenuti mediante analisi in RT-PCR. Infatti, la ove si evidenzia una debole positività questa rimane costante tra i campioni EC ed S , cioè tra il tempo zero e l'arricchimento per salmonella dimostrando che si tratta di genomi riferibili a ceppi non vitali in quanto dopo 18 ore non si osserva un aumento nel numero di copie. L'unico caso in cui vi è un incremento è quello del campione 1129 per il gene uidA riferibile all' *E.coli* totale, tuttavia anche in questo caso di tratta di una positività debole e non confermata su piastra. Le piccole disomogeneità evidenziate in alcune analisi sono in ogni caso legate al campionamento e non si associano comunque mai a discrepanze significative a conferma della bontà della metodica impiegata per l'analisi.

Tabella 12: risultati analisi con microbiologia classica su batteri

	ORTOROMI					
Target	***E.coli***		***Salmonella***		***L.monocytogenens***	
	+/-	UFC	+/-	UFC	+/-	UFC
Sample						
1129	-		-		-	
1130	-		-		-	
1131	-		-		-	

SEDE LEGALE: Piazza Salvemini, 13 I-35131 Padova
C.F., n.ro iscrizione Reg. Imprese e P.IVA: 03845260284
PEC: certificata@pec.venetonanotech.it
www.venetonanotech.it

SEDE AMMINISTRATIVA:
c/o CNR, Corso Stati Uniti, 4 I-35127 Padova
Tel. +39 049 8538800 fax +39 049 8538803
info@venetonanotech.it

1132	-		-		-	
1147	-		-		-	
1148	-		-		-	
1149	-		-		-	
1150	-		-		-	
1171	-		-		-	
1172	-		-		-	
1175	-		-		-	
1176	-		-		-	
1177	-		-		-	
1178	-		-		-	
1084	-		-		-	

Tabella 13-a: Risultati analisi campioni con RT-PCR per batteriologia

	NANOFAB								***ORTOROMI***							
Target	***uidA***		***Stx1***		***Stx2***		***eaeA***		***uidA***		***Stx1***		***Stx2***		***eaeA***	
	+/-	Copie/ reaz	+/-	Copie/ reaz	+/-	Copie/ reaz	+/-	Copie/ reaz	+/-	Copie/ reaz	+/-	Copie/ reaz	+/-	Copie / reaz	+/-	Copie / reaz
Sample																
1129 EC	-		-		-		-		+	10	-		-		-	
1129 S	+	3*10^5	-		-		-		+	33	-		-		-	
1130 EC	-		-		-		-		-		-		-		-	
1130 S	-		-		-		-		-		-		-		-	
1131 EC	-		-		-		-		-		-		-		-	
1131 S	-		-		-		-		-		-		-		-	
1132EC	-		-		-		-		-		-		-		-	
1132S	-		-		-		-		-		-		-		-	
1147 EC	-		-		-		-		-		+	2.5	-		-	
1147 S	-		-		-		-		-		+	2.3	-		-	
1148 EC	-		-		-		-		-		+	1.58	-		-	
1148 S	-		-		-		-		-		+	1.4	-		-	
1149 EC	-		-		-		-		-		+	3.1	-		-	
1149 S	-		-		-		-		-		+	1.65	-		-	
1150 EC	-		-		-		-		-		+	1.25	-		-	
1150 S	-		-		-		-		-		+	1.2	-		-	
1171 EC	-		-		-		-		-		-		-		-	
1171 S	-		-		-		-		-		-		-		-	
1172 EC	-		-		-		-		-		-		-		-	
1172 S	-		-		-		-		-		-		-		-	
1175 EC	-		-		-		-		-		-		-		-	
1175 S	-		-		-		-		-		-		-		-	
1176 EC	-		-		-		-		-		-		-		-	
1176 S	-		-		-		-		-		-		-		-	
1177 EC	-		-		-		-		-		-		-		-	
1177 S	-		-		-		-		-		-		-		-	
1178 EC	-		-		-		-		-		-		-		-	
1178 S	-		-		-		-		-		-		-		-	
1084	-		-		-		-		-		-		-		-	

SEDE LEGALE: Piazza Salvemini, 13 I-35131 Padova
C.F., n.ro iscrizione Reg. Imprese e P.IVA: 03845260284
PEC: certificata@pec.venetonanotech.it
www.venetonanotech.it

SEDE AMMINISTRATIVA:
c/o CNR, Corso Stati Uniti, 4 I-35127 Padova
Tel. +39 049 8538800 fax +39 049 8538803
info@venetonanotech.it

Tabella 13-b: Risultati analisi campioni con RT-PCR per batteriologia

	NANOFAB						*ORTOROMI*					
Target	***Salmonella***		***Listeria spp.***		***L. monocytogenes***		***Salmonella***		***Listeria spp.***		***L. monocytogenes***	
	+/-	Copie/ reaz	+/-	Copie/ reaz	+/-	Copie/ reaz	+/-	Copie/ reaz	+/-	Copie/ reaz	+/-	Copie/ reaz
Sample												
1129 EC	-		+	< 10	-		-		-		-	
1129 S	-		-		-		-		-		-	
1130 EC	-		-		-		+	2.5	-		+	2.5
1130 S	-		-		-		+	2.23	-		+	2.23
1131 EC	-		-		-		+	1.99	-		-	
1131 S	-		-		-		+	1.9	-		-	
1132EC	-		-		-		-		-		-	
1132S	-		-		-		-		-		-	
1147 EC	-		-		-		-		-		-	
1147 S	-		-		-		-		-		-	
1148 EC	-		-		-		-		-		-	
1148 S	-		+	< 10	-		-		-		-	
1149 EC	-		-		-		-		-		-	
1149 S	-		-		-		-		-		-	
1150 EC	-		-		-		-		-		-	
1150 S	-		-		-		-		-		-	
1171 EC	-		-		-		-		-		-	
1171 S	-		-		-		-		-		-	
1172 EC	-		-		-		-		-		-	
1172 S	-		-		-		-		-		-	
1175 EC	-		-		-		-		-		-	
1175 S	-		-		-		-		-		-	
1176 EC	-		-		-		-		-		-	
1176 S	-		-		-		-		-		-	
1177 EC	-		+	< 10	-		-		-		-	
1177 S	-		-		-		-		-		-	
1178 EC	-		-		-		-		-		-	
1178 S	-		-		-		-		-		-	
1084	-		-		-		-		-		-	

Per quanto riguarda i target virali, risultati sono perfettamente concordanti e mostrano campioni negativi per tutti i target virali di interesse, si riscontra solo una debole positività corrispondente ai campioni 1298-6 e 1304-1 che presentano segnale positivo per *HAV* in numero di copie inferiore a 10 e quindi sostanzialmente anche essi negativi . Oltre ai target di interesse essendo stata condotta l'analisi su alcuni campioni di acqua (analisi in singolo cieco) si è deciso di verificare anche l'eventuale presenza di *Adenovirus* come indicatore della qualità dell'acqua (enterovirus), la negatività dei campioni dimostra che la buona qualità delle acque in esame.

Tabella 14: Risultati analisi campioni con RT-PCR per virologia

	NANOFAB								*ORTOROMI*					
Target ->	***Noro GI***		***Noro GII***		***HAV***		***Adenovirus***		***Noro GI***		***Noro GII***		***HAV***	
	+/-	Copie/	+/-	Copie/	+/-	Copie/	+/-	Copie/	+/-	Copie/	+/-	Copie/	+/-	Copie/

		reaz		reaz		reaz		reaz		reaz		reaz		reaz
Sample									-		-		-	
1297-1	-		-		-		-		-		-		-	
1297-2	-		-		-		-		-		-		-	
1297-3	-		-		-		-		-		-		-	
1297-4	-		-		-		-		-		-		-	
1297-5	-		-		-		-		-		-		-	
1298-1	-		-		-		-		-		-		-	
1298-2	-		-		-		-		-		-		-	
1298-3	-		-		-		-		-		-		-	
1298-4	-		-		-		-		-		-		-	
1298-5	-		-		-		-		-		-		-	
1298-6	-		-		+	<10	-		-		-		-	
1298-7	-		-		-		-		-		-		-	
1298-8	-		-		-		-		-		-		-	
1304-1	-		-		+	<10	-		-		-		-	
1304-2	-		-		-		-		-		-		-	
1304-3	-		-		-		-		-		-		-	
1119	-		-		-		-		-		-		-	
1120	-		-		-		-		-		-		-	
1147	-		-		-		-		-		-		-	
1148	-		-		-		-		-		-		-	
1149	-		-		-		-		-		-		-	
1150	-		-		-		-		-					

Per quanto riguarda l'analisi di nptII, i campioni risultano negativi per la presenza di OGM infatti anche dove si registra un'amplificazione questa corrisponde ad un numero di copie inferiore a 5 che rapportato ai volumi di estrazione è associabile a quantità sotto il punto percentuale della massa totale. Inoltre va sottolineato che si tratta di deboli positività non confermate nel controllo crociato che potrebbero derivare anche da possibili contaminazioni o interferenti. I risultati confermano comunque la bontà della metodologia come tecnica di indagine in grado di rilevare anche piccole quantità di contaminanti.

Tabella 15: Risultati analisi campioni con RT-PCR per OGM

Target ->	***nptII Nanofab***		***nptII Ortoromi***	
	+/-	Copie/reaz	+/-	Copie/reaz
Sample				
1	-		-	
2	-		+	<5
3	-		-	
4	-		-	
5	-		+	<5
6	-		-	
7	-		-	
8	-		+	<5
9	-		+	<5
10	-		-	
11	-		-	
12	-		-	
13	-		-	
14	-		-	

15	-		-	
16	-		-	
17	-		+	<5
18	-		-	
19	-		+	<5
20	-		-	

I risultati del monitoraggio dimostrano la bontà delle procedure sviluppate entro il progetto e confermano la maggiore sensibilità della metodica di analisi molecolare (RT-PCR) rispetto alla microbiologia classica. Questa tipologia di analisi permette di individuare anche piccole presenze di genomi e di monitorarle nel tempo evidenziando nel caso della batteriologia anche la possibile associazione a ceppi vitali o meno (differenze nel Ct tra EC e S). Inoltre consente di reperire informazioni fondamentali rispetto all'assetto genetico e all'eventuale indice di rischio di alcuni ceppi batterici (come nel caso dell' *E.coli* enteroemorragico per i geni eaeA, stx1 e stx2) così come di conoscere il profilo virologico dei campioni (*HAV, Noro GI e Noro GII*) o evidenziare l'eventuale presenza di OGM (nptII), eventualità resa possibile solo mediante l'impiego di queste tecnologie. In conclusione il progetto SAFER ha permesso di sviluppare metodi veloci, sensibili e d'avanguardia, basati sulle metodica della RT-PCR, per monitorare e identificare in tempo reale l'assetto microbiologico (batteri e virus) e l'eventuale presenza di OGM nei campioni oggetto di analisi . In questo modo l'azienda produttrice (Ortoromi) ha potuto allinearsi alla normativa europea e potenziare le procedure di autocontrollo, differenziando ulteriormente i prodotti e certificandone la qualità e la sicurezza, aspetto questo, che consentirà di incrementare il numero dei consumatori e quindi il reddito.

SEDE LEGALE: Piazza Salvemini, 13 I-35131 Padova
C.F., n.ro iscrizione Reg. Imprese e P.IVA: 03845260284
PEC: certificata@pec.venetonanotech.it
www.venetonanotech.it

SEDE AMMINISTRATIVA:
c/o CNR, Corso Stati Uniti, 4 I-35127 Padova
Tel. +39 049 8538800 fax +39 049 8538803
info@venetonanotech.it