

PCR nella microbiologia ambientale, agraria, animale ed alimentare

PCR fingerprinting in microbiologia

Il principio alla base della reazione a catena della polimerasi (PCR), già in qualche modo delineato nella sua forma nel 1971, diventa reale nel 1985 con la pubblicazione del primo esperimento di amplificazione del DNA. Da allora la PCR ha avuto un impatto via via crescente, inizialmente nell'ambito "ristretto" della biologia molecolare, approdando infine ad altre discipline scientifiche. All'inizio infatti la PCR rappresentava un'alternativa valida al clonaggio; tuttavia in seguito, con il progredire e l'affinarsi della tecnologia stessa, essa diventa il punto di forza per esplorare numerosi campi scientifici ed innumerevoli sono le sue applicazioni attuali, e anche se questa metodologia era fino a qualche anno fa prerogativa dei laboratori di ricerca più avanzati, essa si sta sempre di più affermando come tecnica di "routine".

Una delle applicazioni più interessanti della PCR è la possibilità di ottenere dei "molecular fingerprinting", una impronta digitale molecolare di un (micro)organismo, che permette di distinguerlo da "individui" strettamente correlati dal punto di vista genetico (tipizzazione). Prima della comparsa della PCR, la tecnologia del fingerprinting molecolare si era basata per anni sulla analisi dei polimorfismi di lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP), una metodologia efficace, ma estremamente laboriosa il cui uso era perciò limitato ai laboratori di ricerca più avanzati. Grazie alla introduzione della PCR, per la semplicità, velocità, sensibilità e specificità di questa tecnica, sono stati fatti eccezionali progressi in questo campo. All'inizio l'ottenimento di un fingerprinting molecolare via PCR si basava quasi esclusivamente sulla amplificazione selettiva di loci ipervariabili, come i mini- ed i microsatteliti. Questo tipo di approccio era, per sua stessa definizione, limitato agli organismi eucariotici e quindi non era applicabile ai batteri, in quanto le sequenze bersaglio si ritenevano e sono effettivamente assenti nel genoma batterico. Più recentemente tuttavia anche alcune branche della microbiologia hanno fatto propria, applicandola ai batteri, la tecnica del fingerprinting molecolare. Questo può essere richiesto per almeno tre diversi motivi: a) per identificare (dare un nome) e/o tipizzare un microrganismo ignoto; b) per evidenziare la presenza e l'eventuale quantità di un batterio in un determinato ambiente naturale (monitoraggio), dove "naturale" debba intendersi nella sua accezione più generale (ambienti acquatici, il suolo, l'aria, ma anche un tratto di intestino, un bioreattore, il latte e così via); c) per studiare una popolazione microbica naturale, allo scopo di verificarne il grado di polimorfismo genetico, oppure per isolare e/o identificare batteri con delle particolari capacità metaboliche, o ancora per verificarne le eventuali fluttuazioni di struttura e composizione nel tempo (dinamica), in conseguenza delle variazioni delle condizioni ambientali, in modo da poter correlare la maggior o minor quantità di uno o più microrganismi ad un determinato parametro ambientale.

L'importanza di queste problematiche è del tutto ovvia se si pensa al ruolo che i microrganismi svolgono in una miriade di processi naturali e/o biotecnologici ed al loro contributo nelle patologie umane, animali e vegetali. Di non trascurabile importanza è anche il fatto che, grazie alla tecnologia del DNA ricombinante, è stato possibile ottenere dei microrganismi geneticamente modificati (GEM) con delle caratteristiche metaboliche particolari ed accentuate, capaci ad esempio di degradare prodotti molto tossici, come i pesticidi, gli idrocarburi ed altri, o di conferire resistenza alle colture vegetali nei confronti di agenti biologici o chimico-fisici. L'introduzione dei GEM nell'ambiente naturale ha innescato una serie di preoccupazioni sul destino di questi microrganismi e su quali eventuali perturbazioni questi potrebbero apportare sugli equilibri naturali preesistenti in quanto non sono note le interazioni esistenti tra i microrganismi e l'ambiente in cui essi vivono. Tale ambiente, qualunque esso sia, è caratterizzato da una estrema complessità, per la presenza di un numero notevole di specie batteriche, di scambio orizzontale di materiale genetico tra i microrganismi, di condizioni ambientali che variano continuamente; è evidente perciò che per un'analisi adeguata dell'impatto ambientale provocato dai GEM è prioritaria la disponibilità di metodi affidabili per il loro monitoraggio.

Un ultimo aspetto applicativo che non può essere trascurato e che nel futuro assumerà una importanza crescente è relativo all'idea, che sempre più sta prendendo campo, secondo la quale molti dei processi che avvengono in un ambiente naturale sono legati non alla presenza ed attività di singoli ceppi batterici, ma a quella di consorzi microbici, un insieme cioè di microrganismi appartenenti a specie diverse che, singolarmente, non sarebbero capaci di portare a termine un determinato processo (biodegradativo etc.), cosa che invece riesce a fare la comunità microbica nella sua globalità. Assumono importanza notevole in questo quadro i batteri non coltivabili che rappresentano una frazione elevatissima (99%-99,9% della intera popolazione batterica naturale) ed il cui ruolo nell'ambiente è ignoto. In una prospettiva futura l'analisi delle comunità microbiche naturali assumerà perciò una importanza sempre maggiore.

In questo senso microbiologia ed ecologia saranno sempre più interconnesse in quella disciplina, detta ecologia microbica, che cerca di comprendere quali siano le relazioni esistenti tra microrganismi e l'ambiente in cui essi risiedono.

Metodi molecolari basati sulla PCR per l'identificazione, la tipizzazione ed il monitoraggio dei batteri

Le procedure "standard" di identificazione dei batteri, o metodi classici, richiedono l'isolamento di colture pure seguito da test che analizzano alcune caratteristiche fenotipiche, quali i caratteri biochimici e morfologici. Se alcune di queste metodologie si sono rivelate efficaci per la identificazione di alcuni batteri, resta il fatto che questi kit sono progettati, di solito, per identificare un numero relativamente ristretto di microrganismi e in genere non possiedono tutti quei requisiti che un buon protocollo per la identificazione e/o la tipizzazione di un isolato batterico dovrebbe avere: specificità, sensibilità, riproducibilità, rapidità, semplicità e basso costo. Per questo motivo negli ultimi anni si è assistito ad un fiorire continuo di metodologie molecolari che hanno affiancato ed in parte soppiantato le tecniche "classiche". In particolare le tecniche basate sulla PCR (AFLP, AP-PCR, DAF, RAPD, rep-PCR, eric-PCR, tDNA-PCR, ARDRA, ITS, sequenziamento del 16S rDNA) si sono rivelate un mezzo estremamente veloce ed efficace per l'identificazione, la tipizzazione ed il monitoraggio dei batteri. Le varie tecniche, che differiscono oltre che per l'approccio operativo, anche per la loro specificità, generano un fingerprinting molecolare che assume le sembianze di un codice a barre, il numero delle quali dipende dal tipo di tecnica utilizzata. L'identificazione di un isolato batterico ignoto avviene mediante confronto con il codice a barre ottenuto con uno o più ceppi tipo.

In generale questi metodi possono essere suddivisi in due classi, la prima delle quali comprende quei metodi che prevedono la conoscenza almeno della sequenza di appaiamento dei due primer; la seconda include quelle metodologie che permettono di amplificare uno o più frammenti di DNA anonimi, senza che sia necessaria una previa conoscenza delle sequenze bersaglio.

Amplificazione selettiva di sequenze specifiche (ITS, tDNA-PCR, eric-PCR, rep-PCR, ARDRA)
Con queste tecniche, che necessitano della presenza e della conoscenza di una sequenza di DNA specifica del microrganismo in esame, l'ottenimento o meno di una banda di DNA amplificato è indice della presenza/assenza del microrganismo nel campione analizzato. Queste metodologie, inizialmente applicate alla identificazione di microrganismi a crescita lenta (micoplasmici, etc) e per i quali esistono già dei kit commerciali per la diagnosi di routine, hanno permesso la messa a punto dei protocolli di identificazione per oltre 150 patogeni dell'uomo, di animali e piante. Questo tipo di analisi tuttavia è adatta per monitorare l'eventuale presenza di un batterio in un campione, ma non ne permette la tipizzazione, che può invece ottenersi mediante l'uso di primer che permettono l'amplificazione selettiva delle sequenze REP (repetitive extragenic palindromic) o ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus), che sono ripetute e disperse nel genoma batterico, o dei geni codificanti i tRNA (tDNA-PCR). In questo caso non si ottiene una singola banda di amplificazione, ma una serie di frammenti di DNA di numero e lunghezza diversi a seconda del ceppo analizzato.

L'evento di PCR può anche essere accoppiato ad un'analisi di restrizione; in questi casi (ARDRA, amplified ribosomal DNA restriction analysis e ITS, internal transcribed spacer) la metodica

prevede l'amplificazione del 16S rDNA o della regione intergenica compresa tra il 16S rDNA ed il 23S rDNA, rispettivamente, utilizzando dei primer "universali". In generale l'evento di PCR comporta l'ottenimento di un unico prodotto di amplificazione di una certa dimensione che, da solo, non è sufficiente a discriminare ceppi appartenenti alla stessa specie.

La natura stessa del gene codificante il 16S rDNA, costituito da un alternarsi di regioni costanti e regioni variabili, tuttavia, fa sì che il trattamento con un enzima di restrizione provochi la formazione di un profilo di restrizione che molto spesso è caratteristico di una specie e, in certi casi, di singoli ceppi. Questo è ancora più vero quando si analizza l'ITS, in quanto essa rappresenta una regione più variabile del gene codificante il 16 S rRNA.

Una inequivocabile identificazione di un isolato batterico si può ottenere mediante sequenziamento via PCR del 16S rDNA amplificato; questa metodologia, per quanto ultimamente sia stata affinata e velocizzata, non può tuttavia essere estesa ad un gran numero di isolati batterici a causa del suo costo e della sua complessa operatività.

I campi di applicazione di queste metodologie sono i più disparati: dalla epidemiologia molecolare alla diagnosi di malattie infettive, dal controllo degli alimenti all'analisi delle popolazioni naturali.

Amplificazione di sequenze anonime (RAPD, AP-PCR, DAF, AFLP)

Gli acronimi RAPD (random amplified polymorphic DNA), AP-PCR (arbitrarily primed - PCR), DAF (DNA amplification fingerprinting), AFLP (amplified fragment length polymorphism) definiscono un insieme di metodologie che si differenziano soltanto per alcune caratteristiche operative, ma che trovano la loro base comune nella possibilità di amplificare delle sequenze anonime di DNA, utilizzando un solo oligonucleotide come innesco per la Taq polimerasi.

L'amplificazione è resa possibile dal fatto che la reazione viene effettuata in condizioni di bassa stringenza, cioè ad una temperatura di appaiamento del primer molto bassa. In tal modo le molecole del primer possono appaiarsi anche a sequenze di DNA non esattamente complementari alla propria e potranno perciò innescare la reazione di polimerizzazione da parte della Taq polimerasi in più punti del genoma bersaglio. In questo modo alla fine della reazione di amplificazione si otterrà non un singolo frammento amplificato, ma una serie di frammenti il cui numero e la cui lunghezza varierà da ceppo a ceppo.

Il sistema, che non prevede alcuna conoscenza della sequenza bersaglio, si è rivelato di una semplicità operativa, di una sensibilità e specificità tali che queste metodologie sono state utilizzate per tipizzare una quantità imponente di ceppi batterici, importanti non soltanto dal punto di vista clinico, ma anche da quello ambientale.

Strategia per l'identificazione e la tipizzazione di comunità microbiche naturali

Come si è visto esistono numerose tecniche volte alla identificazione, tipizzazione e/o monitoraggio dei batteri e, a seconda del problema che viene posto, è preferibile l'utilizzazione di un metodo rispetto ad un altro.

Generalmente la difficoltà maggiore che si incontra è quella di stabilire la giusta strategia per la soluzione del problema specifico. Per questo motivo sono state messe a punto strategie per il monitoraggio, l'identificazione e la tipizzazione dei microrganismi coltivabili presenti in un qualsiasi ambiente naturale.

Una strategia molecolare individuata a questo scopo si basa sull'uso combinato di due metodiche (l'analisi del 16S rDNA e la tecnica RAPD), prevede i seguenti passaggi sequenziali: 1) isolamento dei batteri dall'ambiente naturale; 2) amplificazione del 16S rDNA dei singoli batteri via PCR; 3) analisi di restrizione del 16S rDNA amplificato (ARDRA). In questo modo è possibile suddividere i ceppi, a seconda del profilo di restrizione ottenuto, in gruppi, corrispondenti a specie diverse; 4) identificazione di uno o più rappresentanti dei singoli gruppi ottenuti con l'analisi ARDRA e RAPD mediante sequenziamento via PCR del 16S rDNA.

Questo approccio metodologico è stato utilizzato con successo per lo studio e la caratterizzazione di popolazioni microbiche isolate da ambienti completamente diversi quali: 1) le acque inquinate da idrocarburi; 2) depuratori di scarichi industriali; 3) suoli inquinati da reflui suini; 4) rizosfera del mais; 5) apparato digerente di alcuni animali; 6) latte; 7) batteri luminosi simbiotici dei pesci.

E' utilizzato anche per l' identificazione e l'analisi dei fitoplasmi, microrganismi patogeni per le piante ed attualmente non coltivabili.
Queste strategie hanno dimostrato di poter essere applicate su vasta scala in particolare per l'identificazione ed il monitoraggio dei microrganismi non coltivabili.