

Dalla tassonomia classica alla chemiotassonomia

La tassonomia batterica si basa su analisi fenotipiche che considerano:

- a quale altro microrganismo assomiglia
- il suo metabolismo energetico
- movimento
- proprietà di superficie (tipo di flagelli, fimbriae)

Alcune caratteristiche fenotipiche di valore tassonomico	
Categoria principale	Componenti
Morfologia Motilità	Forma; dimensione; reazione Gram Motilità per mezzo di flagelli; motilità per scivolamento; motilità per mezzo di vescicole gassose; assenza di motilità
Nutrizione e fisiologia	Meccanismo di conservazione dell'energia (fototrofo, chemoorganotrofo, chemiolitotrofo); relazione con l'ossigeno; richiesta / tolleranza a temperatura, pH, e sale; capacità di usare varie fonti di carbonio, azoto e zolfo
Altri fattori	Pigmenti; inclusioni cellulari, o strati superficiali; patogenicità; sensibilità agli antibiotici

Analisi fenotipica

Riveste ancora un ruolo molto importante: le principali caratteristiche fenotipiche sono le seguenti

Tabella 21.2 Alcune caratteristiche fenotipiche di valore tassonomico

<i>Categoria</i>	<i>Caratteristiche</i>
Morfologia	Morfologia di colonia; colorazione Gram; dimensioni e forma; presenza e tipo dei flagelli; presenza di spore; corpi di inclusione (granuli di PHB ^a , glicogeno o polifosfati, vescicole gassose, magnetosomi); capsula; strato cristallino o mucillaginoso; peduncoli o appendici; formazione di corpi fruttiferi.
Mobilità	Non mobili; mobilità per scivolamento; mobilità flagellare; sciamatura; mobilità per mezzo di vescicole gassose.
Metabolismo	Meccanismi di conservazione dell'energia (fototrofi, chemiorganotrofi, chemiolitotrofi); utilizzo di composti carboniosi, azotati o sulfurei; fermentazione degli zuccheri; fissazione dell'azoto; necessità nutrizionali.
Fisiologia	Temperatura, pH e range di salinità necessari alla crescita; risposta all'ossigeno (aerobica, facoltativa, anaerobica); presenza di catalasi e ossidasi; produzione di enzimi extracellulari.
Chimica lipidica cellulare	Acidi grassi ^b ; lipidi polari; chinoni respiratori.
Chimica lipidica della parete	Presenza o assenza di peptidoglicano; composizione amminoacidica dei cross-link; presenza o assenza di ponti tra i cross-link.
Altre caratteristiche	Pigmenti; luminescenza; sensibilità agli antibiotici; sierotipo, produzione di composti unici, per esempio antibiotici.

^aAcido poli-B-idrossibutirrico (si veda il Paragrafo 3.10).

FAME (Fatt acid Methyl Ester) : Analisi degli acidi grassi

Il tipo e la qualità degli acidi grassi presenti nei lipidi della membrana citoplasmatica e della parete esterna dei Gram- sono caratteristiche fenotipiche importanti .

La FAME è molto utilizzata sia nei laboratori clinici che nell'ispezione di acqua e cibo.

Che cosa si cerca?

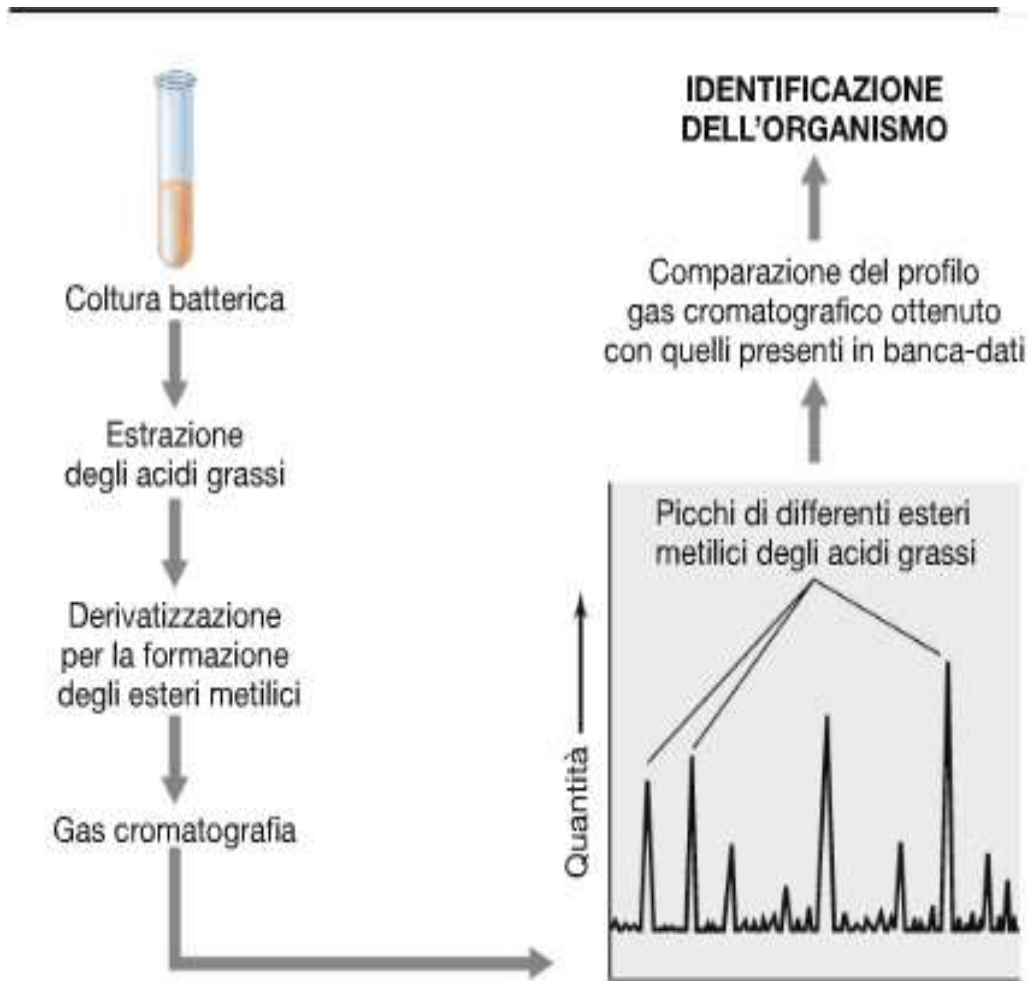
La composizione degli acidi grassi dei batteri, ovvero la presenza o assenza di doppi legami, anelli catene ramificate varia da specie a specie

Classi di acidi grassi nei *Bacteria*

Classe/Esempio	Struttura dell'esempio
I. Saturi: acido tetradecanoico	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{HO}-\text{C}-(\text{CH}_2)_{12}-\text{CH}_3 \end{array}$
II. Insaturi: acido omega-7-cis esadecanoico	$\begin{array}{c} \text{O} \qquad \qquad \text{H} \quad \text{H} \\ \parallel \qquad \qquad \backslash \quad / \\ \text{HO}-\text{C}-(\text{CH}_2)_6-\text{C}=\text{C}-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_3 \\ \qquad \qquad \qquad / \quad \backslash \end{array}$
III. Ciclopentenici: acido cis-7,8-metilene esadecanoico	$\begin{array}{c} \text{O} \qquad \qquad \qquad \text{CH}_2 \\ \parallel \qquad \qquad \qquad / \quad \backslash \\ \text{HO}-\text{C}-(\text{CH}_2)_7-\text{C}-\text{C}-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}_3 \\ \qquad \qquad \qquad \backslash \quad / \\ \qquad \qquad \qquad \text{H} \quad \text{H} \end{array}$
IV. Ramificati: acido 13-metil-tetradecanoico	$\begin{array}{c} \text{O} \qquad \qquad \qquad \text{CH}_3 \\ \parallel \qquad \qquad \qquad / \quad \backslash \\ \text{HO}-\text{C}-(\text{CH}_2)_{11}-\text{C} \\ \qquad \qquad \qquad \backslash \quad / \\ \qquad \qquad \qquad \text{H} \quad \text{CH}_3 \end{array}$
V. Idrossilati: acido 3-idrossi-tetradecanoico	$\begin{array}{c} \text{O} \qquad \qquad \text{H} \\ \parallel \qquad \qquad \backslash \\ \text{HO}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_3 \\ \qquad \qquad \qquad / \\ \qquad \qquad \qquad \text{OH} \end{array}$

(a)

Come si effettua l'analisi?? Sono attualmente conosciuti oltre 200 differenti acidi grassi



Si effettua su acidi grassi estratti per idrolisi da colture batteriche cresciute in condizioni standardizzate

Gli acidi grassi vengono derivatizzati per la formazione dei corrispettivi composti metil-esteri che essendo volatili possono essere analizzati per gas cromatografia.

Il cromatogramma ottenuto mostra un picco in corrispondenza di ogni particolare estere metilico e la sua altezza ne indica la quantità

Il cromatogramma viene poi comparato con i profili di migliaia di batteri di riferimento, cresciuti nelle stesse condizioni

LIMITI della tecnica FAME

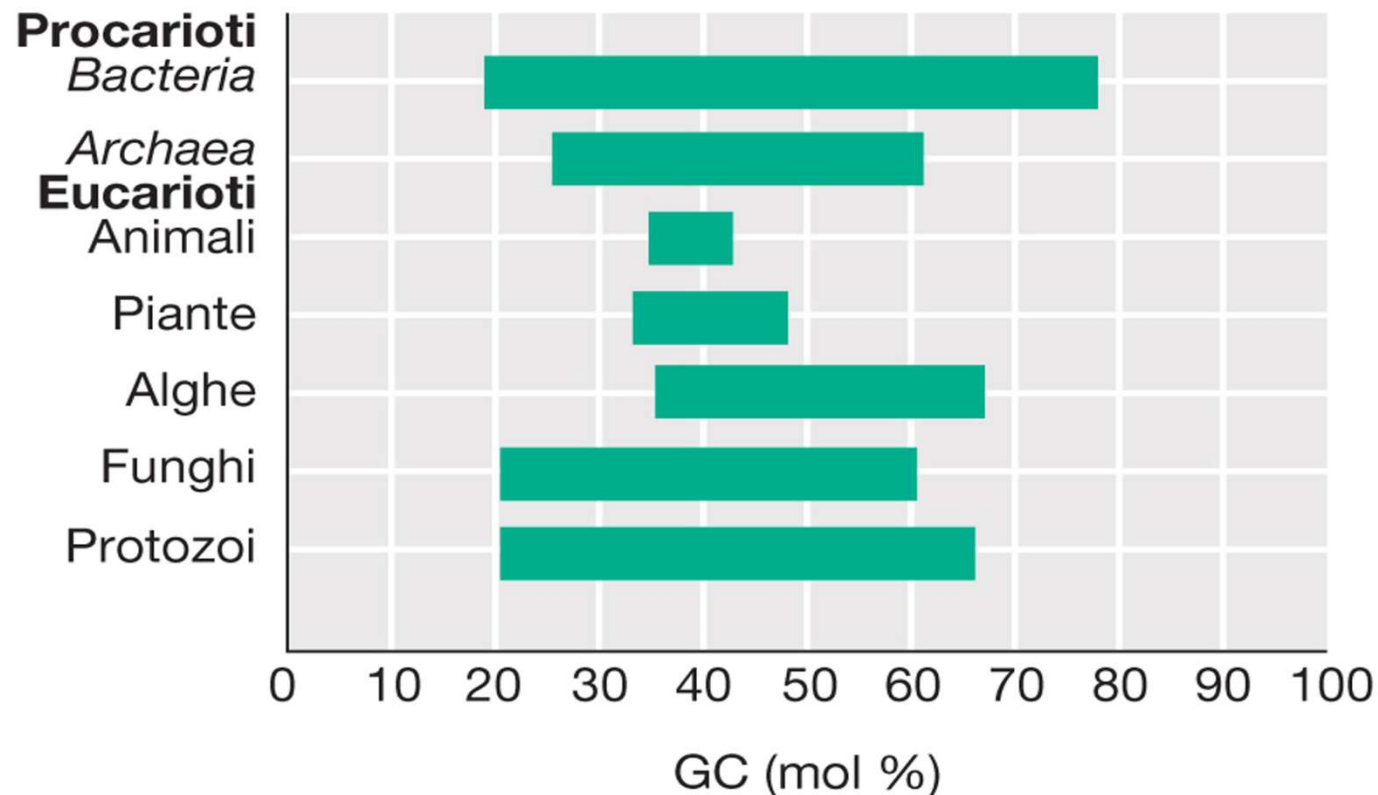
I marcatori fenotipi compresi gli acidi grassi possono variare a seconda dei parametri ambientali quali temperatura, fase di crescita, terreno di coltura.

Quindi per una analisi comparativa attendibile bisogna lavorare in condizioni standardizzate.

Quindi per avere risultati credibili bisogna lavorare in determinate condizioni di crescita che non sono applicabili a tutti i batteri.

Contenuto in GC

Il contenuto in GC del DNA genomico definito come percentuale di guanina più citosina presente nel DNA di un organismo fornisce informazioni utili per la tassonomia



Nei procarioti varia ampiamente il contenuto in GC dal 20 all' 80% variazione più ampia rispetto agli eucarioti

Cosa si può ricavare dal contenuto in GC?

Stesso contenuto in GC:

possono essere simili o diversi

due microrganismi possono avere lo stesso contenuto in GC ma essere diversi in quanto data una particolare composizione di basi del DNA è possibile ottenere una grande varietà di sequenze.

Diverso contenuto in GC

sicuramente diversi

Se il contenuto in GC tra due microrganismi differisce più del 5% essi avranno in comune poche sequenze di DNA e di conseguenza poco correlati.

Geni utilizzati per ricostruzione filogenetica nei microrganismi oltre al gene per RNA ribosomiale 16S

GENE/FAMIGLIA/FUNZIONE
DNA polimerasi
Sintesi purine e pirimidine
Ciclo TCA
Fattori d'inizio e di allungamento della traduzione
RNA ribosomali
Proteine ribosomali
Aminoacil-t-RNA sintetasi
Biosintesi degli aminoacidi
Proteine <i>heat-shock</i>
Biosintesi di cofattori
Parete cellulare

SEQUENZE TIPIZZANTI

L'analisi in silico ha rivelato la presenza di SIGNATURE SEQUENCES brevi oligonucleotidi caratteristici di un determinato gruppo di organismi

Alcune signature sequences possono definire uno specifico gruppo all'interno di un Dominio, o un particolare genere o una specie

Sequenze tipizzanti negli rRNA 16S (o 18S) nei tre Domini

Oligonucleotide tipizzante ^a	Posizione approssimativa ^b	Frequenza di comparsa ^c		
		Archea	Batteri	Eucarioti
CACYYG	315	0	>95	0
AAACUCAAA	910	3	100	0
AAACUAAAAG	910	100	0	100
YUYAAUUG	960	100	<1	100
CAACCYYCR	1110	0	>95	0
UCCUG	1380	>95	0	100
UACACACCG	1400	0	>99	100
CACACACCG	1400	100	0	0

^a Y, qualsiasi pirimidina; R, qualsiasi purina.

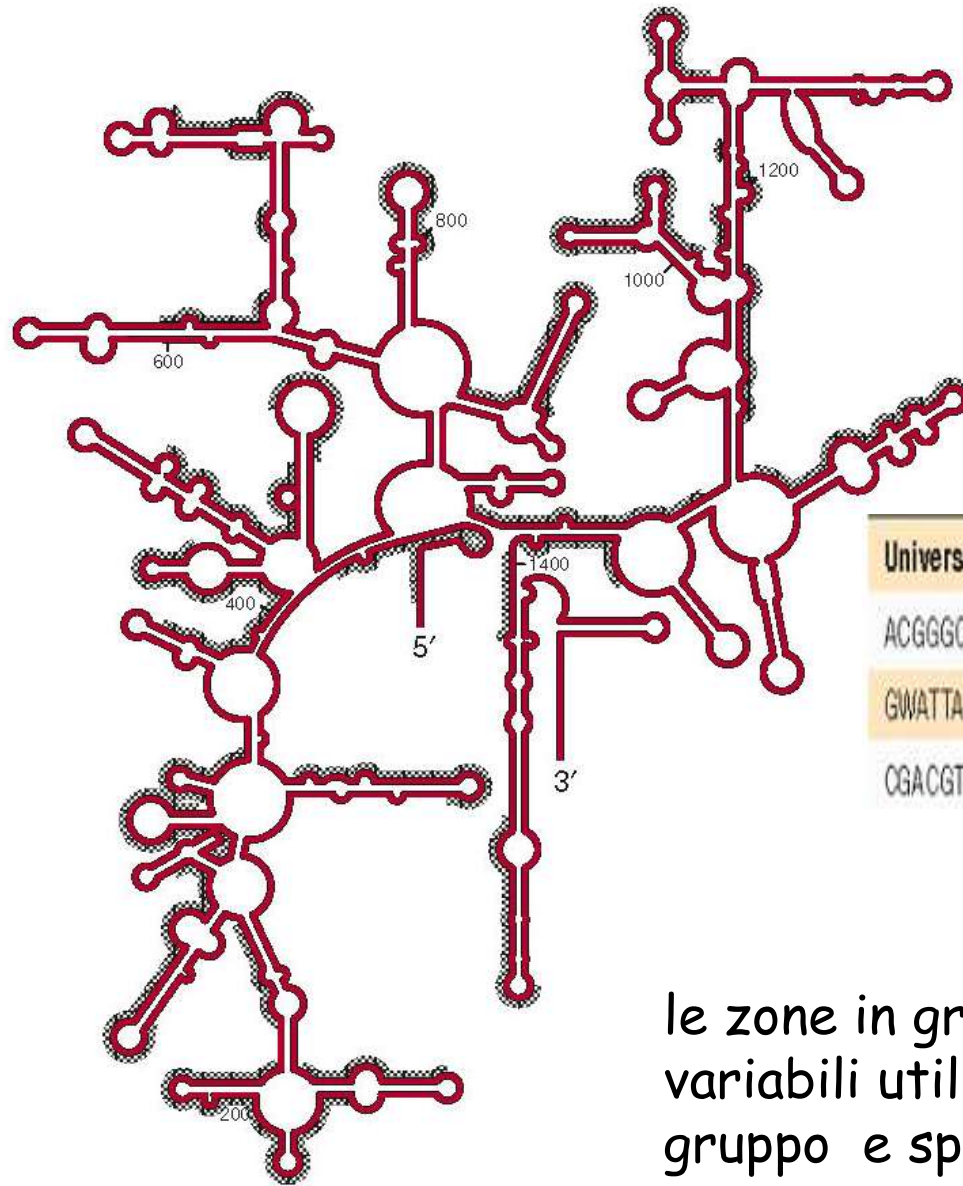
^b Fare riferimento alla figura 11.11c per lo schema di numerazione dell'rRNA 16S.

^c La comparsa si riferisce alla percentuale di organismi esaminati in ciascun dominio contenente la sequenza.

Sonde filogenetiche e FISH

Sonde sia quelle universali che specifiche sono filamenti di acido nucleico che vengono utilizzate per ibridare acido nucleico complementare.

Sonde Universali: legano sequenze complementari **CONSERVATE** presenti in tutti gli organismi indipendentemente dal loro dominio di appartenenza



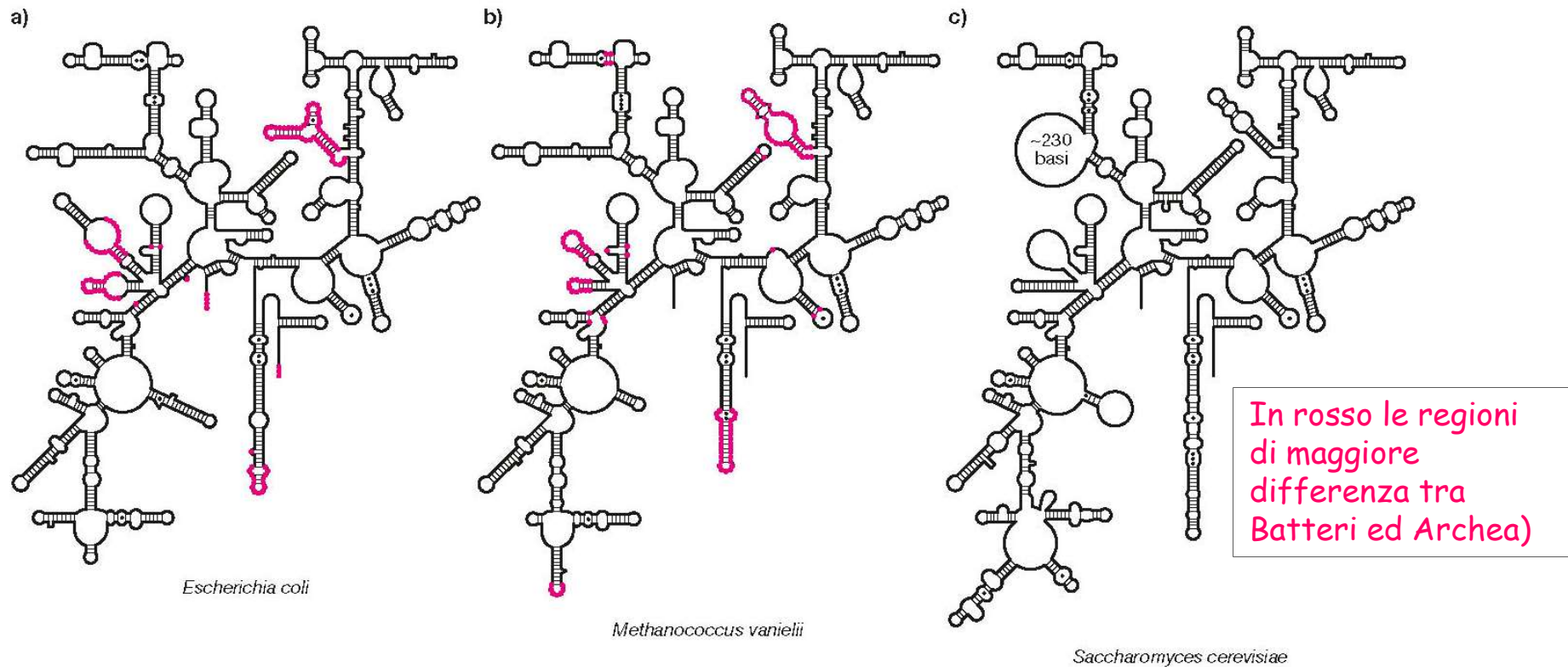
Struttura dell'RNA 16S .

Alcune sequenze del DNA x RNA 16S sono così conservate che sono state utilizzate per designare primer universali

Universale	
ACGGGCGGTGTGTRC	16S, 1392-1406
GWATTACCGCGGCKGCTG	16S, 522-536
CGACGTTYTAAACCCAGCTC	23S, 2576-2595

le zone in grigio indicano le sequenze variabili utilizzate per disegnare sonde gruppo e specie specifiche.

Confronto tra RNA 16S di Batteri, Archea ed Eucarioti



Sequenze signatures utilizzate per distinguere microrganismi dei 3 Domini.

Dominio	Sequenza	Posizione	Gruppo
	GTGCTCCCCGCCAATT CCT	16S, 915-934	Archaea
	TCCGGCRGGATCAACCGGAA	16S, 2-21	Archaea
	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S, 338-355	Bacteria
	ACCGCTTGTGCGGGCCC	16S, 927-942	Bacteria
	ACCAGACTTGCCCTCC	16S, 502-516	Eukarya
	GGGCATCACAGACCTG	16S, 1195-1209	Eukarya

Si possono disegnare sonde filogenetiche specifiche che reagiscono solo con i ribosomi di un singolo dominio, oppure con linee specifiche all'interno di una particolare famiglia, genere o specie.

FISH

Per l'identificazione filogenetica si usano oligonucleotidi fluorescenti la cui sequenza di basi sia complementare a sequenze presenti nell'RNA ribosomiale (rRNA 16 S o 23S nei procarioti, 18S o 28S negli eucarioti).

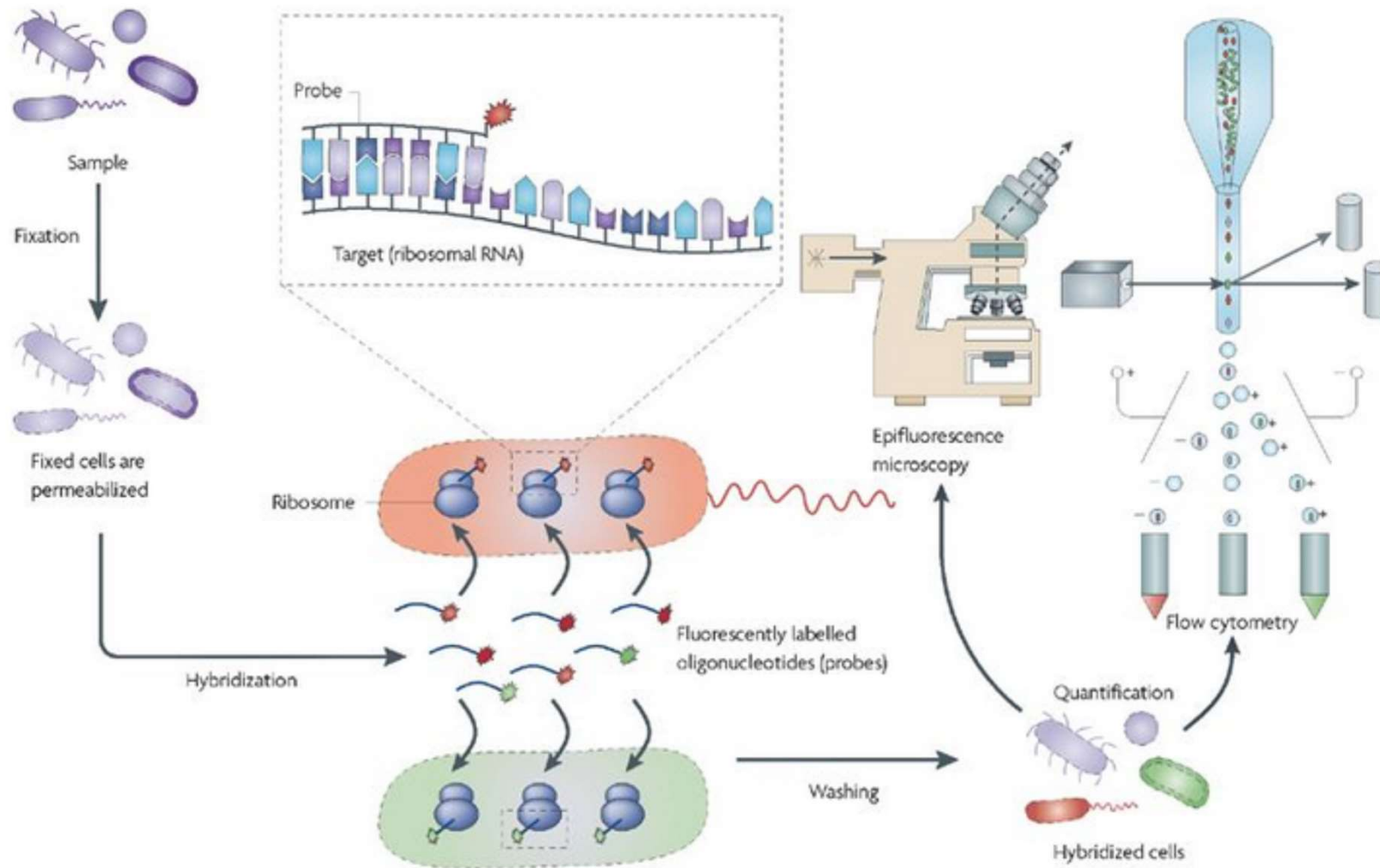
Questi oligonucleotidi penetrano nelle cellule senza che sia necessario lisciarle e ibridano direttamente con rRNA presente nei ribosomi.

Poiché i ribosomi sono presenti diffusi nel citoplasma, la cellula diventa interamente fluorescente.

Si possono progettare

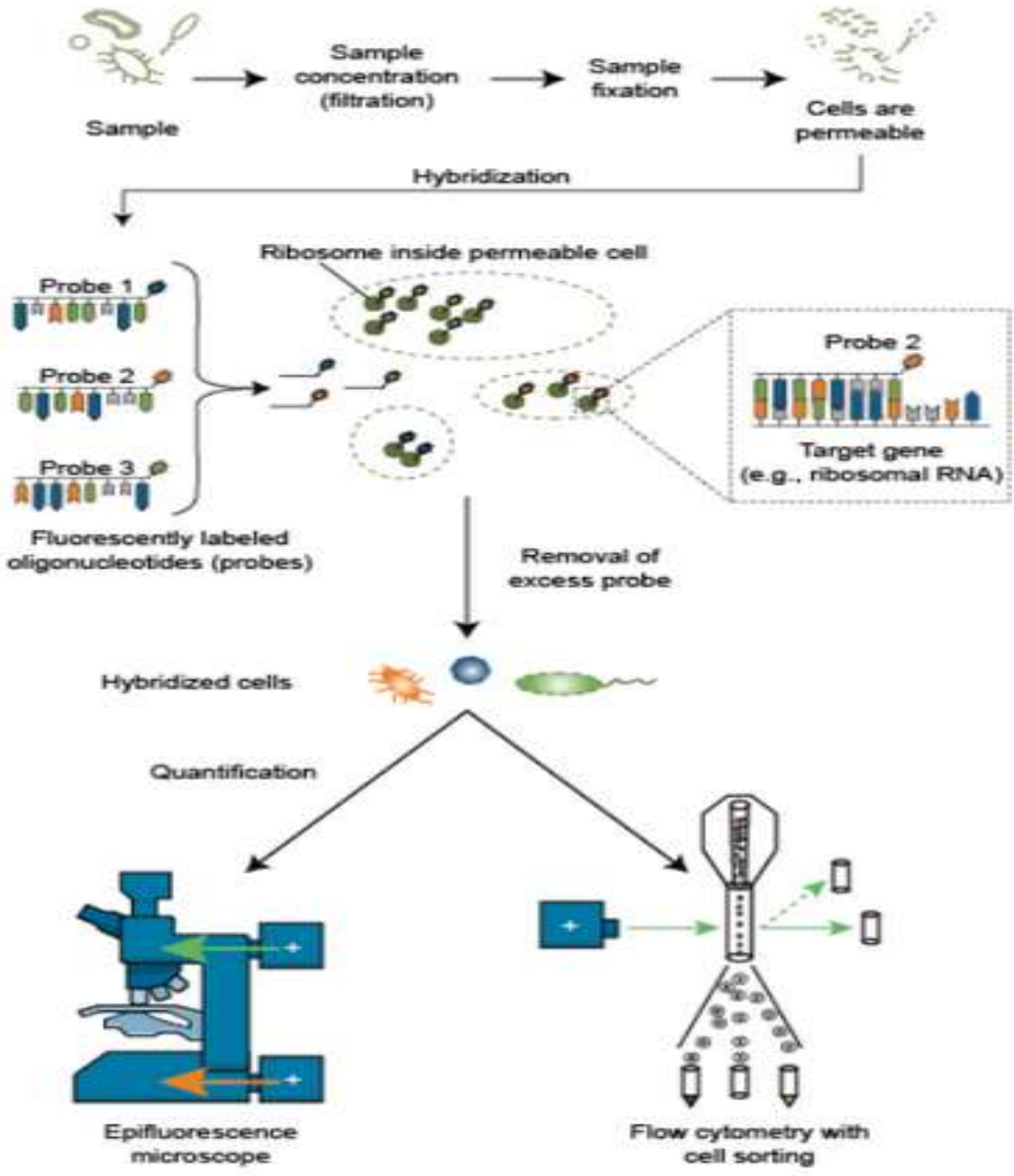
- sonde che riconoscono una singola specie o gruppi di specie correlate
- sonde più generali che riconoscono tutte le cellule appartenenti ad un determinato dominio filogenetico.

FISH procedure



The sample is first fixed to stabilize the cells and permeabilize the cell membranes. The labelled oligonucleotide probe is then added and allowed to hybridize to its intracellular targets before the excess probe is washed away. The sample is then ready for single-cell identification and quantification by either epifluorescence microscopy or flow cytometry.

FISH



Step 1. Fixation and permeabilization

Step 2. Hybridization

Step 3. Washing

Step 4. Visualization and enumeration

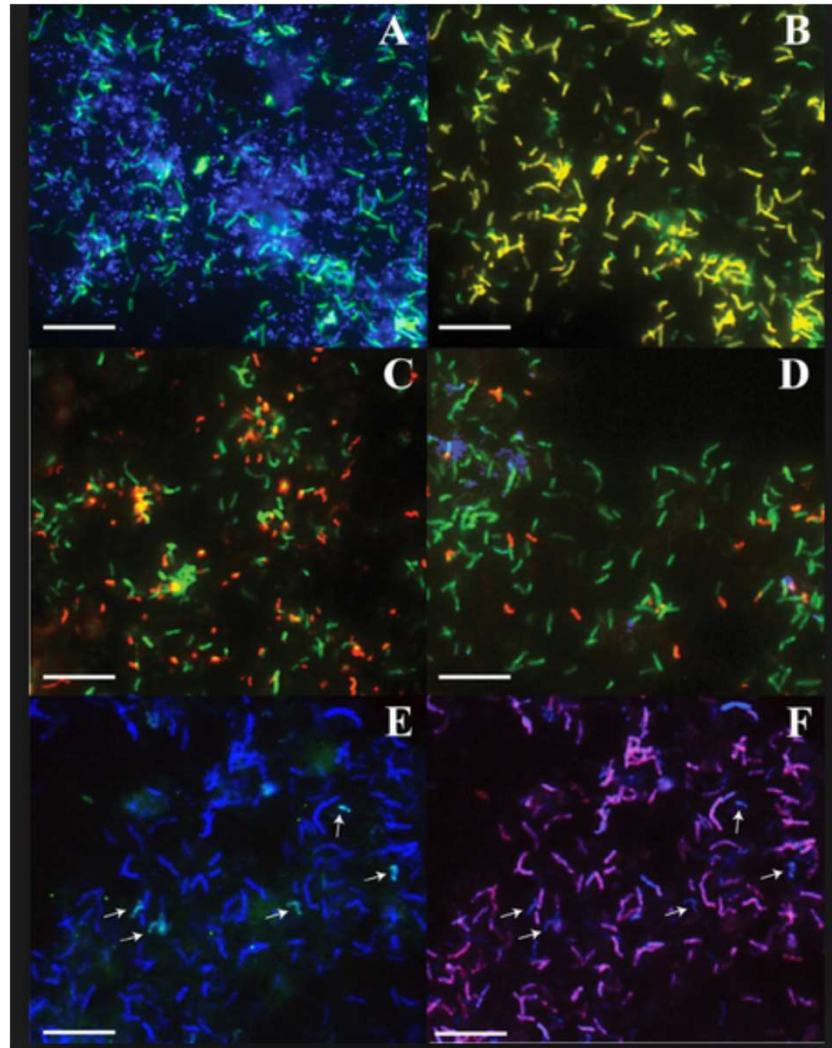


FIG. Fluorescence in situ hybridization images of UBA BS biofilms. (A) Sample Aug07, showing DNA (blue; most small dots are Archaea) and general bacteria (green). (B) Sample Aug07, showing general bacteria (green) and *Leptospirillum* group IV UBA BS (yellow). (C) Sample Jun08, showing general bacteria (green) and *L. ferrodiazotrophum* (red). (D) Sample Aug07, showing general bacteria (green), *L. ferrodiazotrophum* (red), and *Leptospirillum* group II 5wayCG type (blue). (E) Sample Island 2, showing general bacteria (blue), *L. ferrodiazotrophum* (green/light blue). (F) Sample Island 2, showing general bacteria (blue) and *Leptospirillum* group IV UBA BS (purple/pink). The images in panels A and B were taken from the same field of view, as were the images in panels E and F. The white arrows indicate *Leptospirillum* group III cells. Bars, 1 μ m.

FISH fluorescent in situ hybridization

Il legame delle sonde ai ribosomi può essere visualizzato al microscopio a fluorescenza , utilizzando dei particolari marcatori fluorescenti legati alla sonda e trattando le cellule in modo tale che diventino permeabili ai reagenti.

FISH ampiamente utilizzata

in diagnostica clinica

- Rapida identificazione di specifici patogeni in campioni prelevati da pazienti
- Elimina la necessità di coltivare il microrganismo

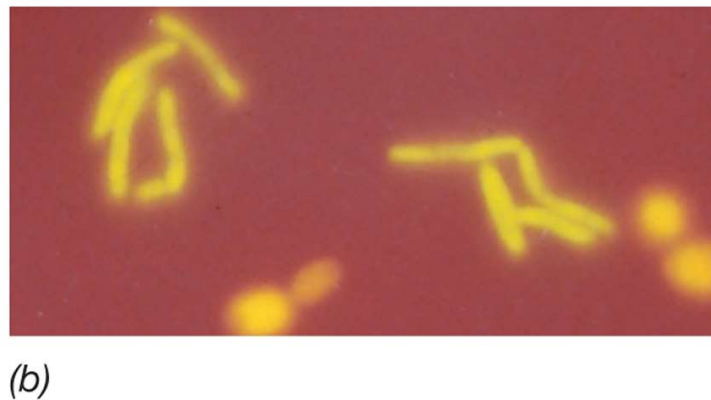
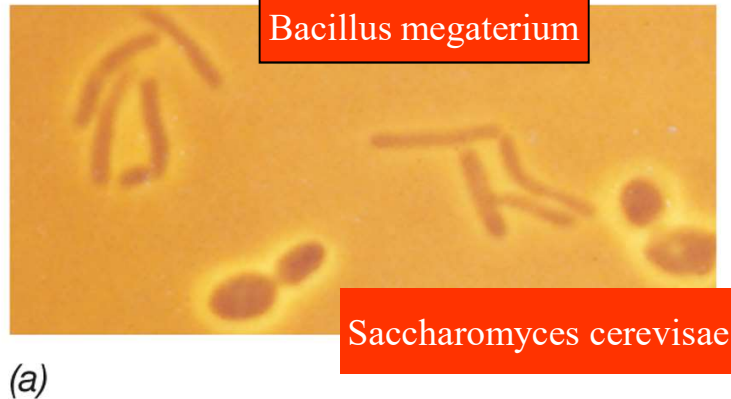
ecologia microbica

Identificazione diretta di comunità microbihe

SONDE filogenetiche

Filamenti di acido nucleico marcato possono ibridarsi con acido nucleico complementare

- Sonde generali (p.e. RNA ribosomiale)
- Sonde specifiche (p.e. limitate ai Batteri o Archea)

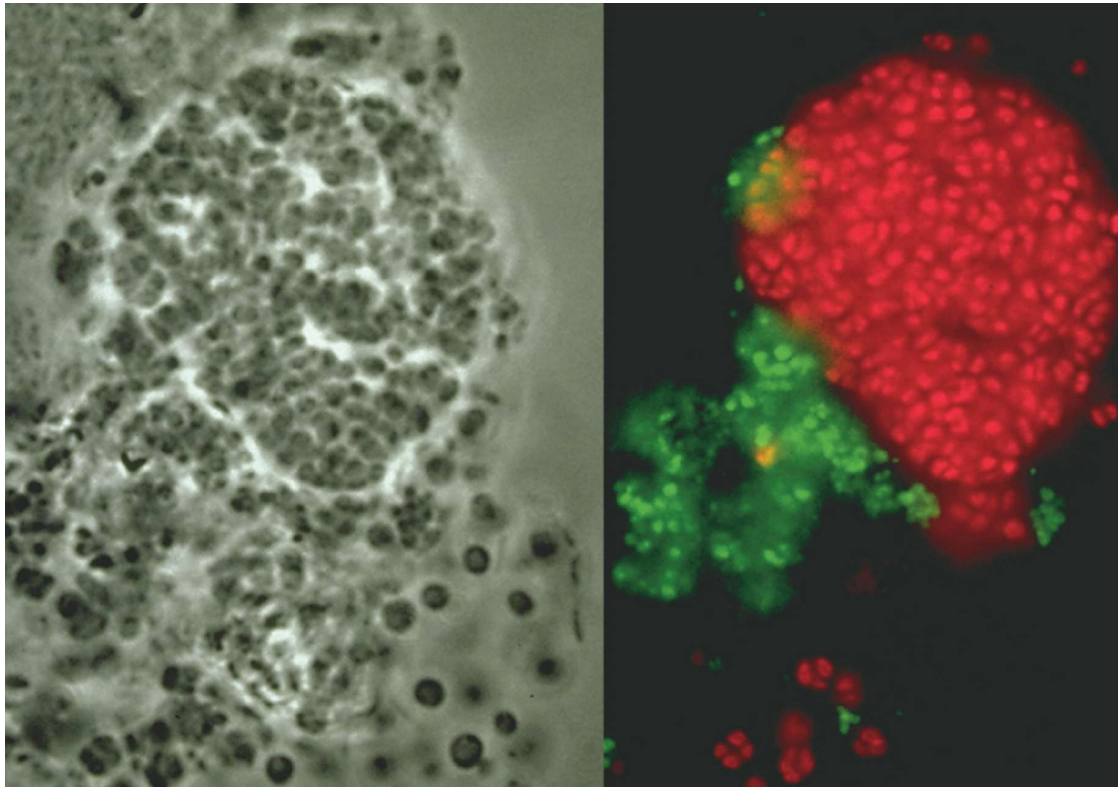


Cellule colorate con sonde universali di rRNA che reagisce sia con procarioti che eucarioti

Cellule colorate con una sonda specifica per gli rRNA eucariotici

FISH ed ecologia microbica

Analisi di un frammento di fango

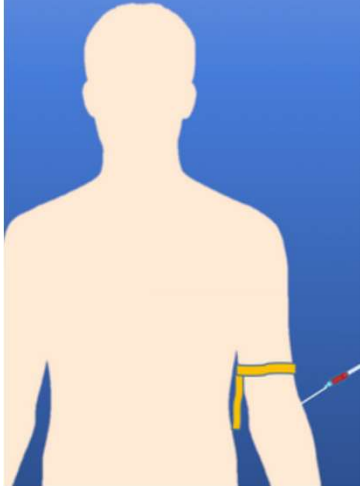


Sonda rossa è specifica per i batteri nitrificanti capaci di ossidare l'ammoniaca

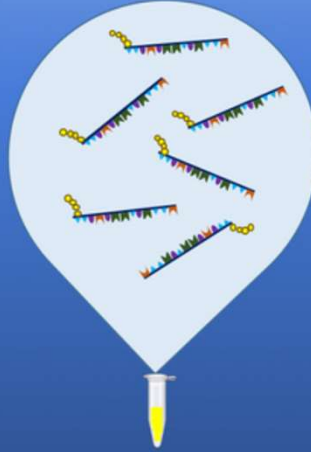
sonda verde specifica per i batteri nitrito ossidanti

FISH for Bacterial Pathogen Identification

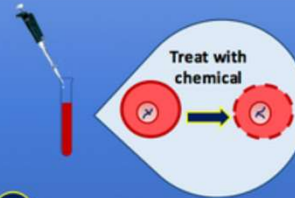
1 Collect infected tissue sample from patient.



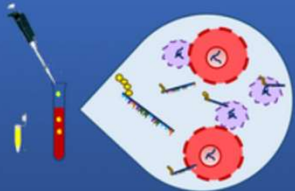
2 Synthesize complementary oligonucleotide for suspected pathogen with fluorescent tag chemically attached.



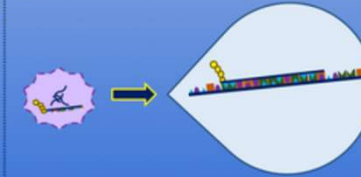
3 Chemically treat tissue sample to make the membranes of all cells permeable to the fluorescently tagged oligonucleotide.



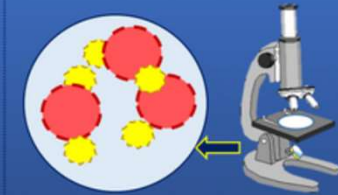
4 Add fluorescently tagged complementary oligonucleotide to sample.



5 The fluorescently tagged oligonucleotide will bind only to the pathogenic DNA.



6 Plate sample and observe under microscope. The pathogenic cells will fluoresce.



CARD FISH: Catalized Reporter Deposition (Precipitazione Catalizzata dell'indicatore)

La FISH può essere utilizzata oltre che per caratterizzare la diversità filogenetica dei microrganismi presenti in un determinato habitat anche per misurare l'espressione genica dei microrganismi in un campione naturale.

Poiché in questo caso il bersaglio della sonda è mRNA molto meno abbondante del rRNA non si possono utilizzare le tecniche FISH classiche

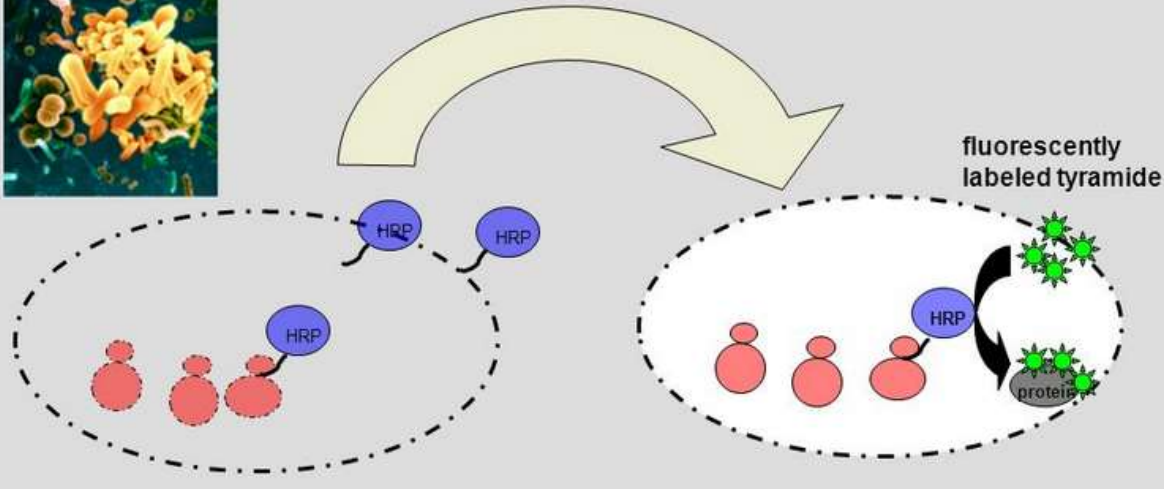
Il segnale fluorescente deve essere amplificato :

1. si coniuga la sonda di acido nucleico con una molecola di enzima **perossidasi** (Horseradish (rafano) Peroxidase HRP) invece che al fluorocromo.

Dopo l'ibridazione il preparato viene trattato con TIRAMIDE (composto altamente fluorescente)

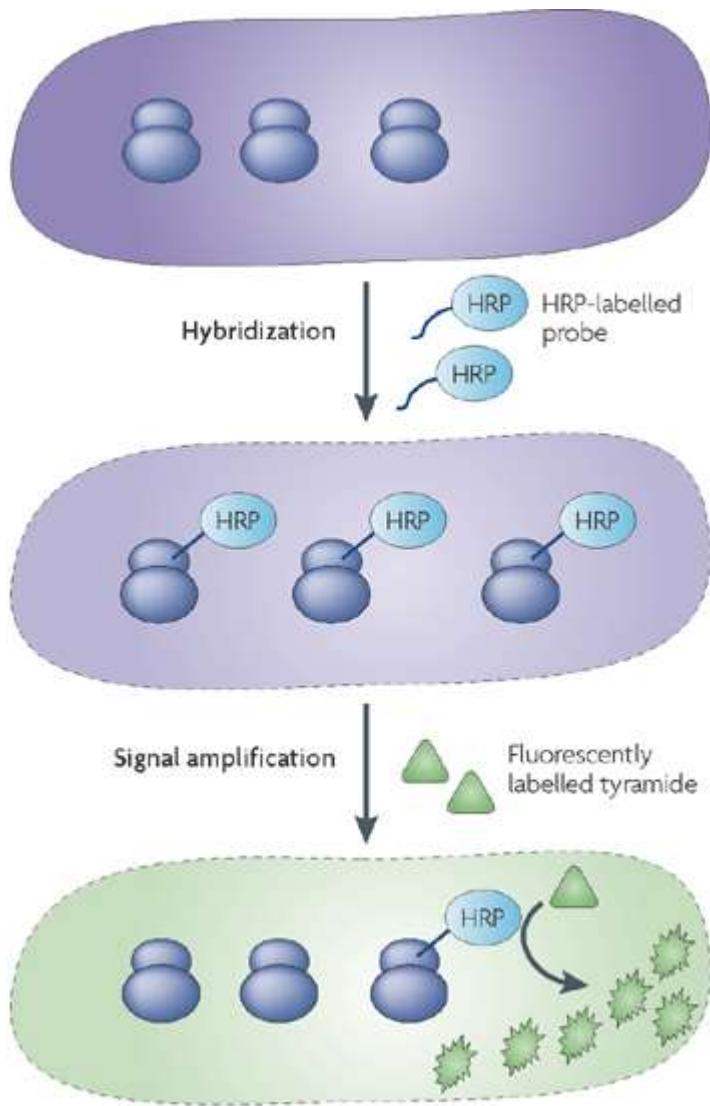
BASICS

Horseradish-peroxidase-labeled FISH probes and catalyzed reporter deposition (CARD) (tyramide signal amplification, TSA)



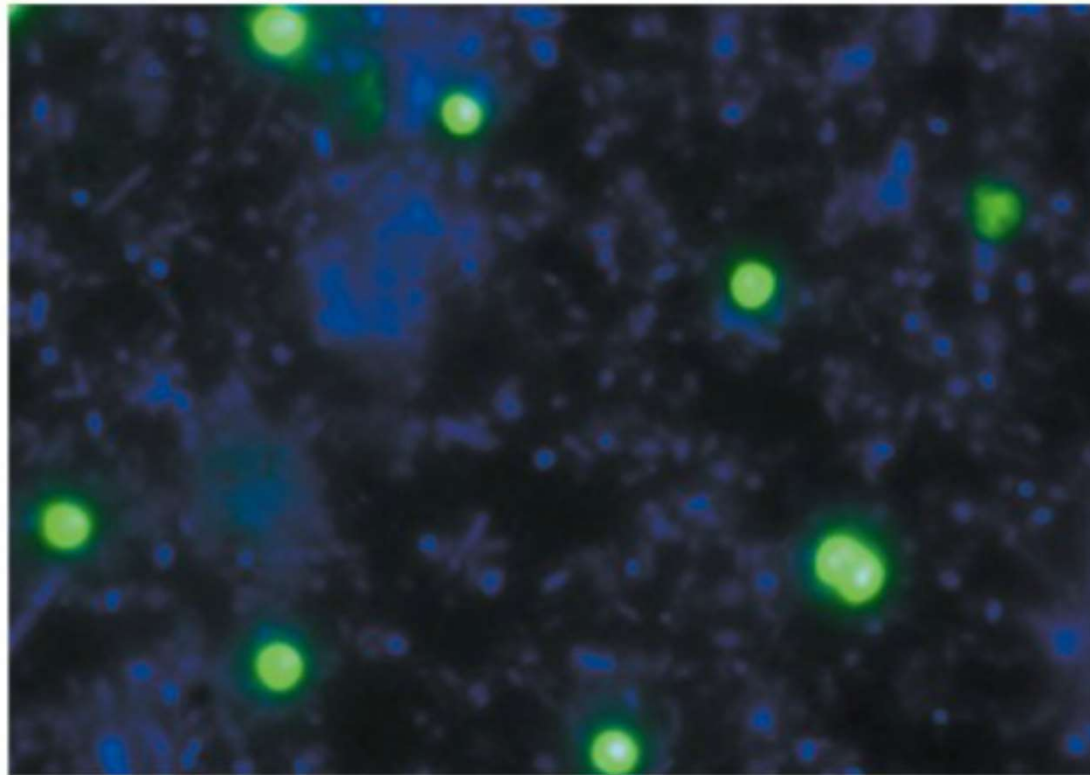
L'attività della **Peroxidase** converte la tiramide in un intermedio molto reattivo che si lega alle proteine adiacenti amplificando il segnale tanto da poter essere visibile al microscopio a fluorescenza.

La HRP è in grado di attivare parecchie molecole di tiramide così è possibile visualizzare anche mRNA espressi a basso numero di copie



Oltre che per rivelare la presenza di un determinato mRNA, la CARD FISH è anche utile per studi filogenetici con procarioti che crescono molto lentamente (acque oceaniche a basse T°C o in limitate condizioni di nutrienti).

Dal momento che in queste cellule si ha un numero di ribosomi molto inferiore rispetto alle cellule che crescono più velocemente, la FISH allestita con tecniche standard può dare segnali molto deboli.



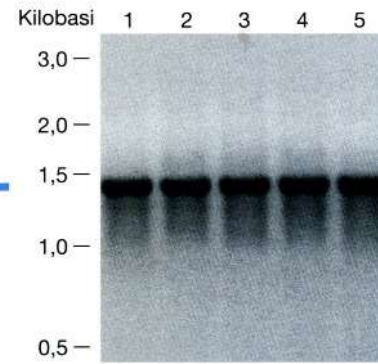
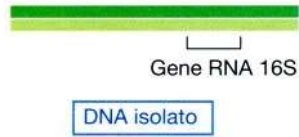
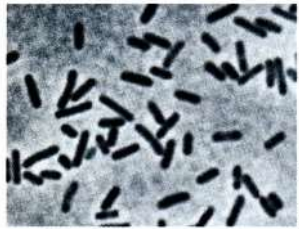
Michael Wagner e Marc Musrman

Figura 18.12 Procedura CARD-FISH per l'identificazione di *Archaea*. In confronto alle cellule colorate con DAPI (blu), le cellule di *Archaea* mostrano un'intensa fluorescenza verde.

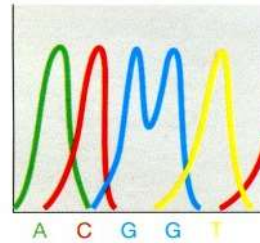
Metodiche filogenetiche basata su RNA 16 S

Il sequenziamento dei geni codificanti la subunità minore dell'RNA ribosomiale è utilizzato per diverse applicazioni:

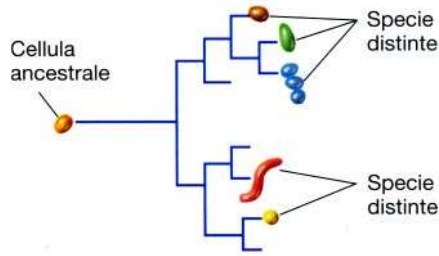
- Produzione di sonde a RNA utili nel campo della microbiologia ambientale e medicina diagnostica (vedi FISH)
- DNA fingerprint o Ribotyping (ribotipizzazione)



Corsa su gel di agarosio; controllo delle dimensioni



Sequenziamento



Allineamento delle sequenze; costruzione dell'albero filogenetico

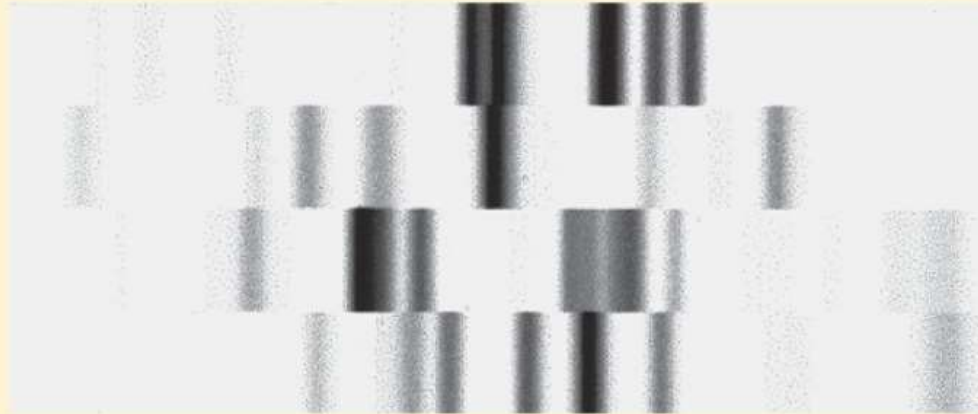
RIBOTYPING

Tecnica che a differenza de sequenziamento prevede l'analisi del pattern di restrizione dei geni per gli rRNA ribosomiali.

Le differenze nelle sequenze degli RNA ribosomiali si traducono nella presenza o assenza di specifici siti di taglio degli enzimi di restrizione

Ribotyping di 4 diversi batteri lattici

*Lactococcus
lactis*
*Lactobacillus
acidophilus*
*Lactobacillus
brevis*
*Lactobacillus
kefir*



Carl A. Batt

- Il pattern di restrizione delle regioni di DNA contenenti i geni per rRNA 16 S, viene rivelato in seguito ad ibridazione con una sonda specifica per gli rRNA 16 S marcata, ed è esclusivo di una specie o può addirittura riconoscere alcuni ceppi all'interno di una specie.
- Sono importanti sia le variazioni nella posizione che nell'intensità delle bande.

RFLP in seguito a PCR per la regione rRNA 16S

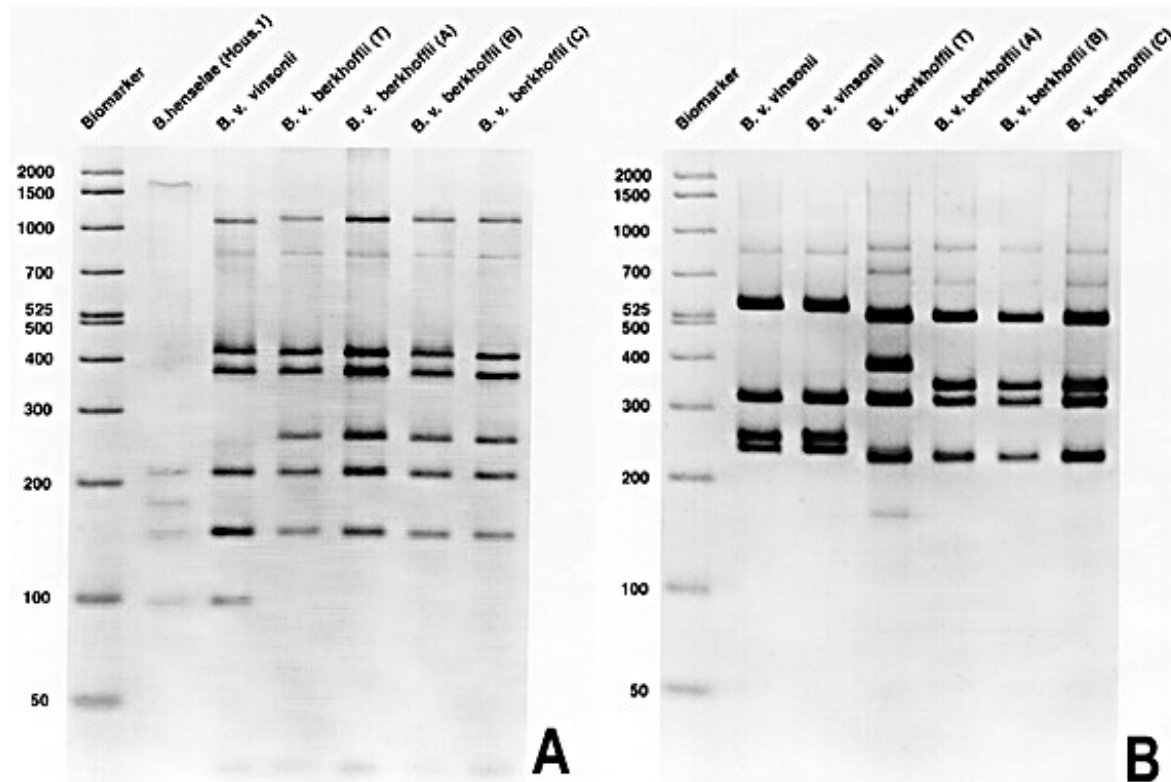


Figure. A. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis of the 16S rRNA gene of *E. vinsonii* subsp. *berkhoffii* isolates using *Dde* I demonstrating differentiation between subspecies of *E. vinsonii*. B. PCR-RFLP analysis of the 16S-23S intergenic spacer region of *E. vinsonii* subsp. *berkhoffii* isolates using *Hae* III. Strain differences were detected between *E. vinsonii* subsp. *berkhoffii* (T), which was the type strain cultured from a dog with endocarditis, and isolates A (described in this report), B, and C from subclinically infected dogs.

Il modello del ribotyping è molto specifico perché ad ogni microrganismo è associato uno specifico pattern di bande di restrizione definito anche Molecular Fingerprint (impronta digitale molecolare)

Vantaggi

- è un metodo rapido (non richiede sequenziamento)
- è molto specifico
- Ampiamente utilizzato sia in diagnostica clinica che nell'analisi batteriologica delle acque, alimenti etc

Svantaggi

- l'analisi è incentrata su un singolo gene

La tecnica del ribotyping si può applicare ad altri geni che vengono utilizzati come marcatori evolutivi, per esempio il gene *gyrB* che codifica per la girasi.

La tecnica si chiama RLFP

Anche in questo caso si amplifica il gene di interesse e il frammento ottenuto viene sottoposto a digestione enzimatica con enzimi di restrizione che tagliano frequentemente

RFLP Restriction Fragment Length Polymorphisms

Questa tecnica permette di osservare le variazioni tra diversi microrganismi analizzando

- Il numero
- le dimensioni dei frammenti prodotti digerendo il DNA con vari enzimi di restrizione

Tecnica originale:

- analisi del pattern di restrizione totale (frammenti piccoli e grandi)
- analisi del pattern di ibridizzazione del DNA genomico ibridizzato con un frammento specifico di DNA per individuare i polimorfismi in una determinata regione.

Con questa tecnica possono venir amplificati diversi geni

Geni per RNA 16 S (ribotyping)

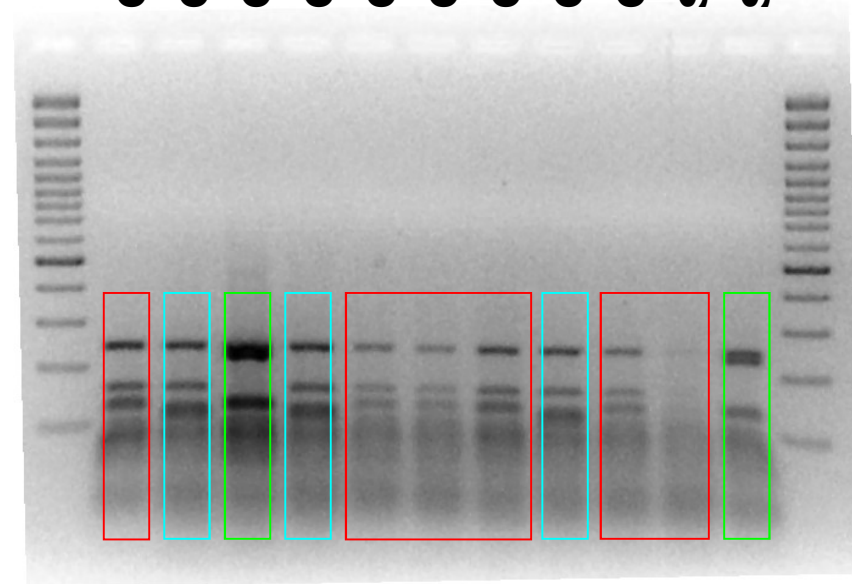
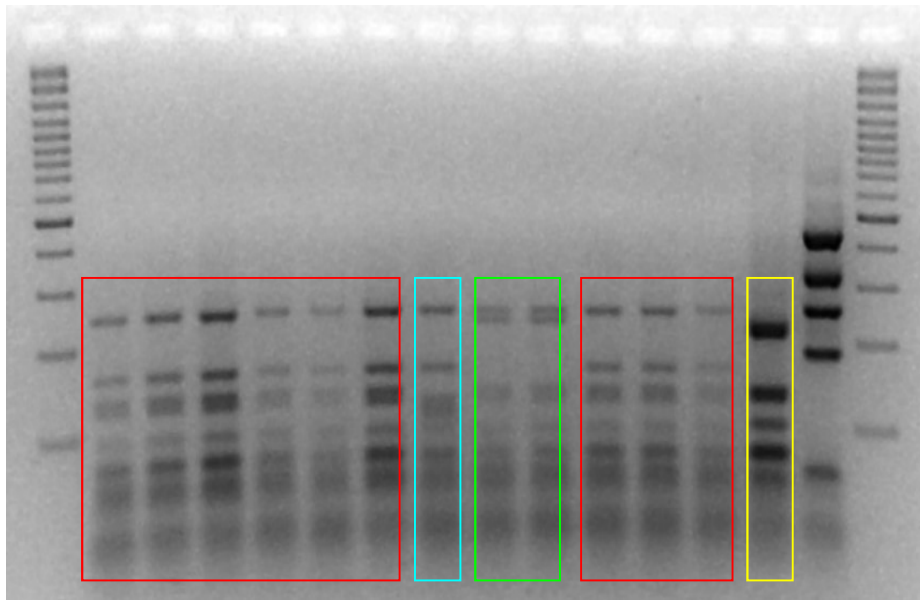
Geni che sono conservati tra le diverse specie (*gyrA/B* , *recA*)

Se viene effettuato per PCR l'amplificazione di un determinato gene poi questo verrà digerito con un enzima di restrizione che digerisce molto frequentemente (in genere quelli che riconoscono 4 bp). Si vengono a generare una serie di frammenti di DNA il cui numero dipende dai siti di restrizione presenti nella regione amplificata.

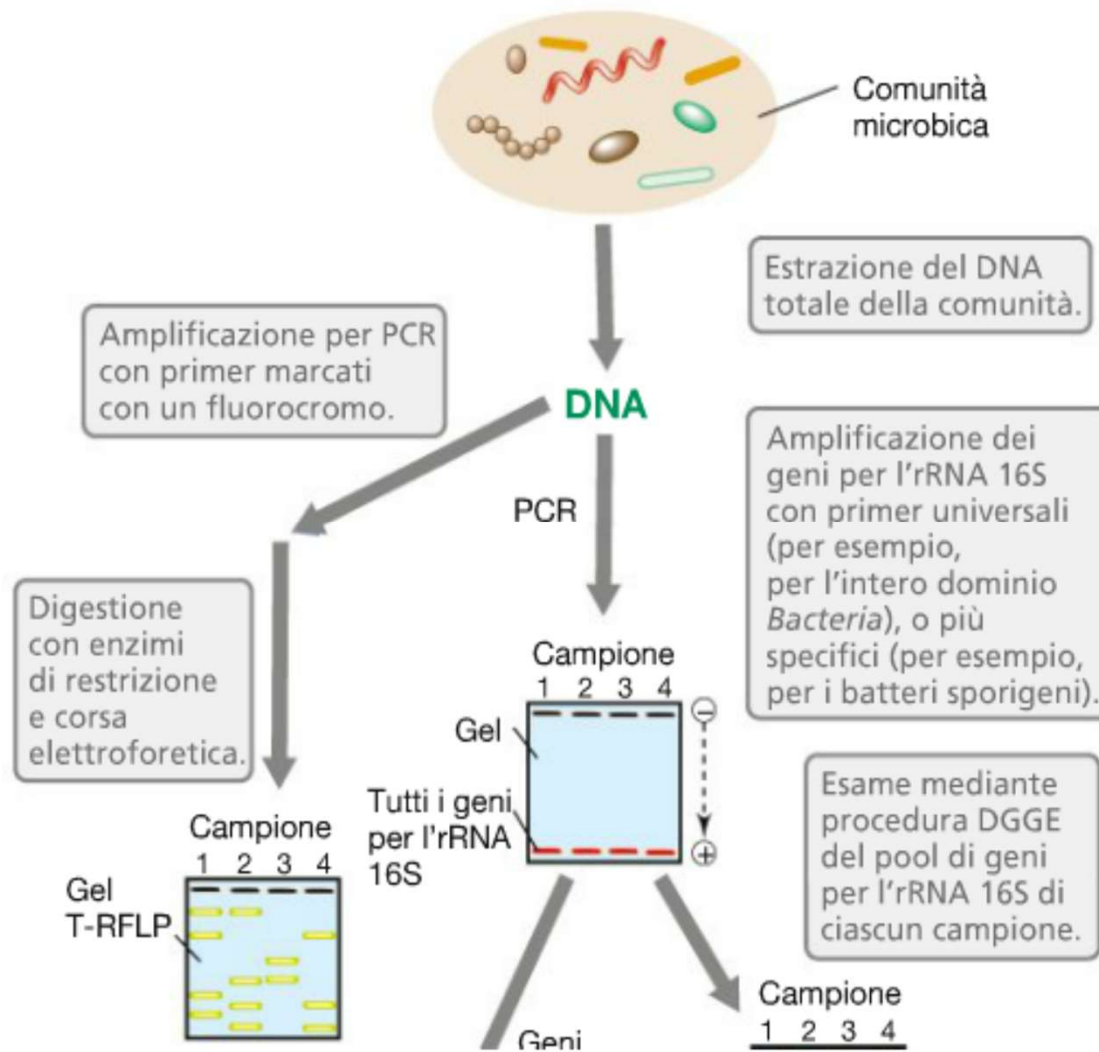
gyrB RFLP (HaeIII)

OBGTC
 OBGTC 9
 OBGTC
 OBGTC
 OBGTC
 K279
 OBGTC
 OBGTC 24
 OBGTC 26
 OBGTC 28
 OBGTC 29
 OBGTC
 LMG959
 MG1655

OBGTC
 OBGTC 13
 OBGTC
 OBGTC 30
 OBGTC
 OBGTC
 OBGTC 38
 OBGTC 42
 OBGTC 44
 STM 2
 STM 3



Group A 14 OBG strains, K279-	Group B 4 OBG strains	Group C 4 OBG strains	Group D LMG 959
---	------------------------------------	------------------------------------	---------------------------



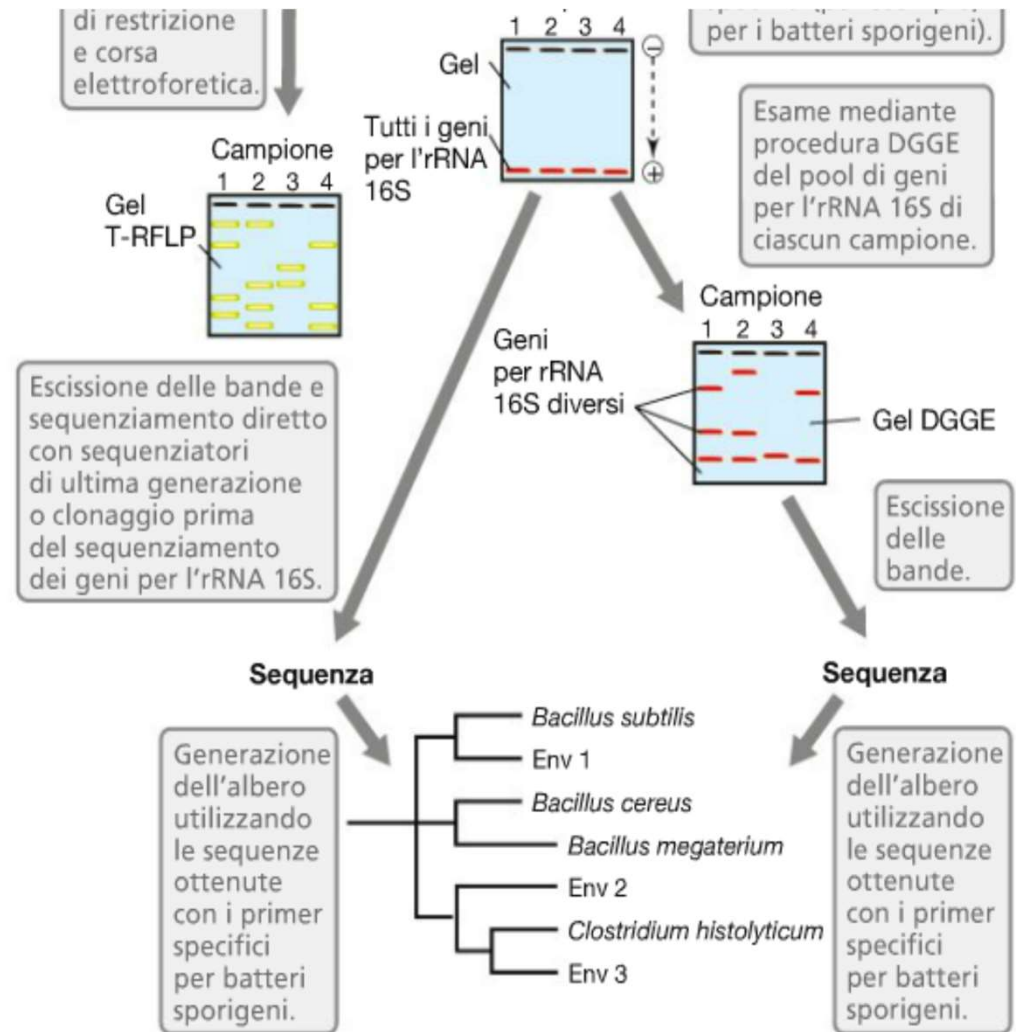
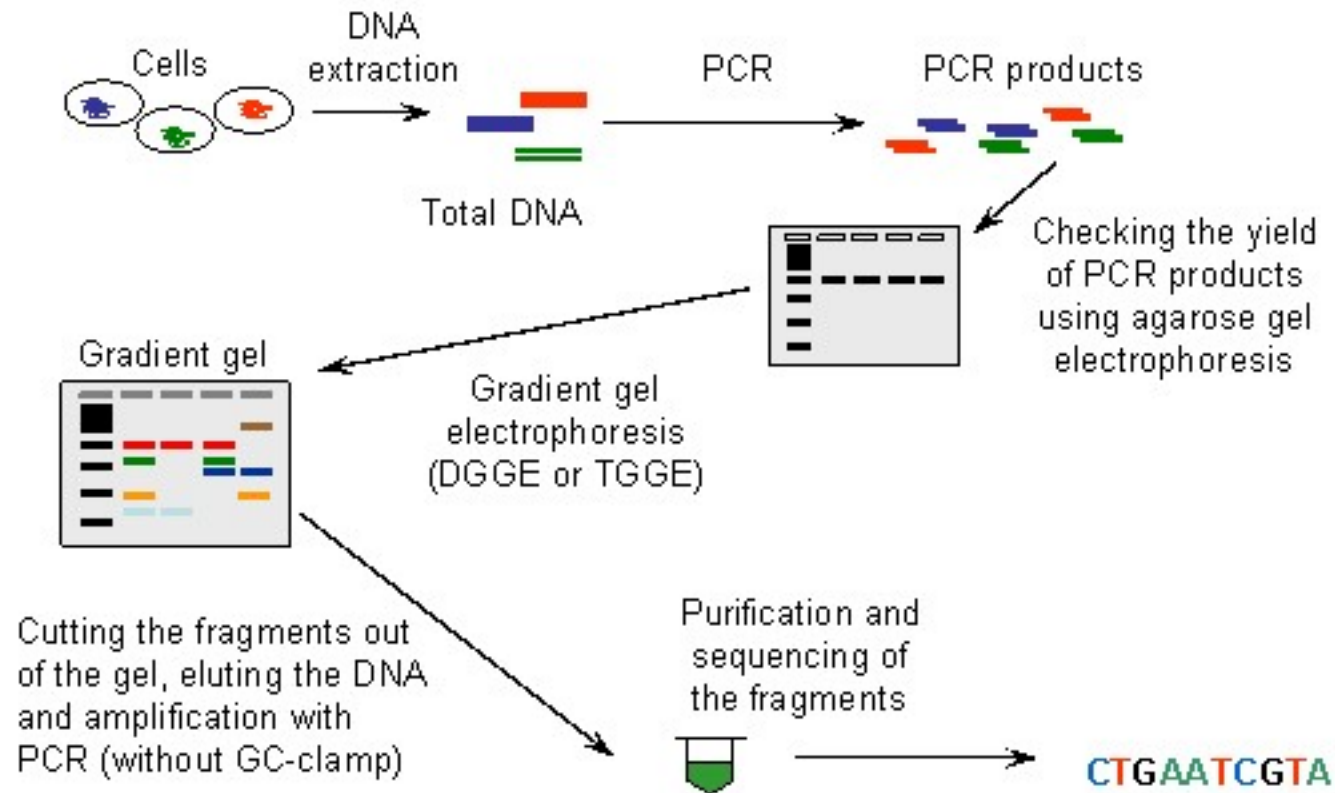


Figura 18.13 Passaggi necessari per analizzare la biodiversità rispetto a un singolo gene all'interno di una comunità microbica utilizzando un approccio filogenetico. Partendo dal DNA totale di una comunità microbica, si procede ad amplificare mediante PCR i geni che codificano per l'rRNA 16S. Nell'esempio di procedura DGGE rappresentato in figura, sono impiegati primer che riconoscono solo il DNA dei *Firmicutes*, un gruppo di batteri gram-positivi che includono i generi sporigeni *Bacillus* e *Clostridium*. Le diverse bande ottenute tramite PCR vengono tagliate dal gel e i diversi geni codificanti per l'rRNA 16S sono separati mediante clonaggio o procedura DGGE. Dopo aver determinato la sequenza nucleotidica, è possibile costruire un albero filogenetico. "Env" indica una sequenza di DNA ambientale (filotipo). Nell'analisi T-RFLP, il numero di bande indica il numero di filotipi.

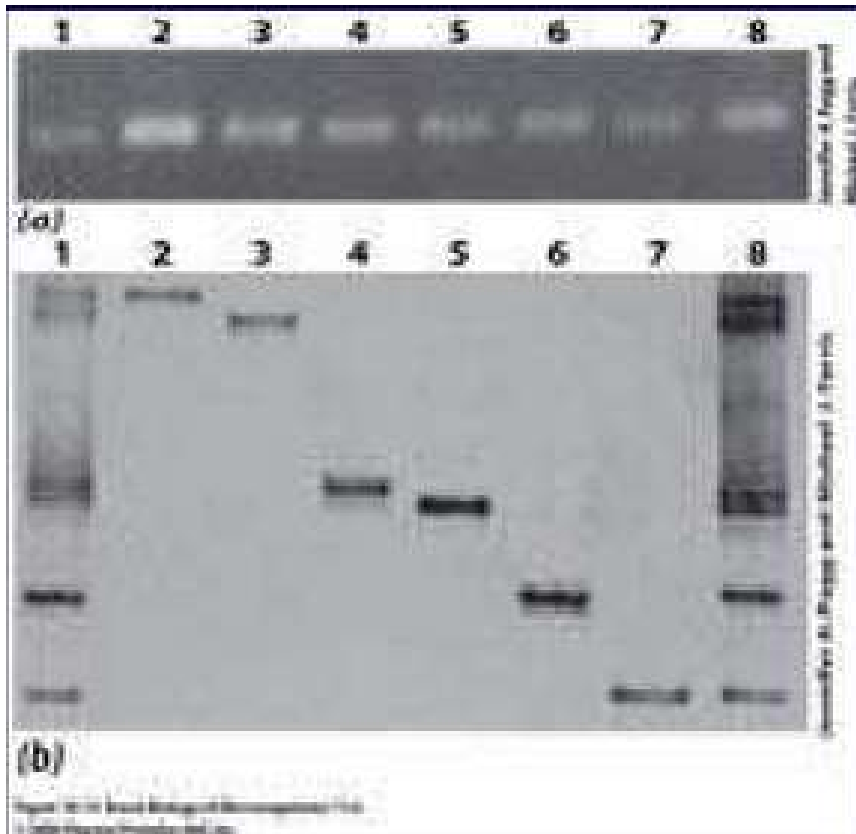
Analisi delle varianti di un gene filotipi : DGGE

DGGE è una tecnica elettroforetica che permette di separare geni delle stesse dimensioni ma che differiscono nei loro profili di denaturazione a causa delle differenze nella sequenza delle basi

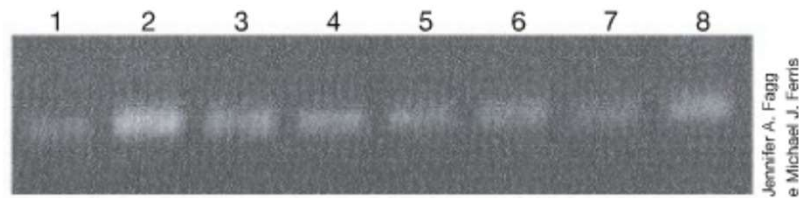


Nella DGGE si utilizza un gel che contiene un gradiente di agenti denaturanti quali urea e formamide in grado di denaturare il DNA. Quando i frammenti raggiungono una concentrazione di agenti denaturanti idonea alla loro denaturazione la migrazione si blocca.

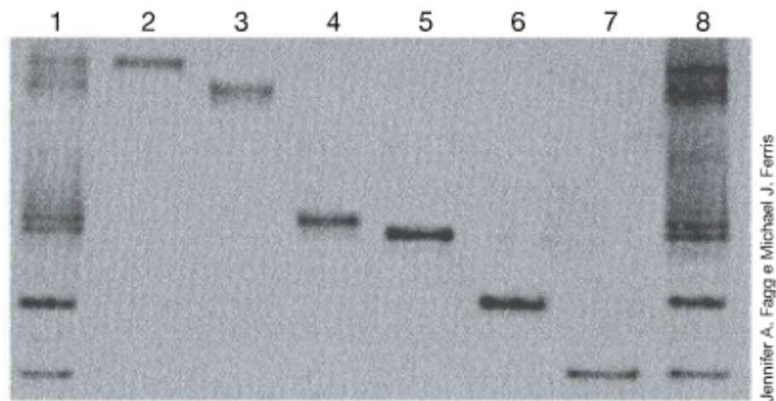
Frammenti che differiscono anche solo per alcune basi hanno una sensibilità diversa agli agenti denaturanti presenti nel gel.



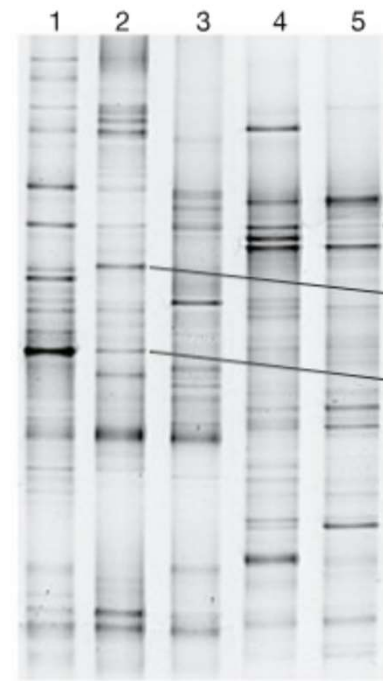
Se si utilizza il gene per RNA 16 S si può avere una stima immediata del numero di filotipi (ovvero numero di diversi geni per 16S) stabilendo per esempio in un determinato campione quante specie ci siano. Se si utilizzano geni diversi da quelli per rRNA 16S per esempio un gene coinvolto nel metabolismo o nella sintesi di un fattore di virulenza si ha subito la stima di quale sia quel fattore , a chi sia correlato o di quale variabilità metabolica sia presente



(a) Amplificazione mediante PCR



(b) DGGE



(c) DGGE relativa a impianti di trattamento delle acque reflue

Questo filotipo sembra essere universale.

Questo filotipo è presente solo nell'impianto di trattamento 2.

Questo filotipo è presente in entrambi gli impianti di trattamento 1 e 2.

Figura 18.14 Gel di elettroforesi ottenuti mediante PCR e DGGE. Il DNA totale di una comunità microbica viene isolato e amplificato mediante PCR, utilizzando primer per i geni dell'rRNA 16S dei *Bacteria* (a; corsie 1 e 8). I prodotti di PCR appaiono come bande disposte alla medesima altezza sul gel elettroforetico. Sei di queste bande (b; corsie 2-7), che verranno

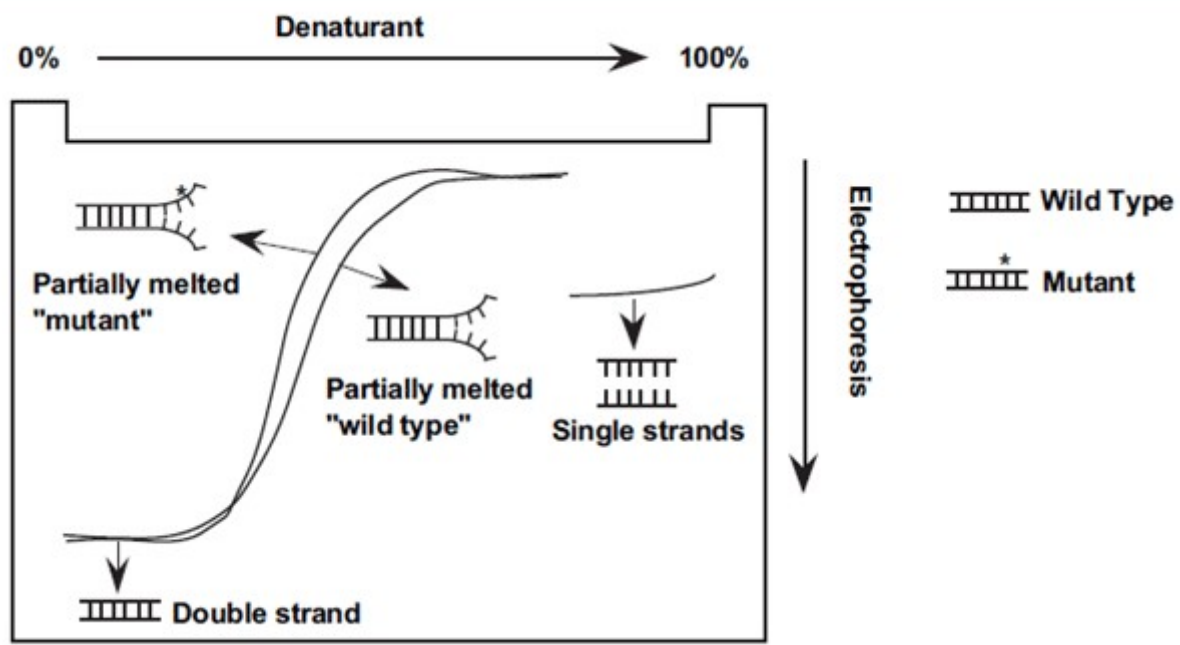
successivamente risolte tramite DGGE, sono poi tagliate e di nuovo amplificate, ciascuna risultando in una singola banda nella medesima posizione precedentemente assunta sul gel di PCR (a; corsie 2-7). Nell'analisi elettroforetica eseguita dopo la PCR (a), tutte le bande si posizionano alla stessa altezza perché presentano la stessa dimensione, mentre in gel

con gradiente denaturante (b) si posizionano in punti diversi in ragione della reciproca diversità di sequenza in ragione della reciproca diversità di sequenza. (c) Profili DGGE di comunità microbiche in campioni provenienti da differenti impianti di trattamento delle acque reflue, amplificate mediante primer per i geni dell'rRNA 16S dei *Bacteria*.

Sia DGGE che RFLT stimano la diversità di un singolo gene bersaglio ma in modi diversi

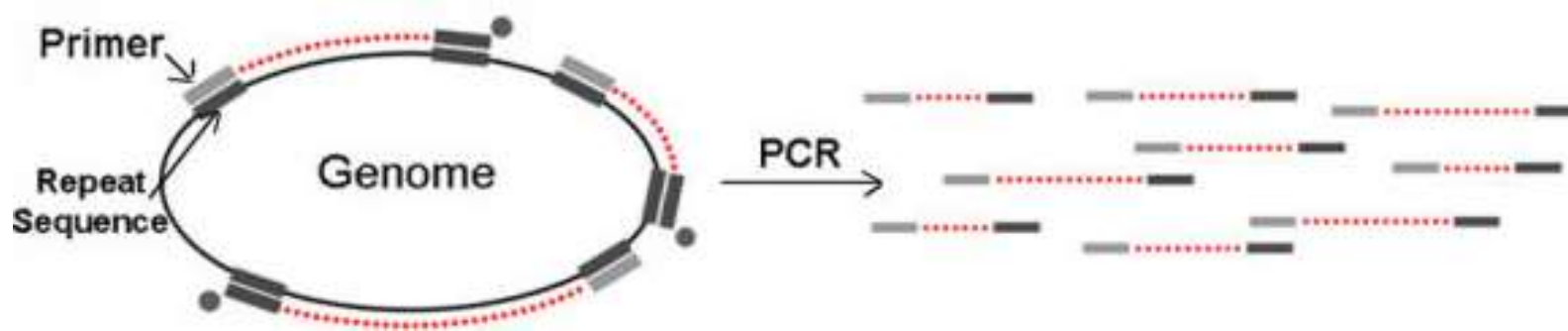
Lo schema delle bande che si ottiene con il DGGE riflette il numero delle varianti di sequenza di un gene sfruttando frammenti della stessa lunghezza, mentre con RFLT si hanno frammenti diversi che migrano su un gel normale (non denaturante) ottenuti dopo digestione.

In entrambi i casi si ottengono delle stime abbastanza precise sulla diversità all'interno di una popolazione di un determinato gene.

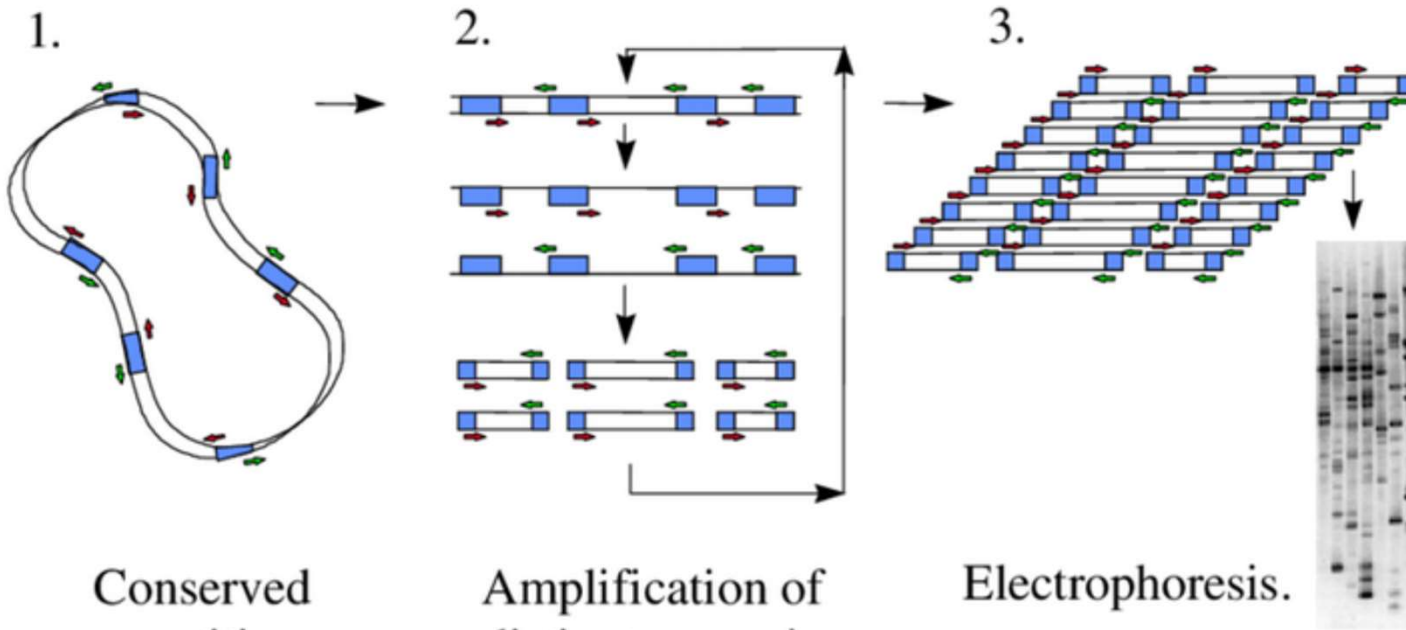


Metodi di DNA profiling .

Rep-PCR Amplificazione di sequenze ripetute (rep-PCR repetitive extragenic palindromic PCR)



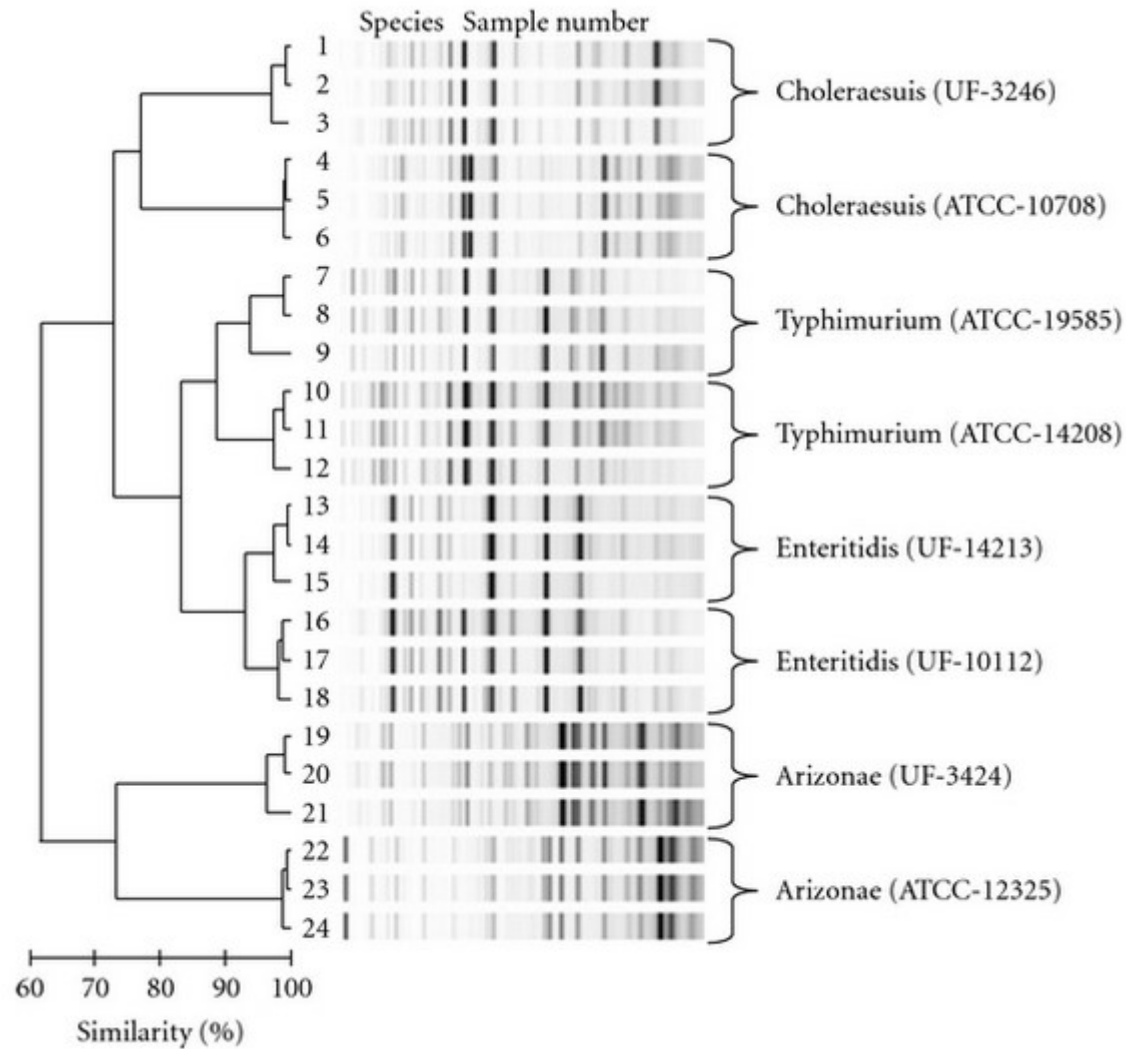
Si basa sulla presenza di regioni di DNA ripetitivo altamente conservato e interdisperse in modo casuale nel genoma di un batterio .Il numero e la posizione di queste regioni varia all'interno di ceppi che mostrano differenze a livello genomico. I primers si ritrovano all'interno delle regioni e si vengono a generare quindi una serie di frammenti che avranno per ogni ceppo lunghezza e un numero definito



Conserved repetitive elements dispersed through most bacterial genomes.

Amplification of distinct genomic regions employing primers designed to anneal to natural occurring repetitive BOX, ERIC and REP elements.

Electrophoresis.

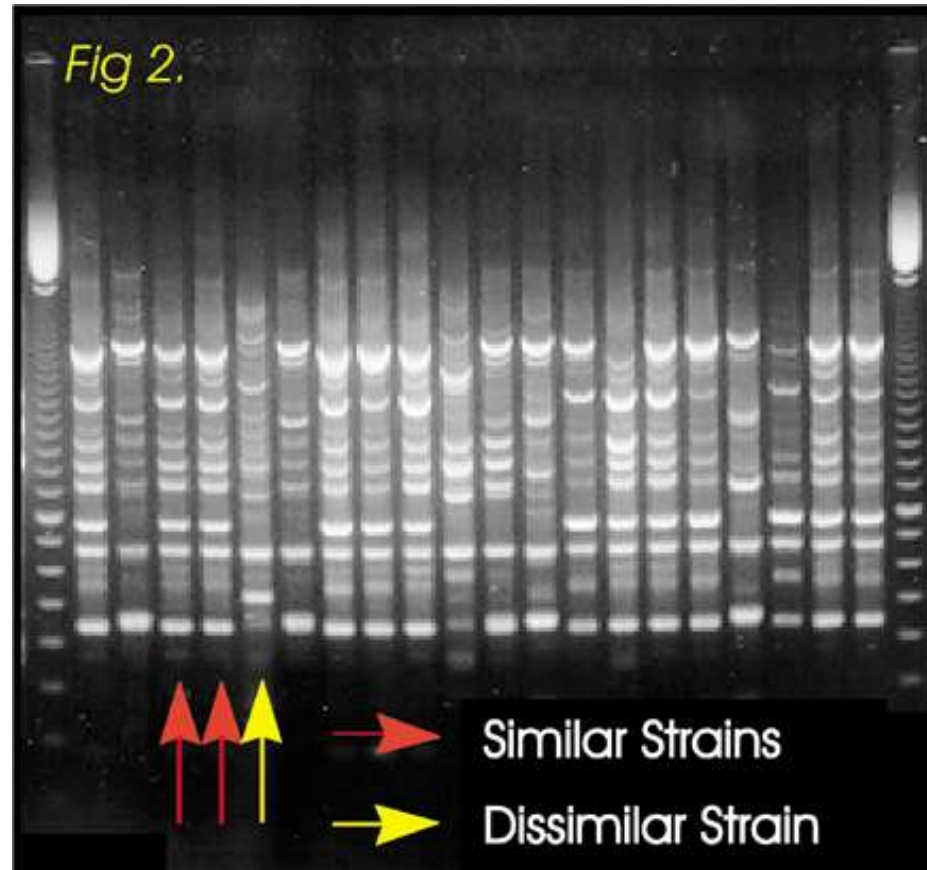


Analisi di diversi ceppi di Salmonella di collezione per capirne le differenze

RAPD Randomly Amplified Polymorphic DNA analysis

Metodo basato sulla tecnica di PCR che consente di analizzare le differenze tra microrganismi senza conoscerne la sequenza.

Utilizzando un piccolo nucleotide si generano una serie di diversi frammenti per ogni microrganismo oppure primer in sequenze ripetute.



PULSE FIELD GEL ELECTROPHORESIS

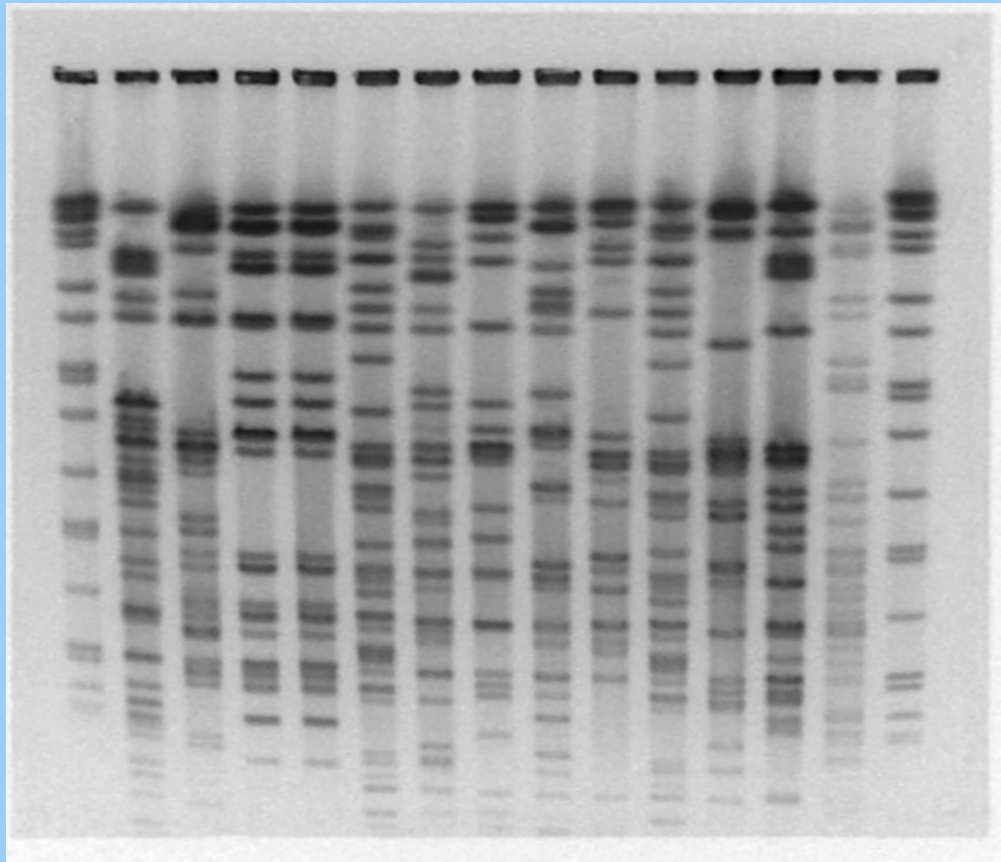
Il metodo consiste in una elettroforesi su gel di agarosio nella quale due campi elettrici con differenti angolazioni vengono applicati alternativamente per periodi di tempo definiti (ad esempio 60s).

L'azione del primo campo elettrico induce il movimento dei frammenti di DNA lungo la direzione del campo. L'interruzione di questo campo e l'applicazione del secondo fa sì che le molecole si muovano nella nuova direzione.

Dal momento che per una molecola a catena lunga lineare esiste una relazione tra il cambiamento conformazionale indotto da un campo elettrico e la lunghezza della molecola stessa, le molecole più piccole si riallineeranno più velocemente nel nuovo campo elettrico di quelle più grandi.

In questo modo si separano non solo le molecole più piccole da quelle più grandi ma, grazie ai differenti tempi di re-orientamento propri di frammenti più grandi, anche molecole di grandi dimensioni tra di loro.

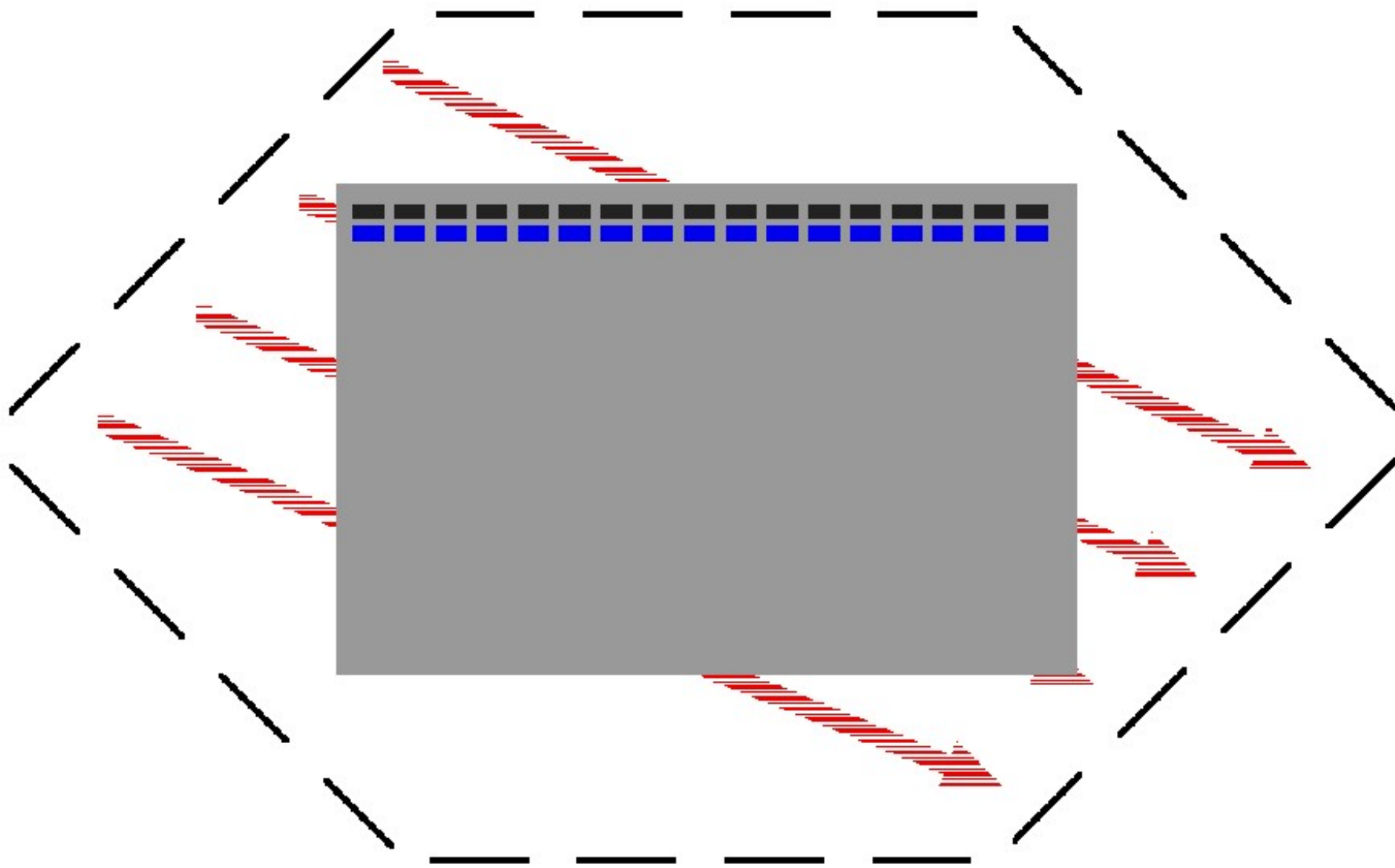
S. braenderup
OBGTC 3
OBGTC 5
OBGTC 9
OBGTC 10
OBGTC 13
OBGTC 16
OBGTC 19
OBGTC 20
OBGTC 22
OBGTC 23
OBGTC 24
OBGTC 26
OBGTC 28
S. braenderup

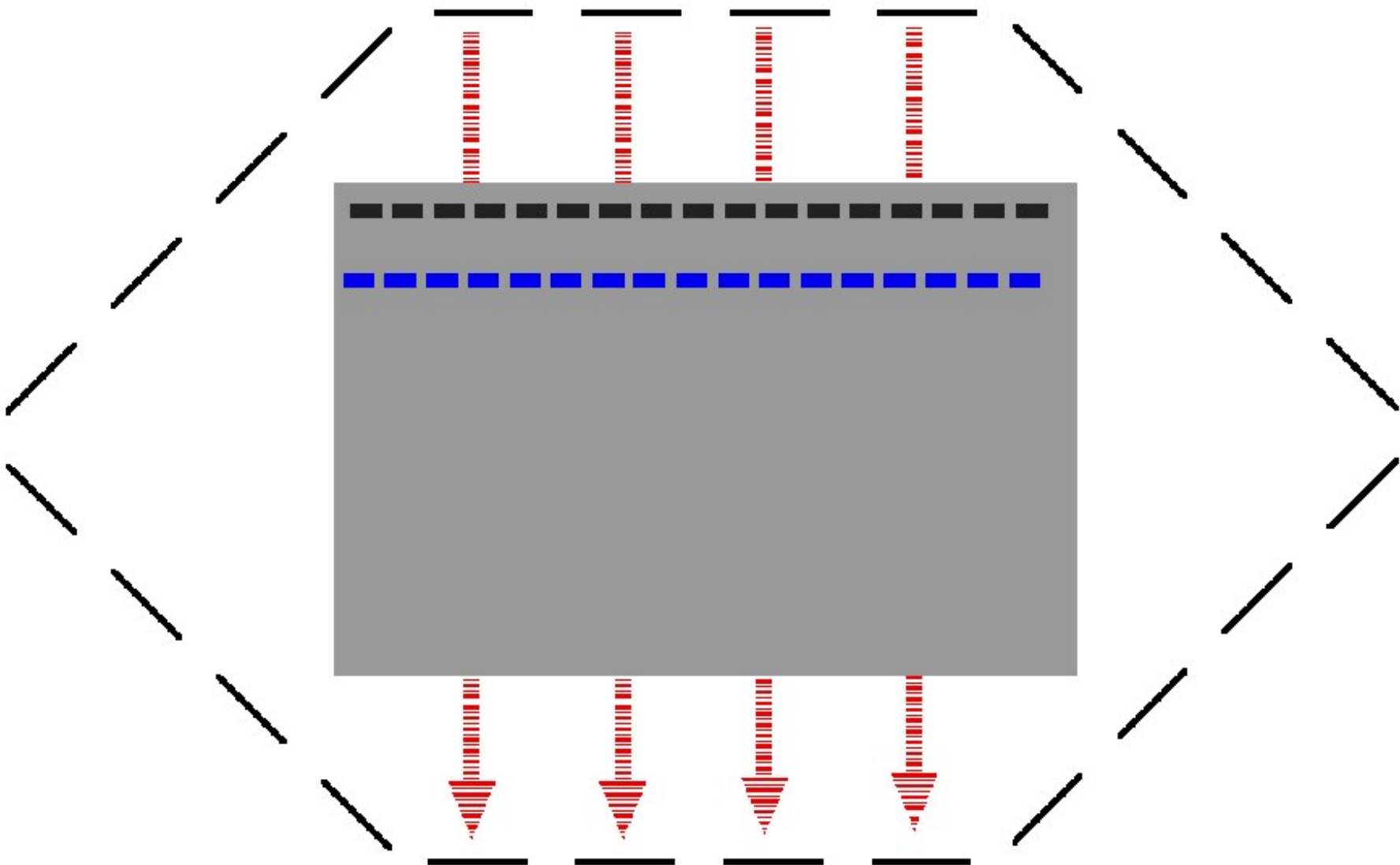


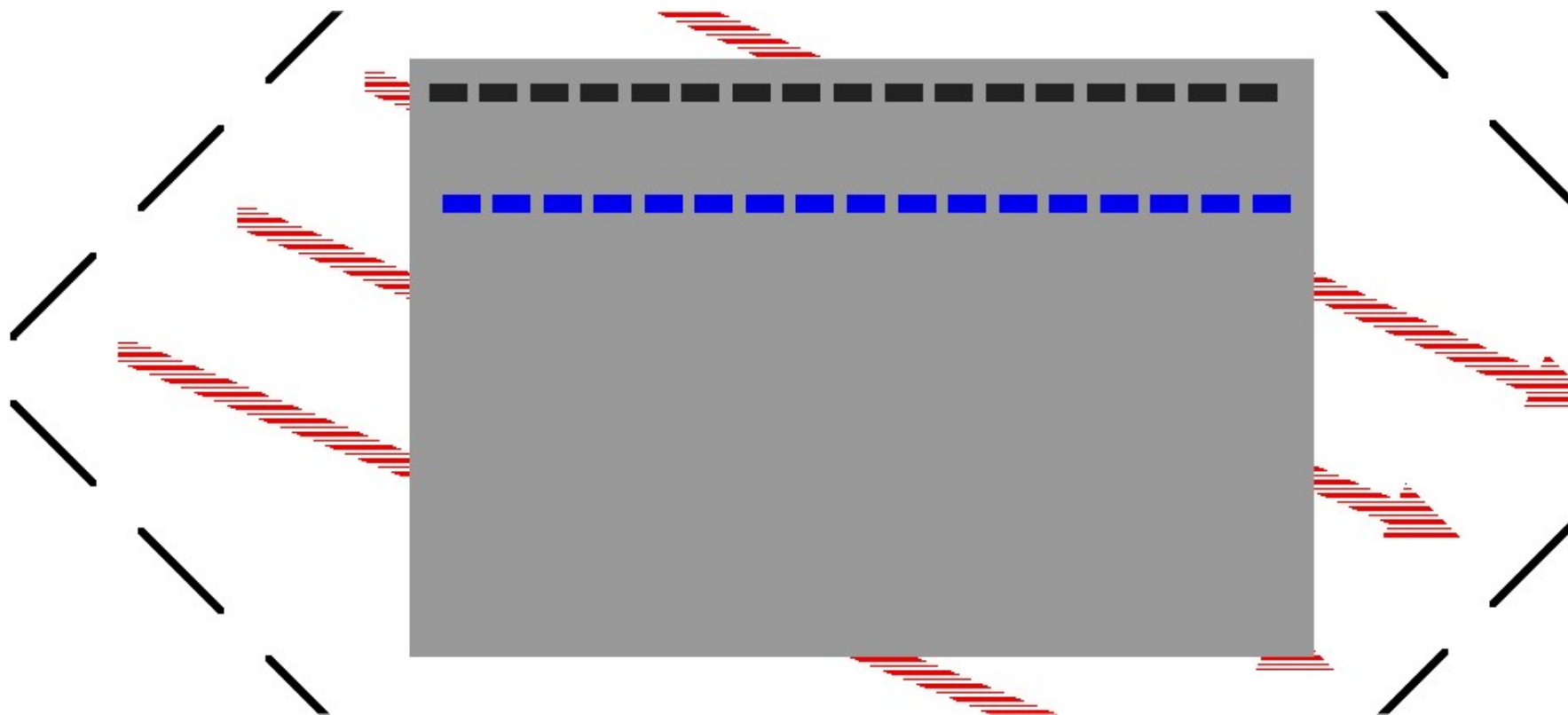
PFGE

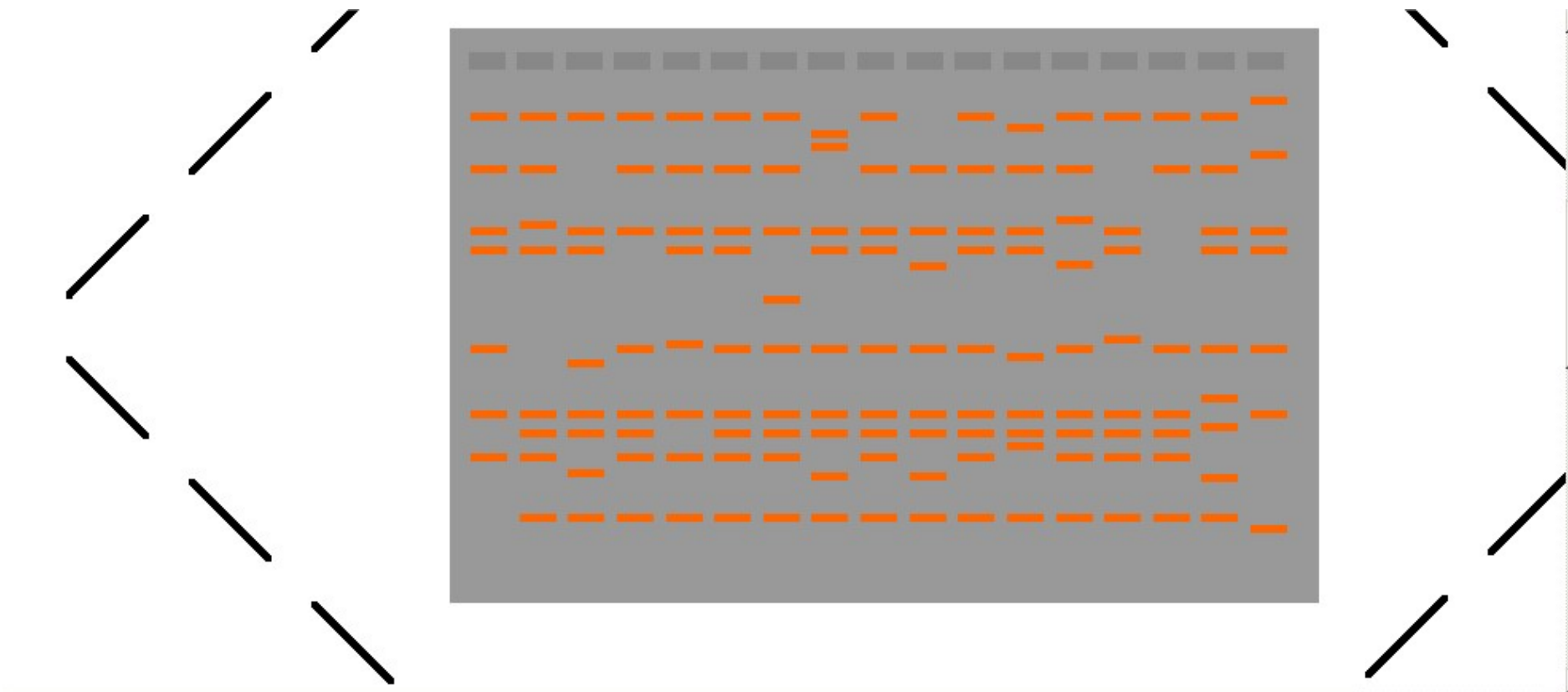
DNA totale dei
ceppi in esame
digerito per XbaI

Genomic DNA macrorestriction profiles of *S. maltophilia* produced by PFGE

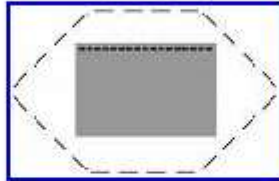








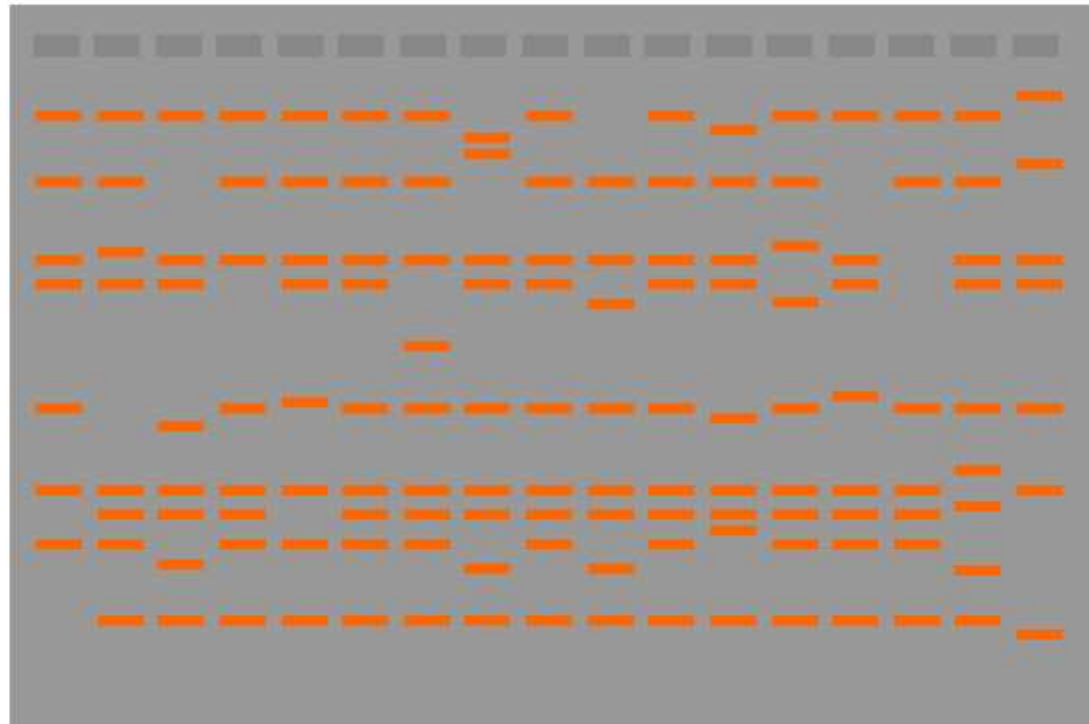
Google™



[Guarda l'immagine nelle sue dimensioni reali.](#)
www.bio.davidson.edu/.../PFGE_animated.gif
1041 x 662 - 340k
L'immagine può essere ridotta ed è protetta da copyright.

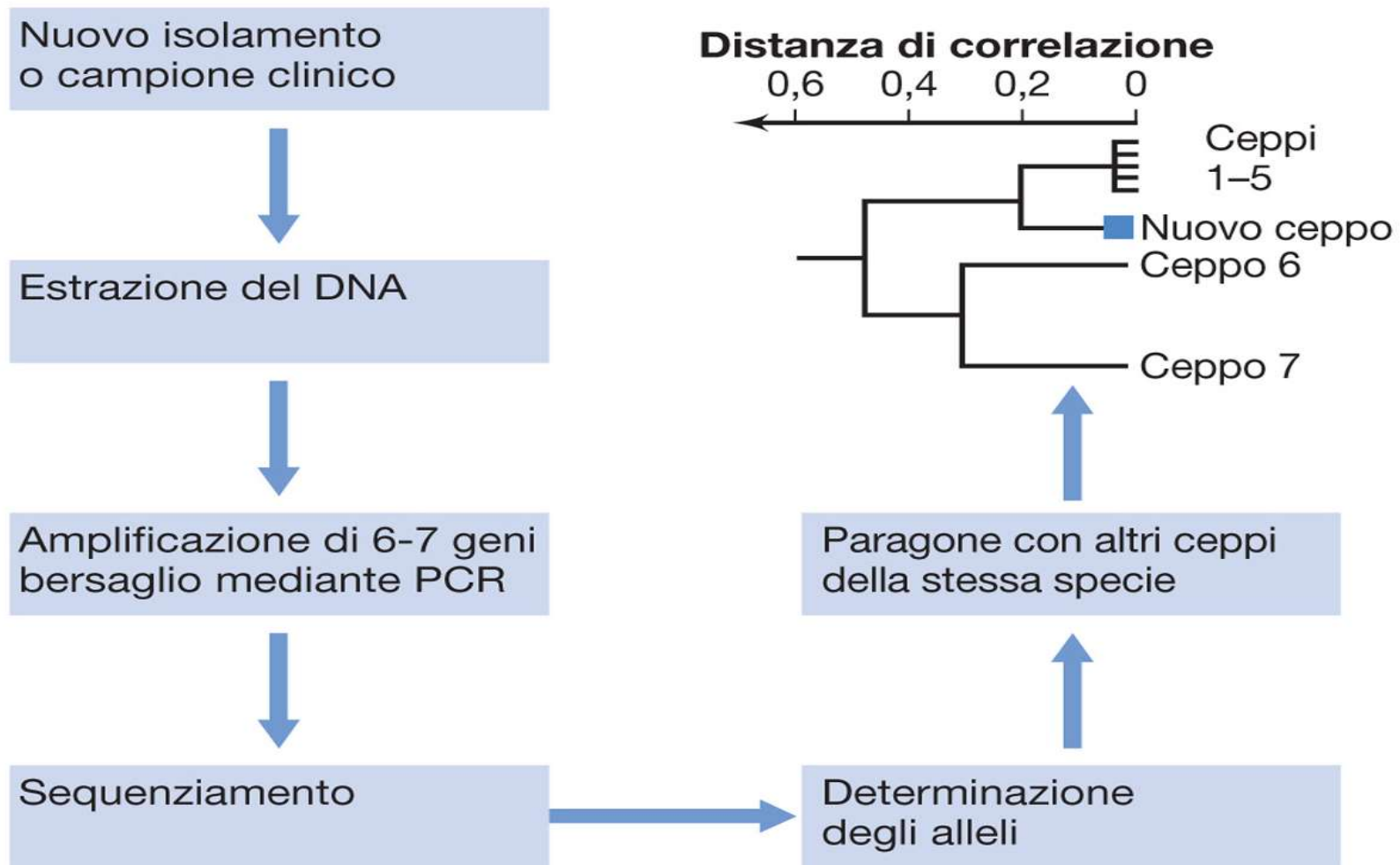
[Rimuovi corni](#)
[Risultati immagi](#)

sotto c'è l'immagine nel suo **contesto originale** nella pagina: www.bio.davidson.edu/.../method/pulse_field.html



MLST Multilocus sequence typing

- Potente tecnica per caratterizzare ceppi all'interno di una stessa specie
- comporta la caratterizzazione di 6-7 geni housekeeping (codificanti funzioni di base della cellula) e il paragone con i geni corrispondenti di diversi ceppi dello stessa specie
-
- si procede per amplificazione PCR e sequenziamento di una regione di circa 450 bp all'interno del gene housekeeping scelti
- ceppi con sequenze identiche per un dato gene posseggono lo stesso allele per quel gene
- all'interno di una stessa specie possono esistere circa 30 varianti per un dato gene
- Ad ogni ceppo sulla base dei vari alleli nei 6-7 geni housekeeping verranno attribuite delle sequenze di numeri



Le relazioni tra due tipi di ogni sequenza vengono poi espresse in un dendrogramma che esprime la distanza di correlazione che varia da 0 (i ceppi sono identici) a 1 (i ceppi sono lontanamente correlati).

MLST è ampiamente utilizzata in microbiologia clinica per il differenziamento di ceppi di un particolare patogeno. Permette l'identificazione di un microrganismo senza la necessità di isolamento

Particolarmente utile

- per l'identificazione di ceppi patogeni in quelle specie che possiedono ceppi patogeni e non patogeni .
- per studi epidemiologici in quanto nel caso di batteri patogeni si può rintracciare una variante ceppo particolarmente virulenta e seguirne il movimento all'interno di una popolazione
- per capire se un'infezione ha un'origine clonale o policlonale

MLST : vantaggi e svantaggi

Vantaggi

Il potere di risoluzione è estremamente elevato in un'analisi con 7 geni e circa 20 alleli tramite MLST è possibile individuare diversi miliardi di genotipi distinti.

Limitazioni

Non è utile per paragonare i microrganismi oltre il livello di specie

Ma tutti i microrganismi mostrano un medesimo livello di variabilità per MLST?

Alcuni procarioti costituiscono essenzialmente un clone con variabilità molto limitata (p.e. *Staphylococcus aureus*)

Altri mostrano una grande variabilità e quindi sono debolmente clonali (p.e. *Neisseria meningitis*)

N.meningitis potrebbe quindi aver subito un flusso di trasferimento genico orizzontale molto più rilevante rispetto a *S. aureus*.

L'analisi della variabilità di un determinato microrganismo è un concetto estremamente importante per lo sviluppo di farmaci e l'allestimento di vaccini diretti contro particolari patogeni (Concetto di PANGENOMICA)

[DATA ANALYSIS](#)

[DATABASES](#)

[SUBMISSIONS](#)

[NEWS](#)

[LINKS](#)

To insure against duplication of effort in the development of MLST schemes we will be listing details of organisms which are currently being looked at or have been published.

We encourage people to let us know of other organisms so duplication of effort can be avoided.

The following schemes are very close to completion and will be released at mlst.net shortly -

- ▣ *Propionibacterium acnes* Contact Simon O'Hanlon - [Click here](#)
- ▣ *Pasteurella multocida*. Contact Sounthi Subaaharan - [Click here](#)
- ▣ *Xylella fastidiosa*. Contact Mark Scally -
- ▣ *Leptospira interrogans* Contact Janjira Thaipadungpanit - [Click here](#)
- ▣ *Chlamydia trachomatis* Contact Anyou Wang

The following schemes are in progress -

MLST Databases at the MPI für Infektionsbiologie

[Back](#) | [MPI MLST Home](#) | [Allele / ST Query](#) | [Strain Query](#) | [Downloads](#) | [Analyses](#) | [Info](#) | [Login](#)

Escherichia coli MLST Database.

<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

Sequence:

[Get Info](#)

Gene Fragment:

▼



You are not logged in!

Website and databases managed by [Mark Achtman](#).
Designed by [Christian Tismer](#) and [Ingo Schürmann](#)

This server is hosted at the [MPI für Infektionsbiologie](#).
Initial development funded by the EU (QLK2-CT-2000-0153) and DOE, U.S.A. (DEFG0301ER63147).

DATA ANALYSIS

DATABASES

SUBMISSIONS

NEWS

LINKS

**NEW MLST SCHEMES
IN DEVELOPMENT**

Site requirements

***Pasteurella multocoda* - coming soon**

The provisional *P. multocoda* MLST scheme uses internal fragments from 7 housekeeping genes spread around the genome;

The house-keeping genes utilised are as follows :

adk (Adenylate kinase)
est (Esterase)
pmi (Manose-6-Phosphate Isomerase)
zwf (Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase)
mdh (Malate Dehydrogenase)
gdh (Glutamate dehydrogenase)
pgi (Phospho Glucose Isomerase)

For further information please contact [Sounthi Subaaharan](#)

All species MLST databases and published schemes

MLST databases are hosted at the [University of Oxford, UK](#); the [University of Warwick, UK](#), and the [Pasteur Institute, Paris, France](#).

Order by: [Organism](#) | [Profiles](#) | [Isolates](#)

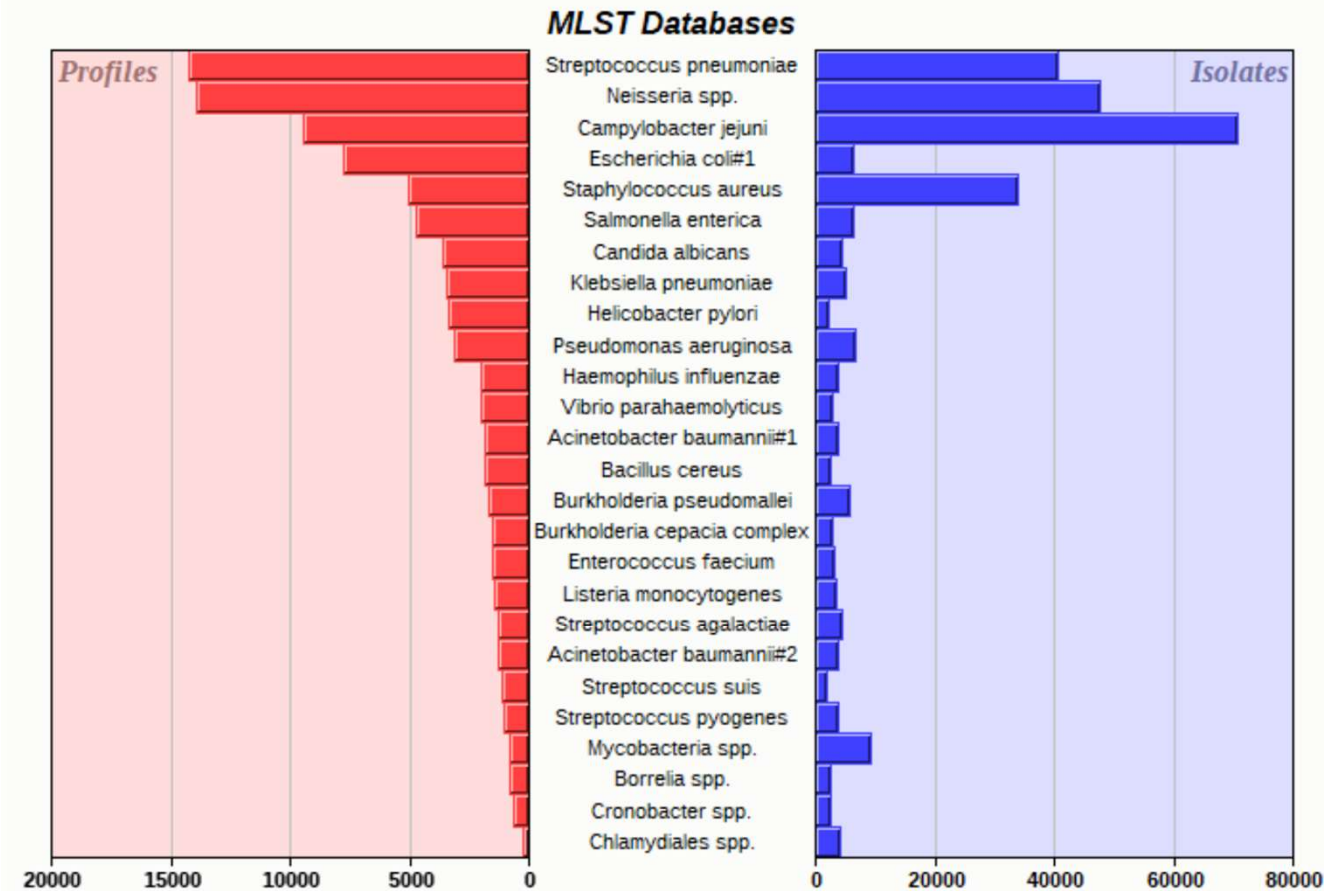


Chart shows databases with at least 1000 profiles or isolates.

* Data updated automatically: 2018-10-24.

Enterobase

Escherichia/Shigella

Allele / ST Query | Strain Query | Downloads | Info | History

Escherichia coli MLST Database

adk lumC gyrB icd mdh purA recA

Sequence:

Get Info

Gene Fragment:

adk

Per l'identificazione di Escherichia coli

1. *adk*
2. *hemC*
3. *gyrB*
4. *icd*
5. *mdh*
6. *pur*
7. *recA*

Salmonella

Allele / ST Query | Strain Query | Downloads | Info | History

Salmonella enterica MLST Database

aroC dnaN hemD hisD purE sucA thrA

Sequence:

Get Info

Gene Fragment:

aroC

Per l'identificazione di Salmonella enterica

1. *aroC*
2. *dnaN*
3. *hemD*
4. *hisD*
5. *purE*
6. *sucA*
7. *thrA*

Gene	Gene Product	Direction	Oligonucleotide Sequence (5' à 3')
<i>adk</i>	adenylate kinase	F	CATCATTCTTCTCGGTGCTC
		R	AGTGCCGTCAAAC TTCAGGTA
<i>gyrB</i>	DNA gyrase subunit B	F	GTACGTTTCTGGCCTAGTGC
		R	GGGTCTTTTTCTGACAATC
<i>metE</i>	methionine synthase	F	CGGGTGACTTTGCTTGGT
		R	CAGATCGACTGGGCTGTG
<i>mdh</i>	malate dehydrogenase	F	ATGAAAGTCGCTGTTATTGG
		R	GCCGCTTGGCCCATAGAAAG
		R	TAGCTTGATAGGTTGGG
<i>pntA</i>	pyridine nucleotide transhydrogenase	F	CTTTGATGGAAAACTCTCA
		R	GATATTGCCGTCTTTTCTT
		F	GGCCAGCCCAAATCCT
<i>purM</i>	phosphoribosyl-formylglycinamide cyclo-ligase	F	GGTGTGATATTGATGCAGG
		R	GGAATGTTTTCCCAGAAGCC
<i>pyrC</i>	dihydroorotase	F	ATCATGCCTAACACGGTTCC
		R	TTCAAACACTTCGGCATA

Le colorazioni

Questi metodi forniscono informazioni quantitative sul numero totale di microrganismi presenti in un determinato habitat.

Fluorocromi che legano gli acidi nucleici

I fluorocromi sono coloranti fluorescenti che possono essere utilizzati per evidenziare microrganismi provenienti da qualunque habitat.

I fluorocromi che legano il DNA sono ampiamente utilizzati per la quantificazione di microrganismi in campioni ambientali, alimentari e clinici.

I più utilizzati sono

il **DAPI**

Arancio d'acridina

Syber green I

Questi coloranti si legano al DNA e dopo irraggiamento con radiazioni UV a seconda del loro assorbimento

DAPI	400nm	luce blu
Arancio d'acridina	500nm	luce arancio
SYBER Green I	497nm	luce verde

emettono luce di diversa lunghezza d'onda rendendo le cellule microbiche ben visibili e facilmente contabili

VANTAGGI

- Non reagiscono con altro materiale inerte quindi sono specifici per cellule
- Forniscono una stima affidabile del numero di cellule presenti

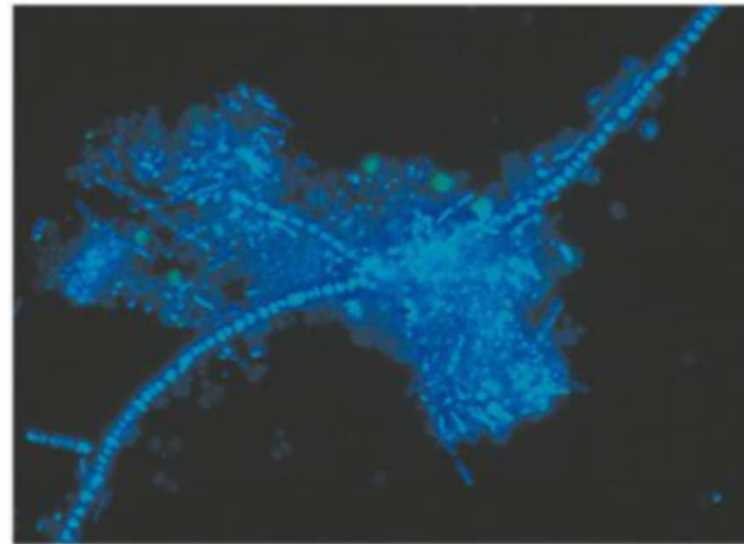
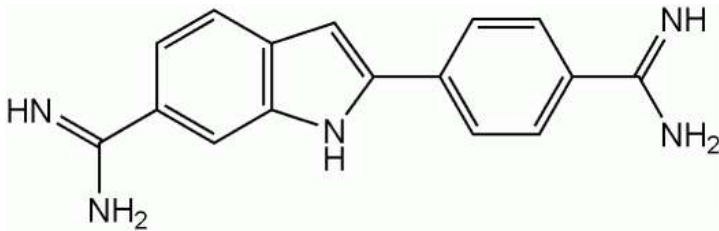
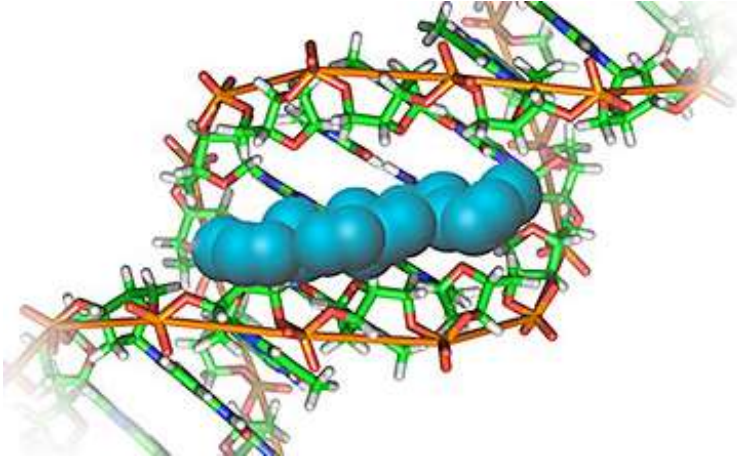
- La colorazione con Syber Green I fornisce dati quantitativi su popolazioni virali acquatiche .
- Nel caso di campioni acquatici permettono di colorare cellule trattenute da filtri

DAPI

Assorbimento nello spettro UV a 358
Emissione a 468

Colorazione blu

Si lega al solco minore del DNA
Regioni ricche in AT

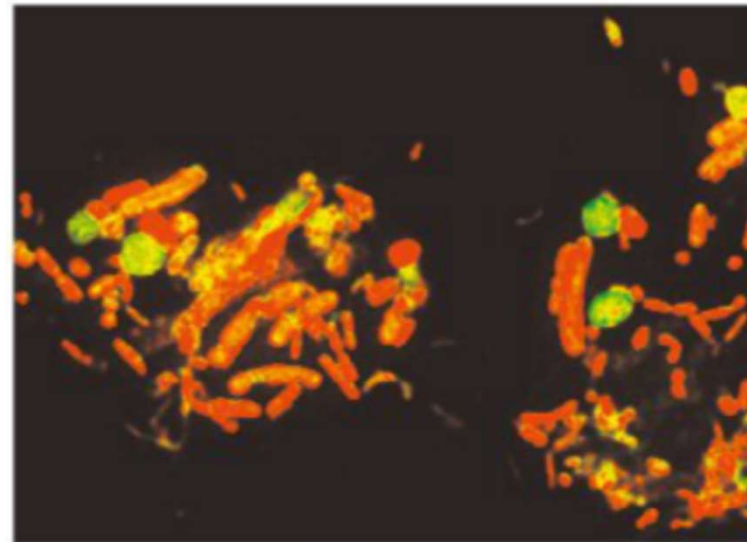


Colorazione con il DAPI di un fango attivo proveniente da un impianto di depurazione di acque reflue urbane

Arancio d'acridina

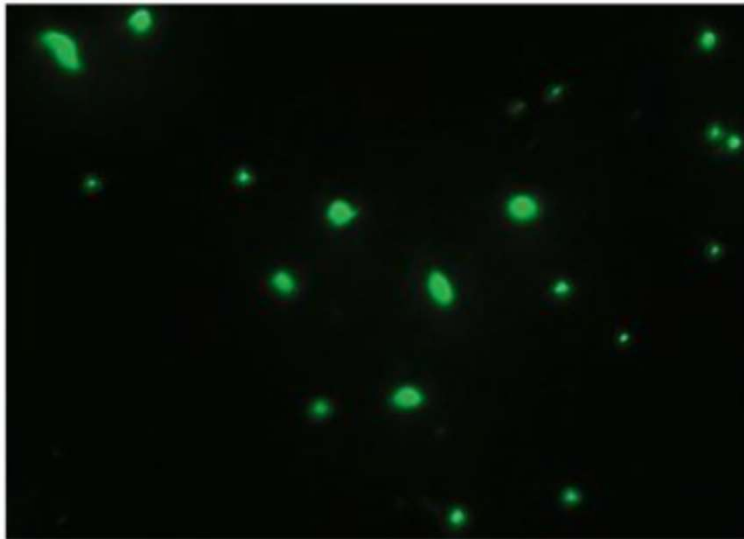
Colorante metacromatico che si lega sia al DNA che all'RNA.

In presenza di basse concentrazioni di RNA da colorazione verde,
In presenza di alte concentrazioni di RNA da colorazione arancio



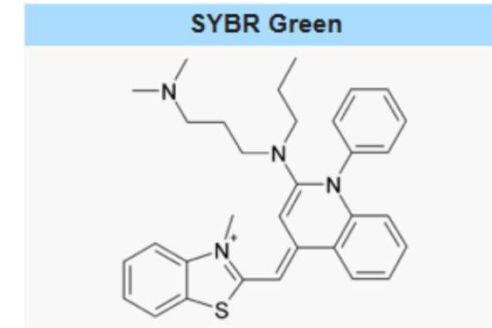
Colorazione con Arancio d'acridina dello stesso campione di fango attivo colorato con DAPI

SYBR Green composto organico aromatico si lega al DNA ds.



Willim Martins-Habenna

(c) Campione di acque superficiali colorato con SYBR green si vedono in verde le cellule batteriche



Il complesso DNA-SYBR assorbe luce blu (488 nm) ed emette luce verde (522nm)

Molto sensibile può essere utilizzato anche per i virus

SVANTAGGI

Si legano a tutte le cellule presenti in un campione in quanto riconoscono il DNA

Il DAPI e l'arancio di acridina non riescono a distinguere tra cellule vive e cellule morte

Non permettono di distinguere specie diverse

Non possono essere usati per valutare la vitalità

Non permettono di intracciare specie particolari in un campione.

Come si individuano le cellule vitali?

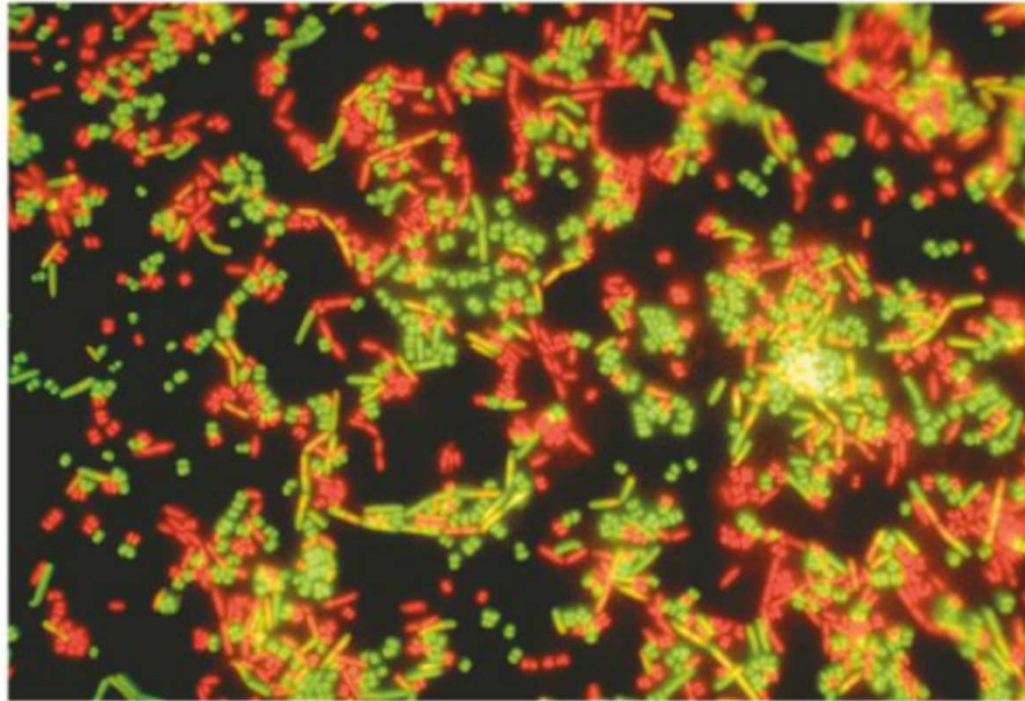
Vi sono tecniche di colorazione specifiche che permettono di differenziare cellule vive e cellule morte.

In questo modo si possono avere contemporaneamente informazioni

- Sul numero di microrganismi presenti in un dato campione
- Sulla vitalità di tali microrganismi

-La colorazione si basa sull'integrità della membrana cellulare.

Al campione vengono aggiunti due coloranti fluorescenti (uno che emette luce verde e uno luce rossa



Molecular Probes, Inc., Eugene, OR

Il colorante verde penetra in tutte le cellule indipendentemente che siano vive o morte

Il colorante rosso che contiene ioduro di propidio può penetrare solo nelle cellule con la membrana non più integra (morte).

Al microscopio a fluorescenza le cellule vive appariranno quindi di colore verde e quelle morte di colore rosso .

Figura 18.7 Colorazione per individuare cellule vive.

Cellule vive (verdi) e morte (rosse) di *Micrococcus luteus* (cocchi) e di *Bacillus cereus* (bastoncini) colorate con LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Stain.

Vantaggi

- Si ha una stima immediata dell'abbondanza e vitalità dei microrganismi nel campione

- Molto utile quando si utilizzano colture di laboratorio

Nel caso di campioni provenienti da ambienti acquatici il campione viene filtrato e il filtro viene sottoposto a colorazione

Molto utilizzato negli studi di microbiologia delle acque per valutare la vitalità di popolazioni microbiche in colonne d'acqua lacustri o oceaniche, fiumi, ruscelli

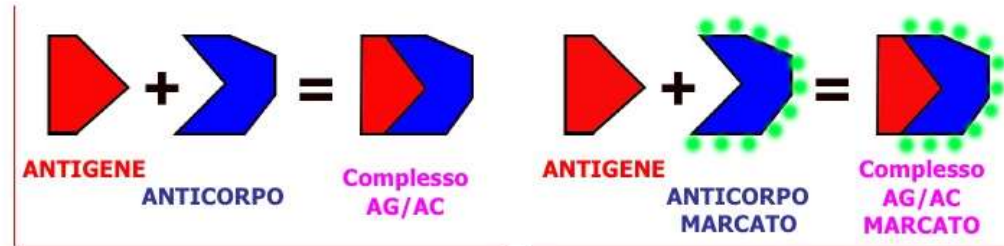
Svantaggi

- Quando si usano campioni provenienti da habitat naturali la doppia colorazione risulta poco adatta perché i materiali inerti presenti nel campione possono interferire.

Anticorpi fluorescenti

L'IMMUNOFLUORESCENZA

L'immunofluorescenza permette la visualizzazione di **antigeni** mediante **anticorpi** precedentemente marcati con fluorocromi.



Con la marcatura, all'anticorpo viene legato un fluorocromo, quindi l'anticorpo marcato reagendo con l'antigene specifico, lo renderà visibile in fluorescenza.

E' possibile rendere più specifiche le tecniche di colorazione utilizzando degli anticorpi fluorescenti.

Gli anticorpi sono in grado di riconoscere strutture superficiali di un determinato tipo di cellule. Vista l'elevata specificità può venir utilizzato per rintracciare un determinato microrganismo in un habitat complesso contenente molti microrganismi come il suolo o campioni clinici. Richiede la preparazione di anticorpi specifici. Molto utilizzato nella diagnosi clinica

Uso della GFP Green Fluorescent Protein

Invece di utilizzare anticorpi fluorescenti le cellule batteriche possono essere trattate in modo da diventare auto-fluorescenti.

In questo caso viene utilizzata la GFP (Green Fluorescence Protein) il cui gene può essere inserito tramite appositi vettori plasmidici all'interno delle cellule batteriche.

Quando può venir usata questa tecnica?

Non è adatta allo studio di comunità microbiche ma si può utilizzare per seguire un microrganismo in un determinato ambiente, per esempio le radici di una pianta.

Utilizzando questo metodo si possono effettuare studi di competizione per vedere gli effetti del microrganismo marcato con GFP sulle comunità microbiche autoctone di un determinato ambiente.

La marcatura con GFP viene ampiamente utilizzata anche per studiare le associazioni simbiotiche tra microrganismi e piante o animali. La GFP richiede ambienti aerobici perché la fluorescenza dipende dalla presenza di O₂ molecolare.

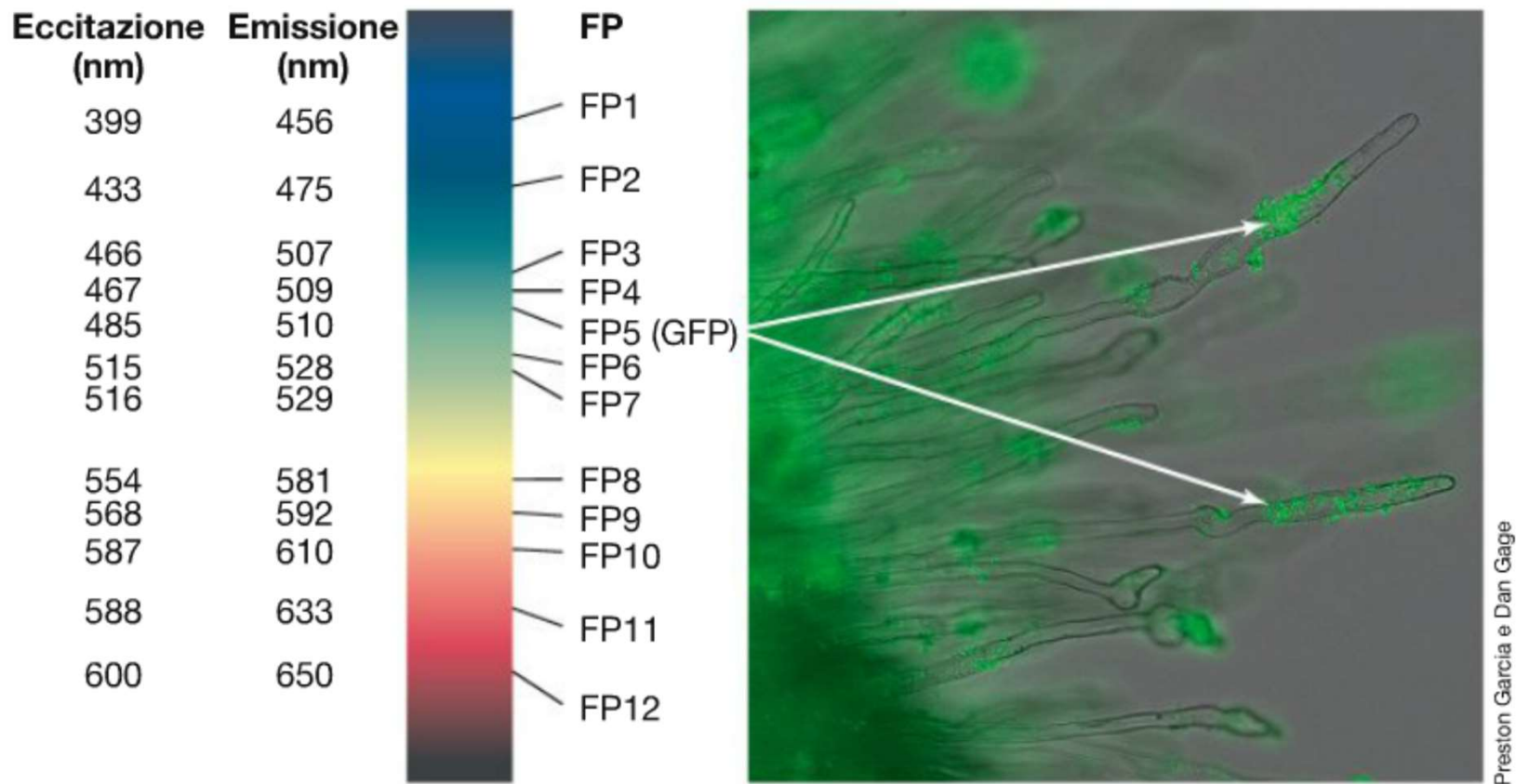


Figura 18.8 Proteine fluorescenti reporter. (a) Si conoscono dodici diverse proteine fluorescenti (FP1-FP12), con differenti proprietà di emissione ed eccitazione. (b) Cellule di *Sinorhizobium meliloti* (frecce) che recano un plasmide

contenente un promotore inducibile da un alfa-galattoside fuso alla GFP (FP5): le cellule si trovano sulla radice di un germoglio di trifoglio. La fluorescenza verde indica che sono stati secreti e resi disponibili per la crescita del batterio alfa-galattosidi.