

ID&Q PROBIOMA

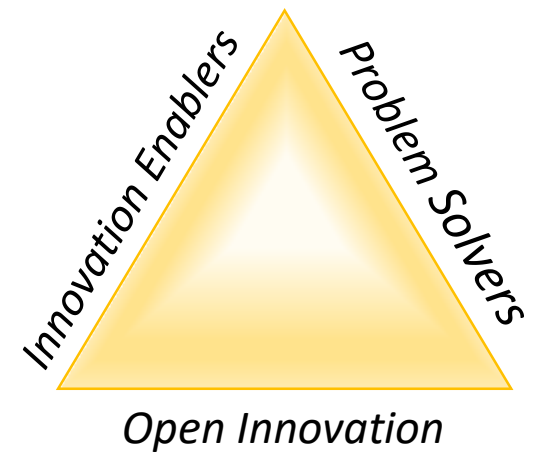
Tecnologie innovative di IDentificazione & Quantificazione
di specie microbiche per il controllo qualità di prodotti
PRObiotici e per il monitoraggio del microBIOMA

MICROBION srl

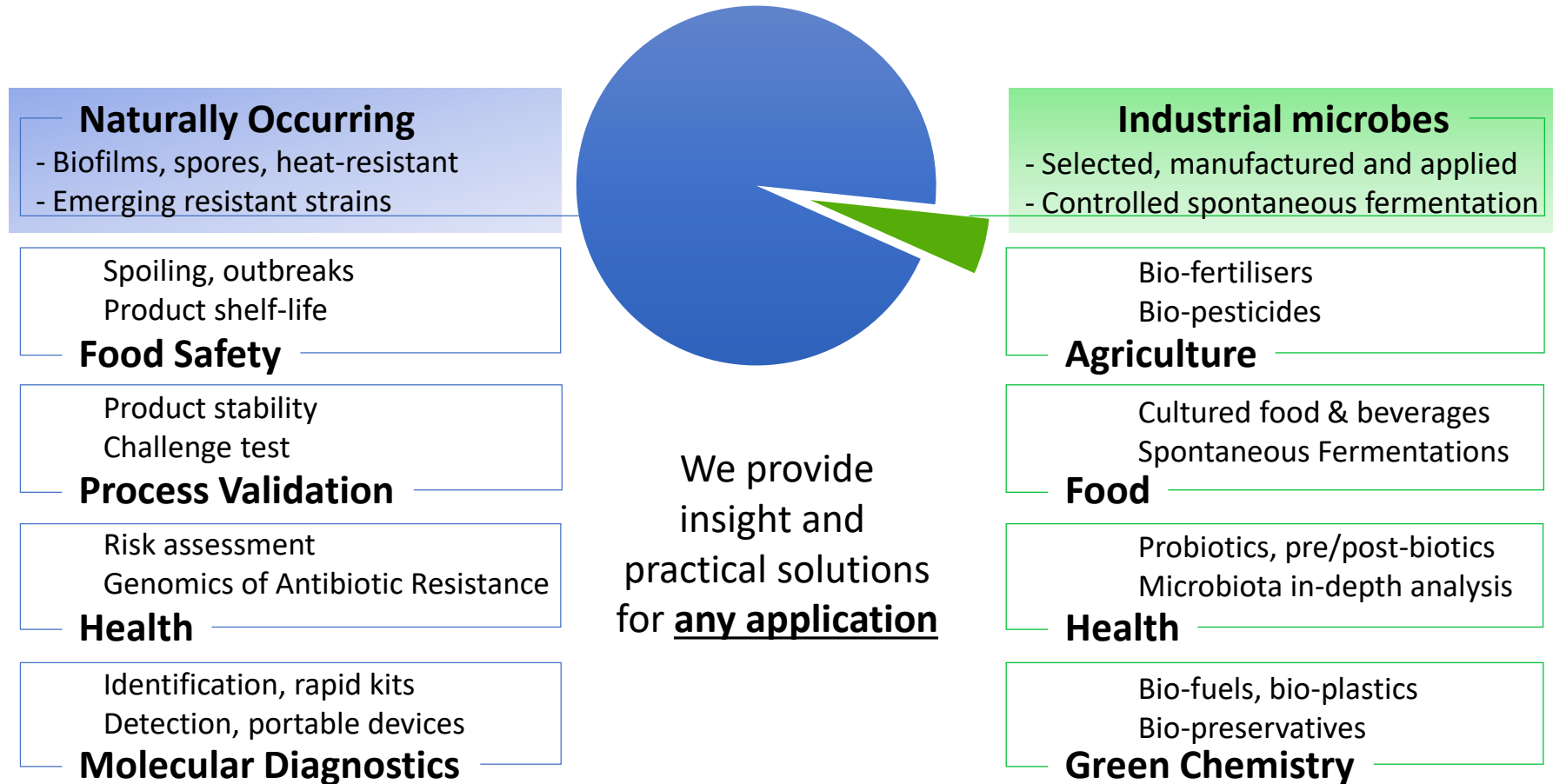
Sara Campana, Fabio Fracchetti, Alessandro Roncador, Ilenia Campedelli,
Angelica Rosa, Marta Tebaldi, Alessandra Tomasi, Manola Zanetti, Antonio Del Casale



- *Contract Research Organization (CRO) in Microbiologia Agro-Alimentare*
- Seleziona, identifica e traccia i migliori ceppi microbici
- Metodologie basate su analisi DNA



MERCATO DI MICROBION



PROBIOTICI



'**live** microorganisms that, when administered in **adequate amounts**, confer a **health benefit** on the host' (FAO, WHO, 2001)

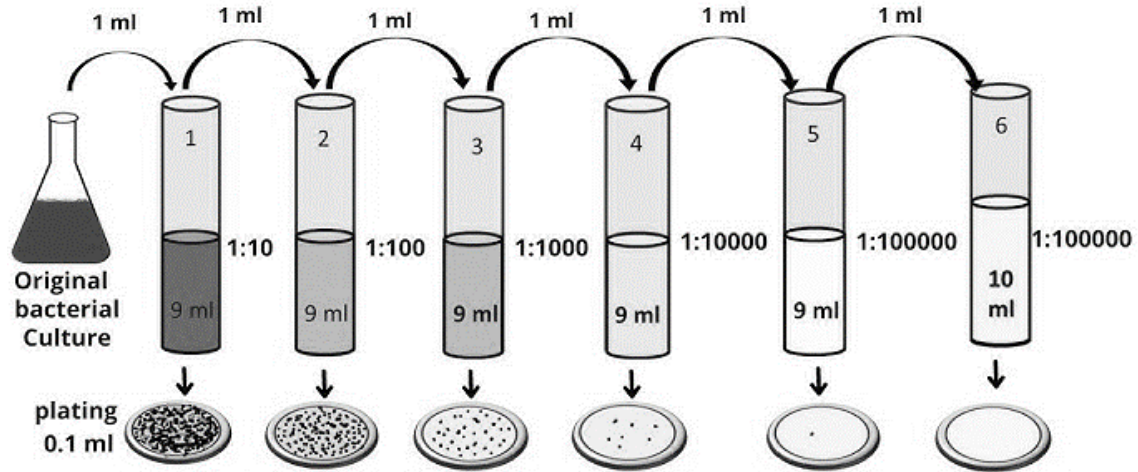


- Cellule vive (batteri/lieviti)
- Quantità definita
- Identiche al ceppo usato in studi clinici

ipa
INTERNATIONAL
PROBIOTICS
ASSOCIATION



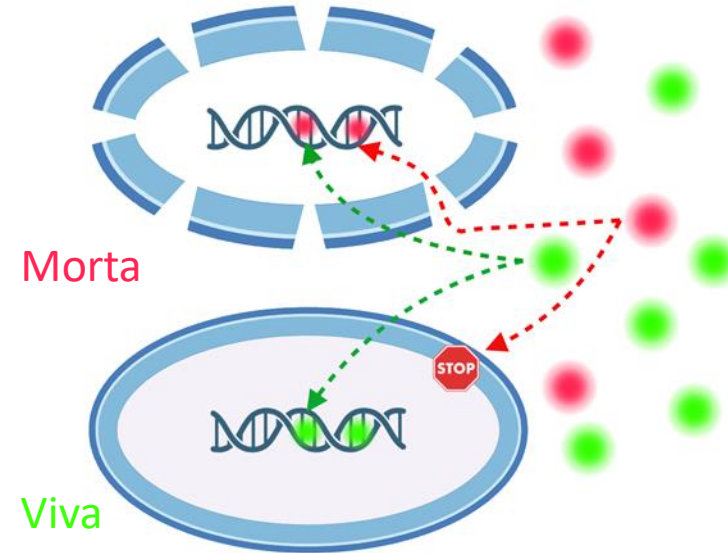
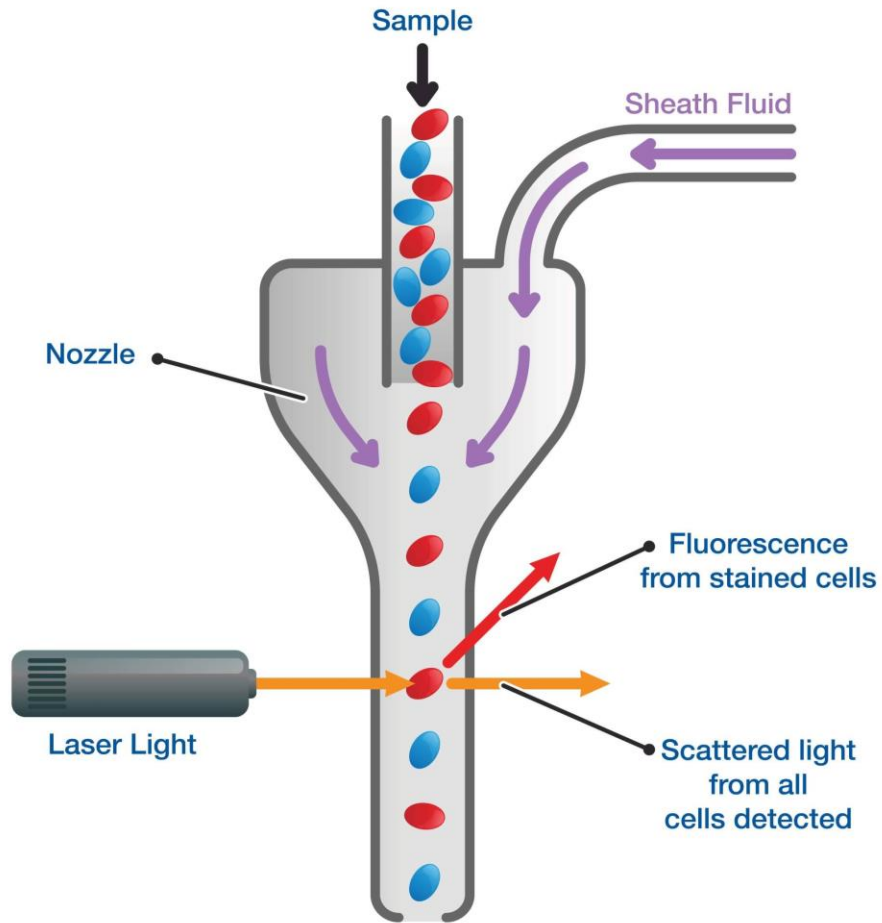
METODO TRADIZIONALE: CONTA IN PIASTRA



Limiti tecnici

- Accuratezza scarsa ($\pm 30\%$)
- Tempi lunghi (fino a 4 giorni)
- Terreno di coltura e condizioni d'incubazione ideali per tutti
- Antagonismo tra specie
- No identificazione specie/ceppo

CITOMETRIA DI FLUSSO



VANTAGGI

- Rapidità
- Accuratezza
- One-fit-all* (ISO)



SVANTAGGI

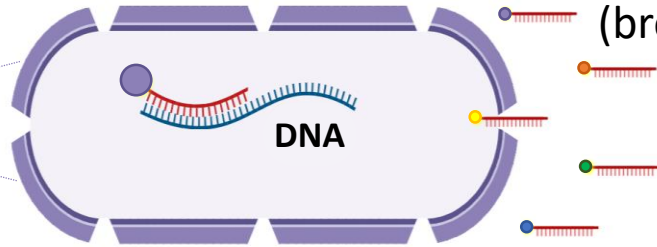
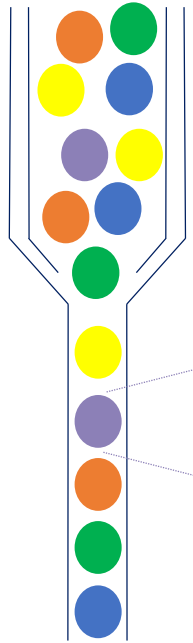
- Misura indiretta
- Apparecchiatura molto costosa
- No identificazione specie

FISH-FLOW



UNIVERSITÀ
di **VERONA**

Centro
**PIATTAFORME
TECNOLOGICHE**

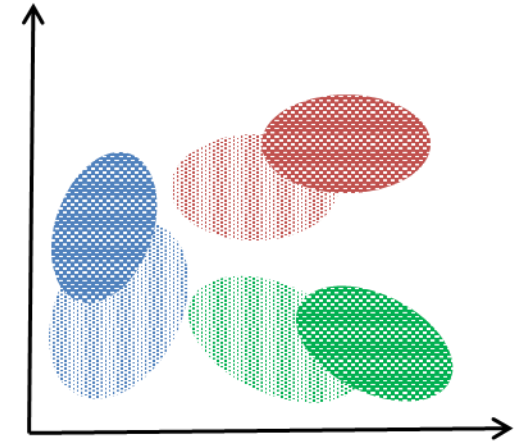


Sonde HPME
(brevetto MICROBION)



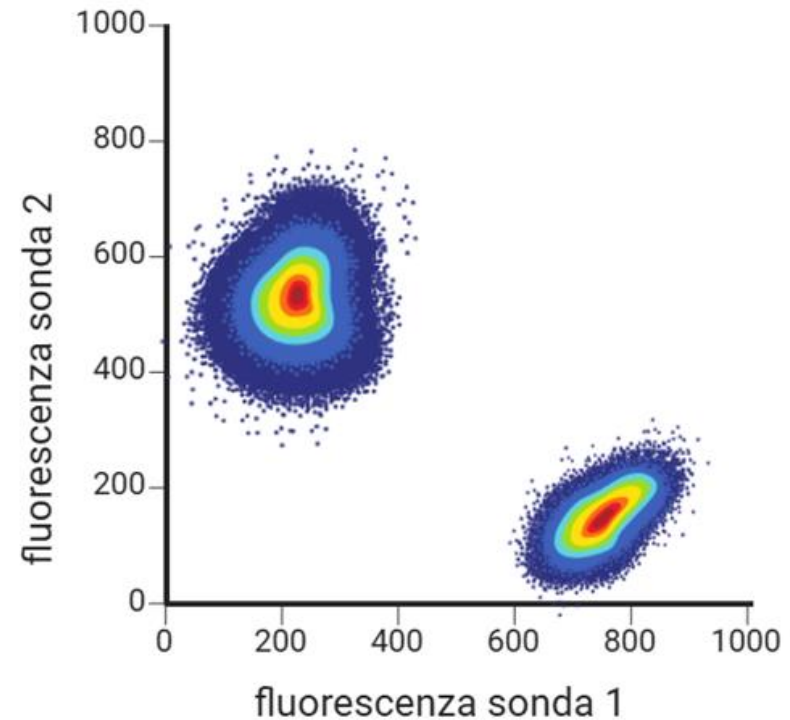
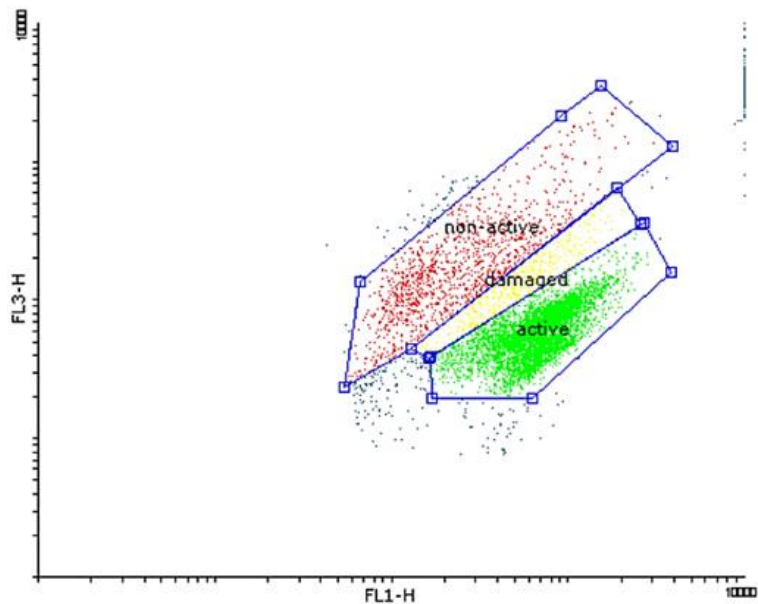
UNICITA'

- Quantifica dei componenti della miscela
- Quantifica vive E morte
- Controllo totale della conformità di prodotto
- Stabilità di prodotto



	LIVE	DEAD
Species A		
Species B		
Speceis C		

RISULTATI CITOMETRIA E FISH-FLOW



CITOMETRIA

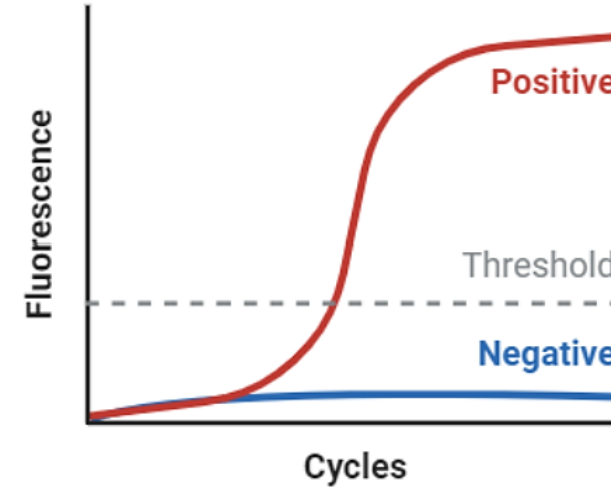
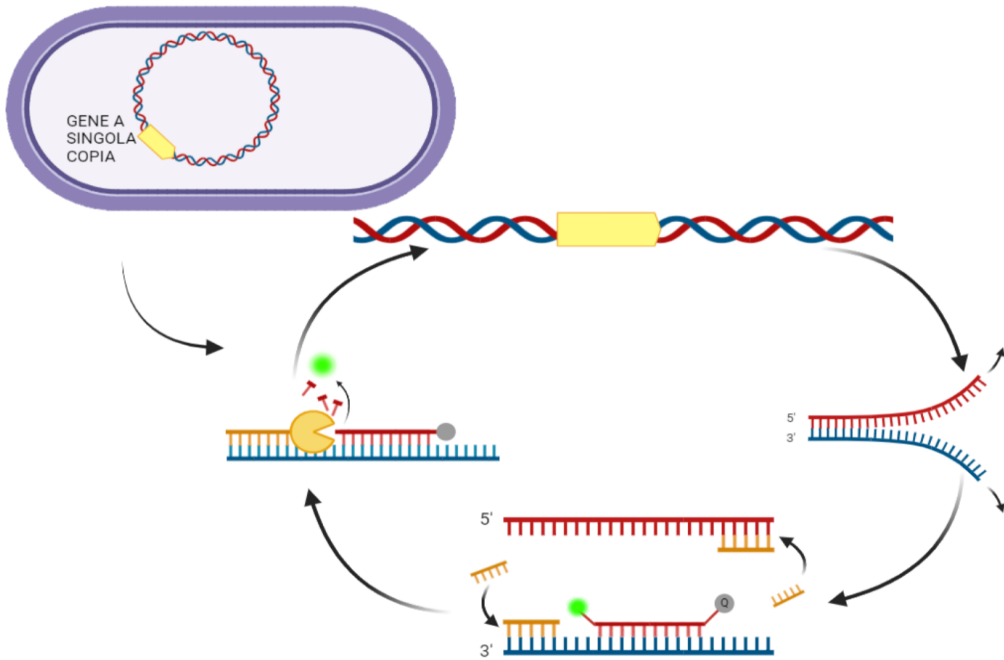
Servizio introdotto sul mercato
Colmato il gap con i competitor
Applicazione anche su altri campioni (pasta madre)



FISH-FLOW

Buoni risultati non su campioni reali
Ulteriore ricerca e sviluppo
Ricerca ulteriori partners tecnici

PCR QUANTITATIVA



PRIMERS+SONDE

- Universali
- Genere-specifici
- Specie-specifici
- Ceppo-specifici



VANTAGGI

- Rapidità*
- Accuratezza*
- Identificazione



SVANTAGGI

- Misura indiretta
- Sviluppo protocollo (DNA+PCR)
- Taratura e validazione*

PCR QUANTITATIVA

RISULTATI

Ottimizzazione protocollo estrazione DNA

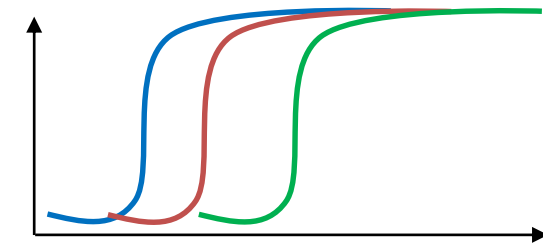
Efficacia dei marcatori HPME su *Bifidobacterium*

Buona correlazione tra conta in piastra-citometria e PCR quantitativa

NEXT-STEP

Ioduro Propidio per Live/Dead

Applicazione su specie diverse da *Bifidobacterium*



- B. breve
- B. animalis subsp. lactis
- B. animalis subsp. animalis



UNICITA'

Differenziazione di specie geneticamente correlate

Differenziazione ceppi della stessa specie

PCR QUANTITATIVA

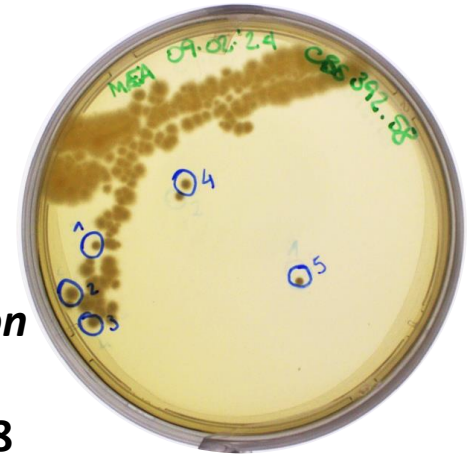
*Cutibacterium
acnes*
NCTC 10390



*Malassezia
furfur*
CBS 7019

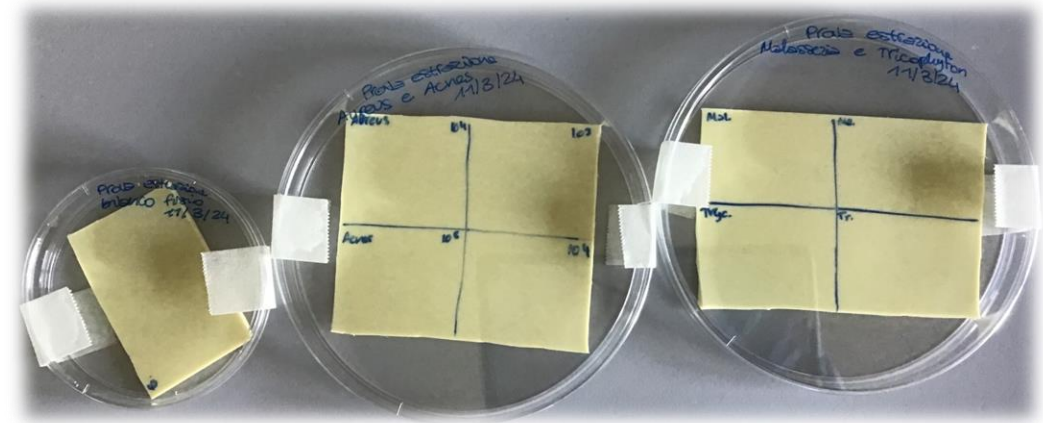


*Trichophyton
rubrum*
CBS 392.58



FLUSSO DI LAVORO

- Inoculo ceppi di controllo
- Ottimizzazione kit estrazione DNA
- Quantifica tramite qPCR

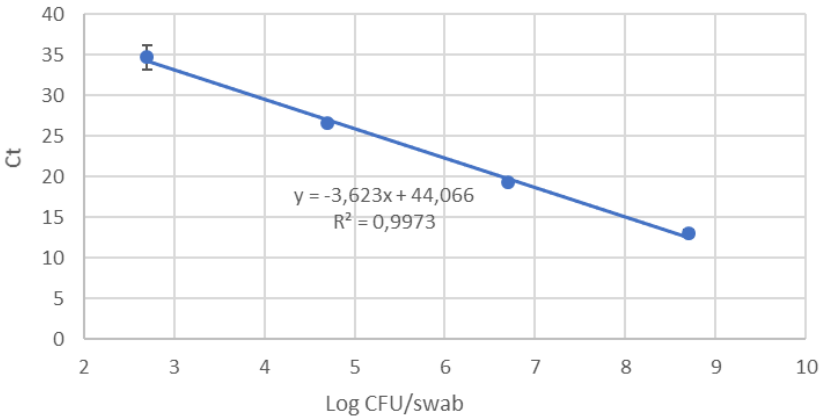


UNICITA'

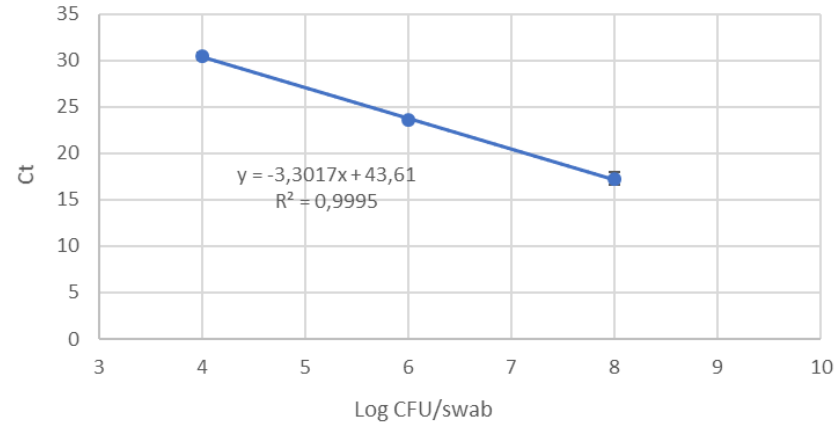
Servizio di quantifica patogeni epidermide

PCR QUANTITATIVA

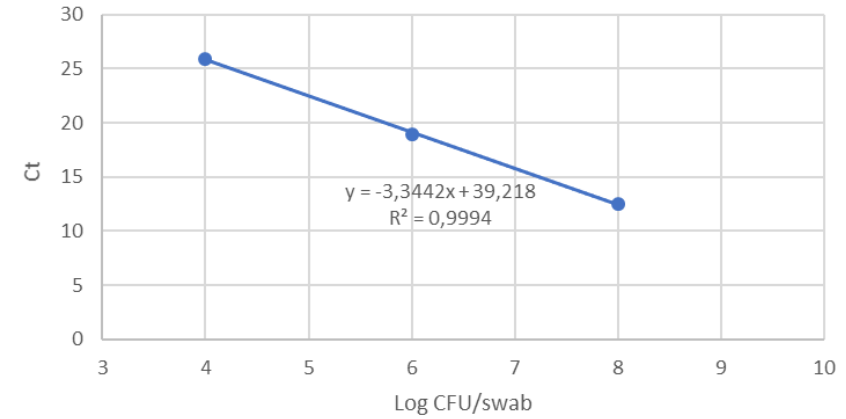
Streptococcus mutans



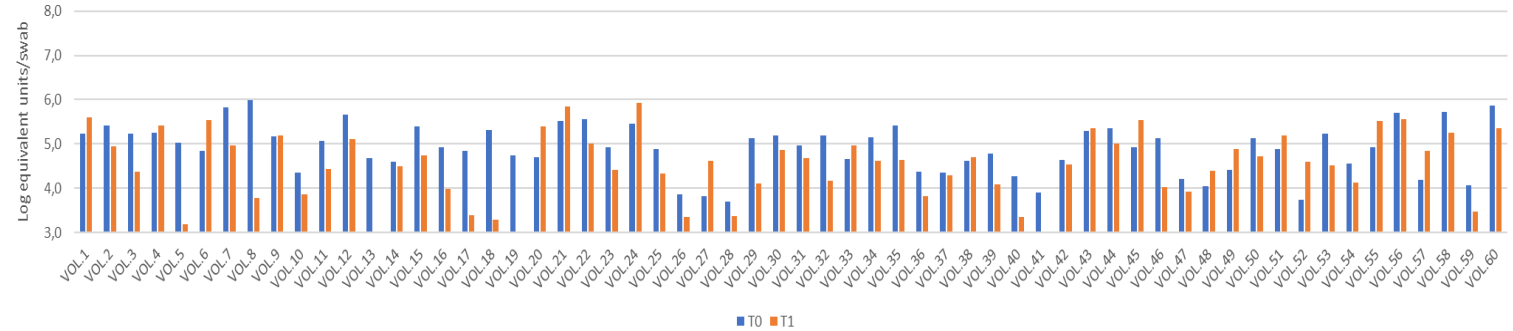
Streptococcus salivarius



Streptococcus sanguinis



Streptococcus sanguinis



FLUSSO DI LAVORO

Ottimizzazione kit estrazione DNA

Quantifica tramite qPCR

Comparazione T0 vs T1



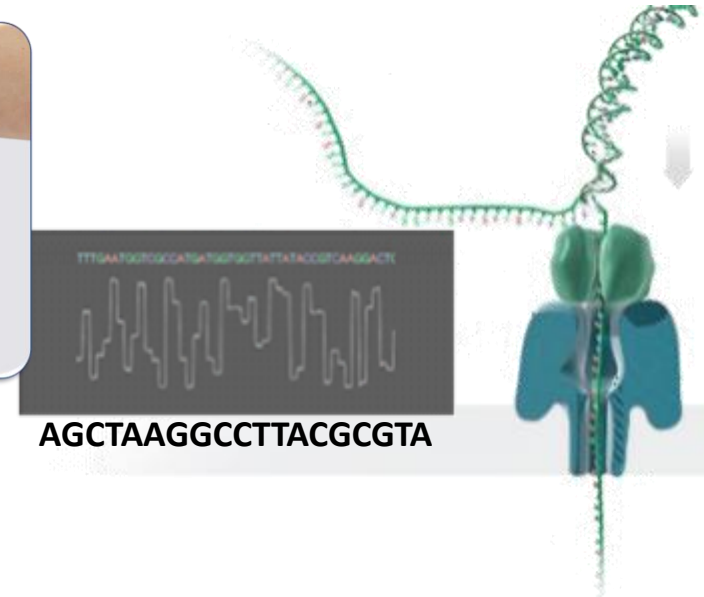
UNICITA'

Servizio di quantifica patogeni e benefici in swab cavo orale

NEXT GENERATION SEQUENCING

HUGE POTENTIAL OF NGS

- Portable NGS devices
- Easy to use
- Inexpensive
- Fast protocols



METABARCODING BASED ON 16S RRNA

- Universal marker (universal PCR primers)
- Comprehensive public databases for match
- Identical in close related species
- Great for research (not for QC)

```

.....*..**..***.....***..*
AGCTCGTTCGGATCGGCATGCATGCATTGATACGCT
AGCTCGTGCATGCGAGGCATGCATAGCTCGATACGCT
AGCTCGTCCGGATGGGCATGCATCAATAGATACGCT
    
```

METABARCODING BASED ON HPME MARKERS

- Genus-specific markers (multiplexable)
- **Hyper variable regions** (sequence & length)
- Resolve close related species/subspecies/strains
- Match with Microbion database
(international patent WO2018014979A1)

Conserved
(PCR primers)

Variable
(informative)

Conserved
(PCR primers)

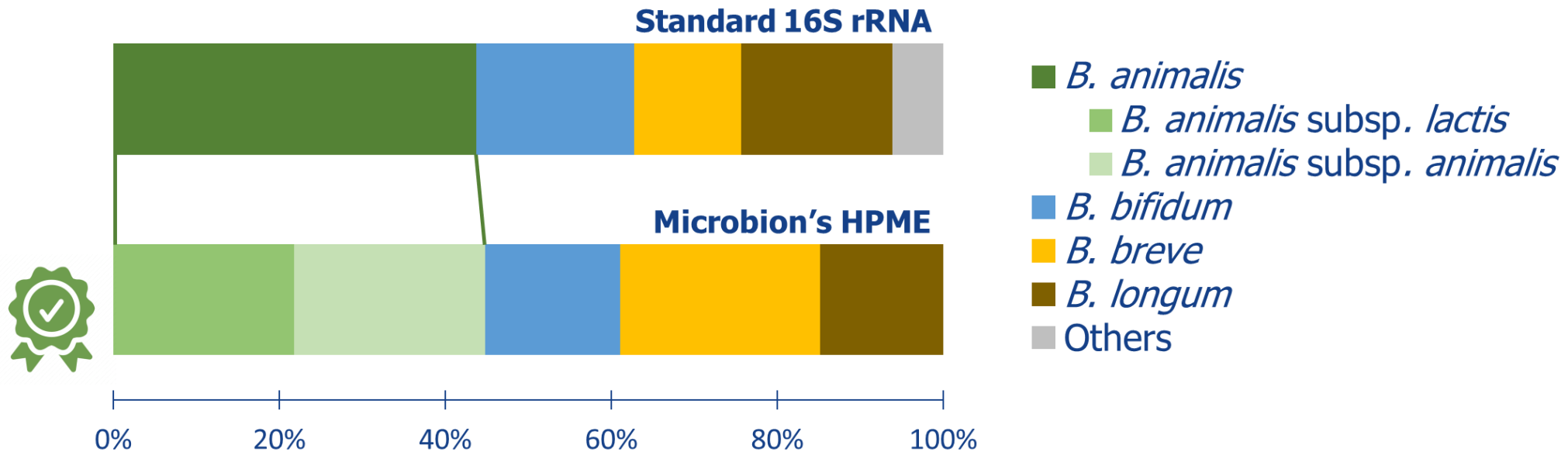
```

.....*****.....
AGCTCGTTC--GATGCATTTCGG---CATGCATT-CGATTGATACGCT
AGCTCGTGATCG--ATC---ATCGCAGGCGCAGCTTCGCGATACGCT
AGCTCGTCT--CGATC--GC----CAA-----GTACCGATACGCT
    
```

NEXT GENERATION SEQUENCING



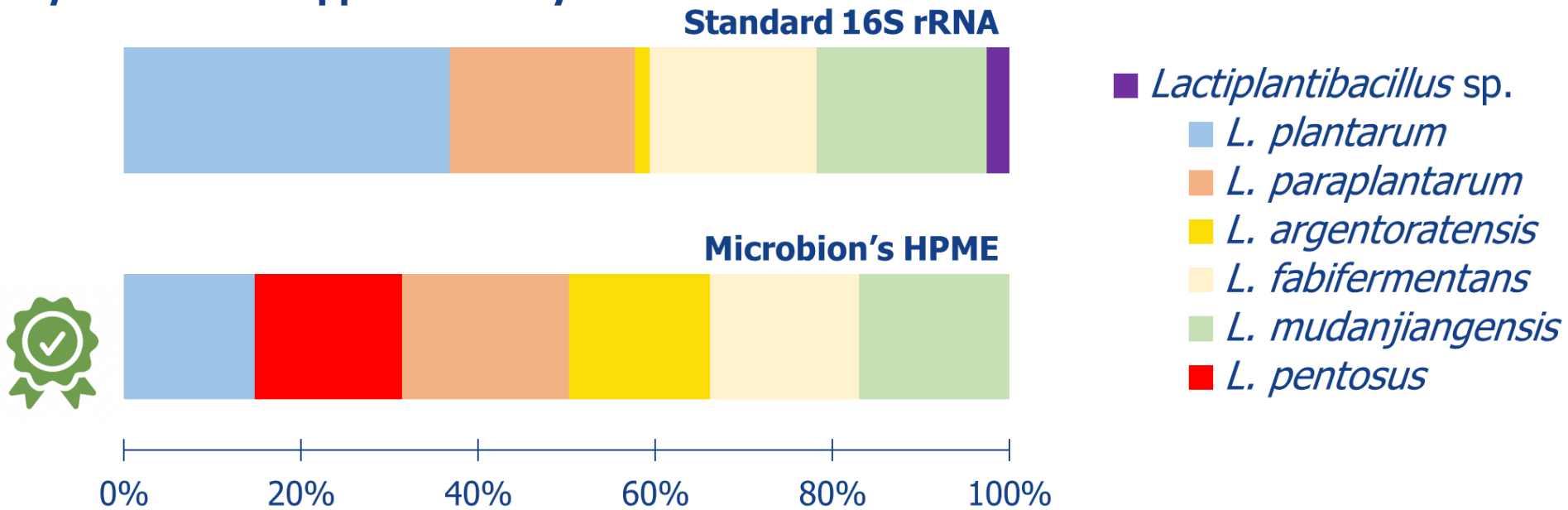
Bifidobacterium spp. case study



NEXT GENERATION SEQUENCING



Lactiplantibacillus spp. case study



CONCLUSIONI

microbion

Stato dell'arte

Colmare il gap
tecnologico

Superamento
dei competitors

CITOMETRIA DI FLUSSO

Metodo ISO 19344:2015

Metodo FISH-FLOW

qPCR

Disegno primers e sonde specie/ceppo

Servizio quantifica probiotici

Servizio quantifica microrganismi per studi clinici

NGS METABARCODING

Disegno primers e sonde specie/ceppo

Servizio analisi della composizione di miscele probiotiche

www

www.microbion.it



a.delcasale@microbion.it

in

@MICROBION

Follow us on
LinkedIn

