

TECNICHE ALTERNATIVE DI MONITORAGGIO AEROBIOLOGICO E GESTIONE CLINICA DELLE POLLINOSI



Centro Congressi "S. Elisabetta"
Aula Didattica Centro Polifunzionale

Università degli Studi di Parma, Viale G.P.Usberti
21-22 Febbraio 2008

Promosso da

Associazione Italiana di Aerobiologia - AIA

In collaborazione con

**Scuola di Specializzazione in Allergologia ed Immunologia Clinica, Università degli Studi di Parma
U.O. Clinica ed Immunologia Medica, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma**

Con il Patrocinio

dell'Università degli Studi di Parma e dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma

Analisi dei campioni aeropollinici mediante spettroscopia a raggi infrarossi e con real-time PCR (Progetto CARPOL)

¹ Elena Gottardini, ¹ Sara Longhi, ¹ Antonella Cristofori, ² Rossana Dell'Anna

¹ Fondazione Edmund Mach - Istituto Agrario di San Michele all'Adige, Via E. Mach 1, 38010 San Michele all'Adige (TN), Italy; ² Fondazione Bruno Kessler, Via Sommarive 18, 38050 Trento, Italy



Per chi si occupa di monitoraggio aerobiologico è ben noto l'impegno richiesto per l'analisi microscopica dei campioni al fine dell'identificazione e della conta dei granuli pollinici catturati. La metodica in uso (Norma UNI 11108) è infatti particolarmente onerosa in termini di tempo e richiede competenze specifiche per poter effettuare il riconoscimento - su base morfologica- delle particelle aerobiologiche campionate (Feliziani, 1986; Faegri and Iversen, 1989; Nilsson and Praglowski, 1992).

In alcune realtà tali difficoltà hanno limitato il numero di siti di campionamento e, conseguentemente, la possibilità di sviluppare un'adeguata rete di monitoraggio. Una rete aerobiologica è necessaria per conoscere il reale andamento spazio-temporale dei pollini, tanto più in situazioni complesse dal punto di vista orografico e vegetazionale come il Trentino. In questa provincia il monitoraggio aeropollinico è attualmente svolto solo presso l'Istituto Agrario di San Michele all'Adige - Fondazione Edmund Mach (IASMA) che, dal 1989 si occupa di tale attività in collegamento con l'Associazione Italiana di Aerobiologia e, più recentemente, partecipando alla rete RIMA di APAT.

Dunque, un metodo di analisi dei campioni aerobiologici più rapido ma altrettanto affidabile sarebbe molto utile per risolvere tali problemi e consentirebbe, attraverso l'attivazione di un adeguato numero di stazioni di campionamento, di offrire un'informazione aeropollinica dettagliata nello spazio e nel tempo, garantendo una più puntuale comunicazione del rischio alla popolazione allergica. E' infatti noto che le informazioni aeropolliniche sono un utile supporto al trattamento delle allergopatie: vengono utilizzate come supporto nella diagnosi e nell'impostazione delle terapie dei soggetti sensibilizzati, permettono di mettere in atto strategie volte a limitare l'esposizione a questi allergeni naturali e quindi contribuiscono a contenere la sintomatologia e migliorare la qualità di vita.

Per cercare di dare una soluzione a tale problema il settore Aerobiologia di IASMA ha sviluppato e coordina un progetto di ricerca il cui obiettivo è di mettere a punto una metodica innovativa, rapida, sensibile e affidabile, per l'analisi dei campioni aeropollinici.

Nello sviluppare il progetto, denominato CARPOL, l'attenzione è stata volta ad individuare tecnologie innovative che potenzialmente fossero adatte a risolvere la problematica. Si è quindi scelto di seguire due linee di ricerca parallele, adottando contemporaneamente i seguenti approcci metodologici:

- **Biologia molecolare** – la ricerca si basa sull'idea di individuare tratti di DNA specifici per ogni specie pollinica e di disegnare dei primer in grado di amplificare tali regioni del DNA tramite reazione di PCR; associando al processo di amplificazione specifiche sonde è possibile quantificare il materiale genetico di partenza, attraverso la rilevazione di real-time PCR.



L'obiettivo finale è quello di applicare la real-time PCR ai campioni pollinici: questo consentirà di determinare i taxa presenti nel campione e di quantificarne il DNA. Parallelamente si intende sviluppare un sistema per convertire i dati quantitativi di DNA in numero di granuli pollinici. Negli ultimi anni i test biomolecolari basati sull'amplificazione di regioni del DNA, associati alle tecnologie di rilevazione di real-time PCR e/o ibridazione di array, sono stati utilizzati come strumenti diagnostici in vari settori (Gachon *et al.* 2004). Esistono infatti numerosi progetti chiamati di "DNA Barcode" che hanno lo scopo di identificare rapidamente diverse specie animali e vegetali e determinarne rapporti di filogenesi attraverso delle corte sequenze di DNA che fungono da codici a barre (Kress *et al.* 2005; Chase *et al.* 2005).

- **Spettroscopia FT-IR** – questa tecnica analitica si basa sulla spettroscopia a raggi infrarossi trasformata di Fourier (FT-IR); consente di indagare contemporaneamente diverse componenti cellulari come lipidi, peptidi, proteine, acidi nucleici, zuccheri e metaboliti diversi, permettendo di ottenere informazioni su ognuna di queste componenti e sui loro rapporti. FT-IR è stata recentemente sperimentata per lo studio di pollini da Pappas *et al.* (2003).

L'idea progettuale è di caratterizzare lo spettro FT-IR di campioni pollinici noti e di costruire una libreria di spettri di riferimento. L'analisi FT-IR di campioni ignoti e il confronto degli spettri ottenuti con quelli presenti nella libreria di riferimento dovrebbe consentire di identificare i campioni.

Il progetto CARPOL, finanziato dalla Fondazione Caritro, ha la durata di due anni e si concluderà alla fine del 2008. La sua realizzazione vede coinvolte più unità operative con differenti e specifiche competenze: le ricerche si svolgono nei laboratori di Aerobiologia e di Genetica molecolare del Centro Sperimentale di IASMA, presso la Divisione Fisica e Chimica delle Superfici della Fondazione Bruno Kessler - a sua volta in collegamento con il Dipartimento di Informatica dell'Università degli Studi di Verona- e presso il Dipartimento di Ingegneria dei Materiali e Tecnologie Industriali dell'Università di Trento.

Dopo il primo anno di attività, è possibile descrivere le fasi di lavoro affrontate e delineare i risultati fino ad ora ottenuti.

La prima fase ha riguardato la scelta delle specie vegetali da considerare per il progetto e delle quali raccogliere campioni di polline da utilizzare come materiale di riferimento per entrambe le metodiche. Il set di piante è stato definito in base alla loro presenza nella flora locale e all'importanza allergologica (Tab. 1). Il polline di ciascuna specie è stato raccolto da tre piante situate in altrettante differenti località al fine di garantire una buona rappresentatività delle differenze genetiche che possono esistere tra popolazioni differenti.

I campioni pollinici sono stati raccolti da gennaio a settembre 2007 seguendo i periodi di fioritura delle singole specie; al momento della raccolta del polline, è stato preso anche un campione di foglie per l'analisi biomolecolare.

I pollini, preventivamente disidratati, e le foglie sono stati posti in freezer per la conservazione.

Tabella 1. Elenco delle specie vegetali considerate per il progetto CARPOL.

Famiglia	Genere	Specie
Betulaceae	Alnus	<i>Alnus glutinosa</i>
Betulaceae	Betula	<i>Betula pendula</i>
Compositae	Artemisia	<i>Artemisia vulgaris</i>
Corylaceae	Corylus	<i>Corylus avellana</i>
Corylaceae	Ostrya	<i>Ostrya carpinifolia</i>
Cupressaceae	Cupressus	<i>Cupressus arizonica</i>
Cupressaceae	Cupressus	<i>Cupressus sempervirens</i>
Graminaceae	Dactylis	<i>Dactylis glomerata</i>
Graminaceae	Phleum	<i>Phleum pratense</i>
Graminaceae	Poa	<i>Poa annua</i>
Graminaceae	Lolium	<i>Lolium perenne</i>
Oleaceae	Fraxinus	<i>Fraxinus ornus</i>
Oleaceae	Olea	<i>Olea europaea</i>
Urticaceae	Parietaria	<i>Parietaria officinalis</i>

Per quanto riguarda l'approccio con la biologia molecolare, la prima fase affrontata è stata un'analisi bioinformatica finalizzata alla ricerca di regioni DNA taxon- specifiche per i taxa elencati nella tabella 1; la ricerca è stata condotta sulle sequenze depositate in banche dati presenti in Internet. Sulle sequenze identificate dall'analisi bioinformatica sono state disegnate coppie di primer e sonde, allo scopo di procedere con la Real-Time PCR per il riconoscimento dei taxa pollinici.

Il primo stadio del lavoro affrontato in laboratorio ha riguardato l'estrazione del DNA da materiale fogliare al fine di effettuare test preliminari di primer/sonde. La successiva estrazione del DNA da polline ha richiesto la messa a punto di un protocollo *ad hoc* in quanto la parete del granulo pollinico rendeva difficoltosa la procedura.

Sfruttando queste metodiche basate sul riconoscimento di alcuni tratti di DNA specifici e sulla loro amplificazione, è stato possibile identificare diverse specie di granuli pollinici (Fig. 1) e verificare la possibilità di quantificare alcune di esse, in tempi abbastanza rapidi. Inoltre si è positivamente testata la possibilità di applicare queste analisi ai campioni aeropollinici ottenuti con il campionatore Hirst.

L'attività svolta con la linea di ricerca basata sulla spettroscopia ha riguardato in modo particolare l'impiego della spettro- microscopia infrarossa trasformata di Fourier (FT-IR) per la caratterizzazione di granuli pollinici singoli compresi nell'elenco della tabella 1 (Fig. 2). L'attività è stata focalizzata anche sugli aspetti di *pre- processing* e *data mining* per l'estrazione dagli spettri FT-IR di informazione rilevanti per gli obiettivi del progetto. Lo sviluppo di procedure di pre-elaborazione e di estrazione dell'informazione dagli spettri FT-IR di granuli pollinici ha permesso di testare l'affidabilità di diversi classificatori automatici per verificare la possibilità di riconoscere il taxon di appartenenza di una data specie pollinica all'interno di un set di 11 taxa.

I risultati ottenuti possono essere considerati di assoluto rilievo in termini di automatizzazione della procedura; la precisione complessiva offerta dal classificatore è comparabile a quella garantita dai metodi di analisi tradizionali.

Le prestazioni del sistema sono però in parte inficiate dall'impossibilità di identificare alcune specie con sufficiente precisione. In secondo luogo, i tempi necessari per l'acquisizione di uno spettro da singolo granulo sono dell'ordine di alcuni minuti; ne consegue che l'analisi di qualche migliaio di granuli, ovvero di un campione reale, richiederebbe alcune decine di ore, ostacolando la reale applicabilità del metodo.

In conclusione, l'approccio biomolecolare sembra essere piuttosto promettente: dai risultati del primo anno di progetto ne è emersa la potenzialità di sviluppare un sistema affidabile e rapido per riconoscere e quantificare il polline presente in atmosfera. L'attività procederà con il sequenziamento dei prodotti di PCR ottenuti per alcuni taxa al fine di migliorare la specificità delle sonde disegnate e con l'identificazione di nuove sequenze specifiche e il disegno di primer/sonde mancanti. Infine verranno effettuate analisi Real-Time PCR su diverse miscele polliniche per verificare la capacità del sistema di individuare e quantificare i taxa presenti. Parallelamente si lavorerà per realizzare un sistema di conversione dei dati ottenuti con metodiche biomolecolari (prodotti di PCR) nell'unità di misura utilizzata per esprimere la concentrazione aeropollinica rilevata con la metodica standardizzata (n. pollini/m³ aria).

Bibliografia

- Chase W., Salamin N., Wilkinson M., Dunwell J.M., Kesanakurthi R.P., Haidar N. and Savolainen V. 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long term goals. *Phil. Trans R. Soc B*. Published on line.
- Faegri, Knut and Iversen, Johs. *Textbook of pollen analysis*. Chichester - New York - Brisbane - Toronto - Singapore: John Wiley & Sons Ltd.; 1989. pp. 328
- Feliziani, Vincenzo. *Pollini di interesse allergologico*. Milano, Italy: Masson Italia Editori S.p.a.; 1986.
- Gachon C., Mingam A. and Charrier B. 2004. Real-Time PCR: what relevance to plant studies? *Journal of Experimental Botany*. 55 (402): 1445-1454.

- Kress W.J., Wurdack K.J., Zimmer E.A., Weigt L.A., Janzen D.H. 2005. Use of DNA barcode to identify flowering plants. PNAS. 102 (23): 8369-8374.
- Nilsson, Siwert and Praglowski. Erdtman's Handbook of Palynology. 2nd ed. Kobenhavn, Denmark: Munksgaard; 1992.
- Pappas C. S., P. A. Tarantilis, P. C. Harizanis and M. G. Polissiou. New Method for Pollen Identification by FT-IR Spectroscopy. Applied Spectroscopy. 2003 Jan 1; 57(1): 23-27.



Fig. 1. Amplificazione di DNA estratto da polline - primer disegnato su *Betula*.

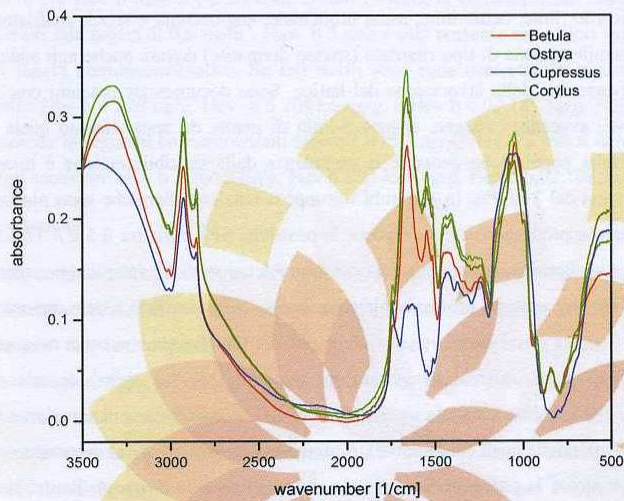


Fig. 2. Esempio di spettroscopia FT-IR su campioni puri in KBr.

