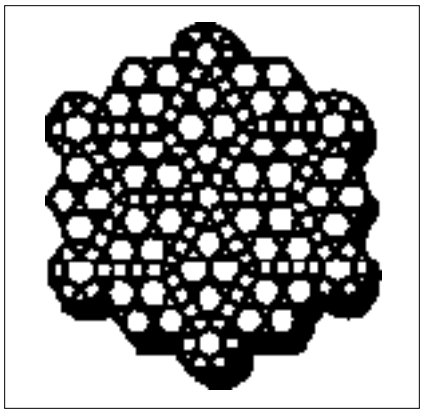
Caleidoscopio



Giovanna Angela Gentilomi

Sonde genetiche in microbiologia

Istituto di Microbiologia
Università di Bologna
Via Massarenti, 9
40138 Bologna

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

66

MEDICAL
SYSTEMS S.P.A.

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. (010) 83. 401
Stampato a Genova 1991.

ISTRUZIONI PER GLI AUTORI

Informazioni generali. *Caleidoscopio* pubblica lavori di carattere monografico a scopo didattico su temi di Medicina. La rivista segue i requisiti consigliati dall'*International Committee of Medical Journal Editors*. Gli Autori vengono invitati dal Direttore Responsabile. La rivista pubblica anche monografie libere, proposte direttamente dagli Autori, redatte secondo le regole della Collana.

Testo. La monografia deve essere articolata in paragrafi snelli, di rapida consultazione, completi ed allo stesso tempo chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati. E' opportuno evitare di riportare solo proprie personali opinioni dando un quadro limitato delle problematiche. La lunghezza del testo può variare dalle 60 alle 70 cartelle dattiloscritte. Si prega di dattilografare su una sola facciata del foglio formato A4 con margini di almeno 25 mm. Usare dovunque doppi spazi e numerare consecutivamente. Ogni sezione dovrebbe iniziare con una nuova pagina.

Frontespizio. Deve riportare il nome e cognome dell'Autore(i) -non più di cinque- il titolo del volume, conciso ma informativo, la Clinica o Istituto cui dovrebbe essere attribuito il lavoro, l'indirizzo, il nome e l'indirizzo dell'Autore (compreso telefono e fax) responsabile della corrispondenza.

Bibliografia. Deve essere scritta su fogli a parte secondo ordine alfabetico seguendo le abbreviazioni per le Riviste dell'Index Medicus e lo stile illustrato negli esempi:

1) Björklund B., Björklund V.: Proliferation marker concept with TPS as a model. A preliminary report. J. Nucl. Med. Allied. Sci 1990 Oct-Dec, VOL: 34 (4 Suppl), P: 203.

2 Jeffcoate S.L. e Hutchinson J.S.M. (Eds): The Endocrine Hypothalamus. London. Academic Press, 1978.

Le citazioni bibliografiche vanno individuate nel testo, nelle tabelle e nelle legende con numeri arabi tra parentesi. La Redazione è collegata on-line con le più importanti Banche Dati (Medline, Cancerlit, AIDS etc) e fornisce ogni eventuale assistenza agli Autori.

Tabelle e figure. Si consiglia una ricca documentazione iconografica esplicativa (in bianco e nero eccetto in casi particolare da concordare). Figure e tabelle devono essere numerate consecutivamente (secondo l'ordine di citazione nel testo) e separatamente; sul retro delle figure deve essere indicato l'orientamento, il nome dell'Autore ed il numero. Le figure devono essere realizzate professionalmente; è inaccettabile la riproduzione di caratteri scritti a mano libera. Lettere, numeri e simboli dovrebbero essere chiari ovunque e di dimensioni tali che, quando pubblicati, risultino ancora leggibili. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro ed in particolare dell'autorizzazione alla pubblicazione di figure o altro. Titoli e spiegazioni dettagliate appartengono alle legende, non alle figure stesse.

Su fogli a parte devono essere riportate le legende per le figure e le tabelle.

Unità di misura. Per le unità di misura utilizzare il sistema metrico decimale o loro multipli e nei termini dell'International system of units (SI).

Abbreviazioni. Utilizzare solo abbreviazioni standard. Il termine completo dovrebbe precedere nel testo la sua abbreviazione, a meno che non sia un'unità di misura standard.

Presentazione della monografia. Riporre le fotografie e le diapositive in busta separata, una copia del testo e dei grafici archiviati su un dischetto da 3.5 pollici preferibilmente Macintosh, se MS-DOS il testo dovrà essere in formato RTF ed i grafici in formato PC.TIF o PC.Paintbrush.

Il dattiloscritto originale, le figure, le tabelle, il dischetto, posti in busta di carta pesante, devono essere spedite al Direttore Responsabile con una lettera di accompagnamento. L'autore dovrebbe conservare una copia a proprio uso. Dopo la valutazione espressa dal Direttore Responsabile, la decisione sulla eventuale accettazione del lavoro sarà tempestivamente comunicata all'Autore. Il Direttore responsabile deciderà sul tempo della pubblicazione e conserverà il diritto usuale di modificare lo stile del contributo; più importanti modifiche verranno eventualmente fatte in accordo con l'Autore. I manoscritti e le fotografie se non pubblicati non si restituiscono.

L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituirle al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cinquanta copie della monografia.

L'Autore della monografia cede i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera alla Rivista *Caleidoscopio* con diritto di stampare, pubblicare, dare licenza a tradurre in altre lingue in Nazioni diverse rinunciando ai diritti d'Autore.

Tutta la corrispondenza deve essere indirizzata al Direttore Responsabile al seguente indirizzo:

Dott. Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari

Editoriale

Le sonde molecolari, dopo essere state ampiamente utilizzate nei laboratori di microbiologia a scopo di ricerca, sono oggi disponibili a scopi diagnostici in numerosi laboratori.

I rapidi miglioramenti di cui siamo stati testimoni hanno infatti permesso di avere oggi la disponibilità di numerosi kit per la diagnostica con sonde che utilizzano gli acidi nucleici.

I vantaggi di queste sonde sono rappresentati dalla possibilità di fare una diagnosi molto rapida ed estremamente specifica dell'agente infettivo causa della malattia.

Sebbene i metodi sinora utilizzati siano basati principalmente sulla marcatura della sonda con una sostanza radioattiva (sonde calde) si stanno facendo notevoli sforzi per approntare delle sonde marcate con un tracciante non-radioattivo che permetterà sicuramente in futuro, insieme ad una velocità di esecuzione ancora maggiore ed alla automatizzazione degli esami, una ampissima diffusione di queste metodologie in tutti i laboratori di microbiologia.

Per illustrare questi temi partendo dalla semantica e comprendere le basi teoriche pubblichiamo questa monografia della dottoressa Gentilomi che ha accumulato, sotto la guida del Professor Michele La Placa, una propria personale esperienza ed ha contribuito in modo originale allo sviluppo di queste tecniche.

La dottoressa Gentilomi svolge infatti la sua attività presso l'Istituto di Microbiologia dell'Università degli Studi di Bologna. Titolare di una borsa di studio per la ricerca sui "Metodi di controllo della sterilità" nel 1988 ha ricevuto il premio nazionale "Cecilia Cioffrese",quale premio per le migliori ricerche e gli studi più approfonditi eseguiti da giovani laureati, nel settore "Malattie da virus e loro cura". Nel 1990 è risultata vincitrice di una borsa di studio per ricerche da condurre nel campo dell'A.I.D.S. ed infezioni virali ad essa correlate, bandito dall'Istituto Superiore di Sanità.

La dottoressa Gentilomi si è dedicata allo studio delle proteine virus-indotte in diversi sistemi colturali, approfondendo in particolare l'analisi del complesso degli antigeni nucleari indotti dal virus di Epstein-Barr in cellule trasformate.

Più recentemente ha intrapreso studi di carattere biologico-molecolare riuscendo ad allestire sonde genetiche mediante clonazione del genoma del citomegalovirus e del parvovirus umano B19 in un vettore plasmidico amplificato in E. coli.

L'insieme dei risultati ottenuti è stato reso noto in diversi lavori, prevalentemente su Riviste Internazionali ed in varie relazioni e comunicazioni a Convegni Nazionali ed Internazionali.

Docente nella Scuola di Specializzazione in Tossicologia della Facoltà di Farmacia dell'Università degli Studi di Bologna, è stata nominata Professore a contratto per lo svolgimento del Corso "Biotecnologie per l'identificazione di virus animali", presso la Scuola di Specializzazione in Tossicologia della Facoltà di Farmacia dell'Università degli Studi di Bologna.

Sergio Rassu

Presentazione

I rapidi progressi che, in questi ultimi anni, hanno caratterizzato le tecniche di biologia molecolare, hanno già consentito una serie di notevoli applicazioni alle indagini microbiologiche volte alla diagnosi di infezione e promettono, nell'immediato futuro, di rivoluzionarne sia l'aspetto metodologico sia, e soprattutto, la concezione intellettuale che le sottintende.

Ritengo sia, quindi, estremamente utile, in questa fase, il lavoro della Dr.ssa Giovanna Gentilomi, giovane e brillante microbiologo, che riunisce gli elementi essenziali, metodologici e concettuali, delle tecniche di "ingegneria genetica" intese alla costruzione di "sonde molecolari" ed alla loro applicazione alla diagnostica microbiologica.

La Dr.ssa Gentilomi, che ha dedicato la sua attività di ricerca alle tecniche innovative nella diagnosi microbiologica raggiungendo una serie di originali ed interessanti risultati, ha trasposto in questa monografia la sua personale esperienza, il che le ha consentito un discorso chiaro e coerente che, sono certo, sarà particolarmente apprezzato da quanti sono interessati al problema.

Prof. Michele La Placa
Direttore dell'Istituto di Microbiologia
della Università di Bologna

Introduzione

Negli ultimi anni sono stati compiuti notevoli progressi nel campo della biologia molecolare. La comprensione della struttura e della regolazione dei geni è stata infatti accompagnata dall'affinamento dell'insieme di tecniche sperimentali che, note come ingegneria genetica, permettono di manipolare i DNA. Tali progressi consentono di prevedere per il prossimo futuro molteplici applicazioni delle tecnologie genetiche in campo medico e nella produzione industriale di molecole biologiche.

Già oggi si sono ottenuti risultati di fondamentale importanza nella produzione di enzimi ed ormoni mediante ingegneria genetica (ad es.: insulina, interferone, fattori di crescita, vaccini...). Sicuramente fra i più stimolanti sviluppi di queste metodologie va menzionato il loro possibile impiego nella diagnosi molecolare di gravi patologie di origine genetica e dei tumori.

In campo microbiologico l'impiego della tecnologia del DNA ricombinante ha portato alla realizzazione di sonde genetiche mediante le quali è possibile diagnosticare la presenza di agenti infettivi in campioni clinici.

In questa trattazione ci si occupa appunto delle basi teorico-pratiche della costruzione ed impiego delle sonde genetiche con particolare riguardo alle loro applicazioni in campo microbiologico.

Endonucleasi di restrizione

Si tratta di particolari enzimi di origine batterica in grado di riconoscere specifiche sequenze di basi e di operare dei "tagli" a carico di ciascuna delle due eliche del DNA. Tali enzimi in natura vengono prodotti dai batteri allo scopo di demolire molecole di DNA estraneo (es.: DNA fagico). Ciascuno di questi enzimi riconosce sequenze di basi che vanno da un minimo di 4 ad un massimo di 8 nucleotidi. Le sequenze corrispondenti del genoma batterico, in natura, vengono "mimetizzate" mediante metilazione dei residui adenilici o citidilici.

L'attività delle endonucleasi di restrizione produce in un determinato DNA un insieme di frammenti, caratteristico per ogni enzima. Nel caso del genoma umano il numero di tali frammenti è assai elevato (dell'ordine di alcuni milioni) e la loro lunghezza è estremamente variabile. La distribuzione in lunghezza di questi frammenti genomici è in diretta relazione con la lunghezza della sequenza di basi riconosciuta dall'enzima di restrizione utilizzato. Infatti quanto più lunghe sono le sequenze di riconoscimento tanto più raramente esse sono rappresentate nel genoma. L'enzima di

restrizione opererà quindi tagli poco frequenti producendo frammenti di DNA più lunghi.

Attualmente si conoscono più di 600 enzimi di restrizione ciascuno con una diversa specificità, e buona parte di essi è già reperibile in commercio. Un esempio dell'attività delle endonucleasi di restrizione è costituito dall'enzima EcoRI, che taglia ciascuno dei due filamenti di un DNA bicatenario in un punto diverso (Cohen e al. 1973) (fig.1).

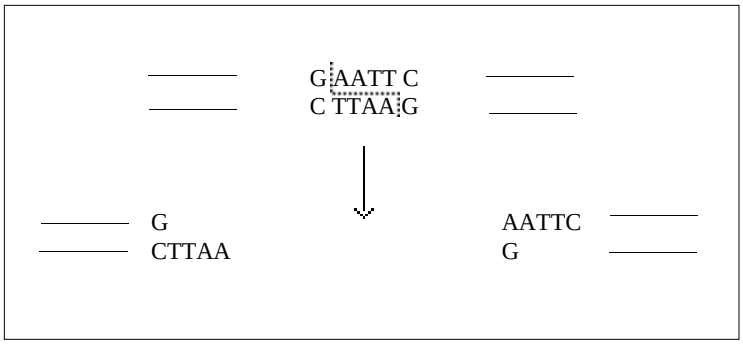


Figura 1. L'endonucleasi di restrizione EcoRI taglia specificamente la sequenza GAATTC, tra G e A, generando estremità coesive.

I frammenti di DNA ad entrambi i lati del sito bersaglio si separano e, a causa dello sfalsamento dei singoli siti di taglio, essi presentano regioni a singolo filamento che protrudono e sono fra loro complementari.

Quando due diverse molecole di DNA vengono tagliate con EcoRI si generano le stesse estremità complementari su entrambe le molecole; ciò fa sì che una di esse possa associarsi con l'altra.

Sfruttando queste proprietà degli enzimi di restrizione è possibile inserire un frammento di DNA in un genoma che funga da vettore. Il vettore viene poi introdotto in un ospite, solitamente di origine batterica (trasformazione), e, grazie alla sua capacità di replicarsi, anche dopo l'inserzione di sequenze di DNA addizionali, si può ottenere il frammento in questione in quantità illimitata. Questa tecnica prende il nome di clonazione del DNA.

Vettori di clonazione

I vettori di clonazione sono rappresentati da plasmidi batterici e da fagi, cioè da elementi genetici extracromosomici in grado di duplicarsi autonomamente all'interno di un batterio, indipendentemente dalla duplicazione del cromosoma batterico.

L'inserzione di frammenti di DNA estraneo in un vettore genera plasmidi o fagi chimerici (o ibridi), che consistono in parte del DNA autentico del genoma originario e in parte delle sequenze estranee addizionali. Questi elementi chimerici si replicano nei batteri esattamente come il plasmide o il fago originali e possono quindi essere ottenuti in grandi quantità (fig.2).

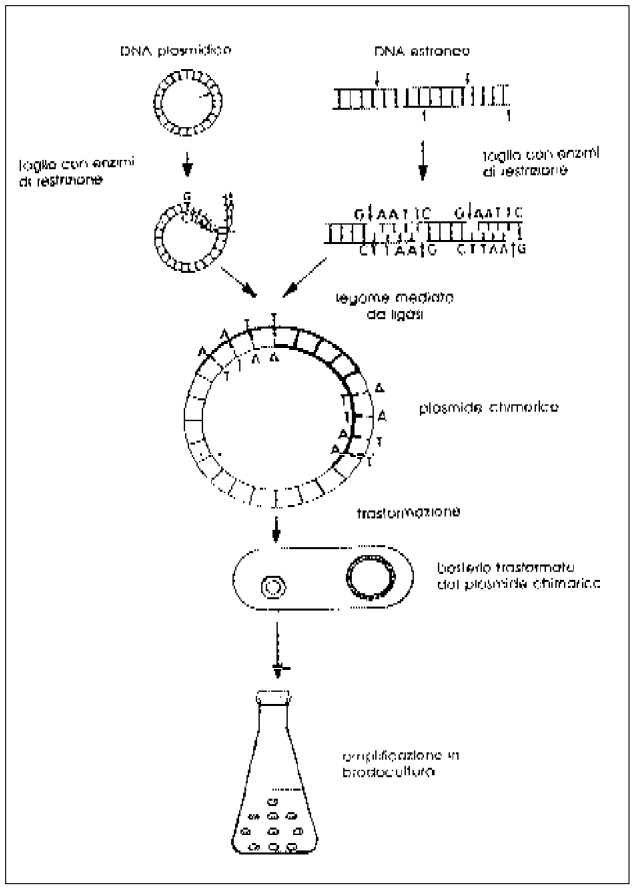


Figura 2. Costruzione di un plasmide ricombinante.

I plasmidi sono piccoli elementi genetici autonomi, presenti in numerose specie batteriche; i loro genomi sono rappresentati da DNA circolare bicatenario e sono dotati di un sistema di replicazione che li mantiene, all'interno del batterio ospite, ad un livello caratteristico.

A questo riguardo si distinguono due tipi di plasmidi: plasmidi a copia singola e plasmidi multicopia (Bolivar e al. 1977, 1977a; Covarrubias e al. 1981). I primi vengono mantenuti all'interno del batterio in numero di un DNA plasmidico per cromosoma dell'ospite, i secondi, invece, sono presenti in numero maggiore, solitamente da 10 a 20 genomi per cellula. Alcuni plasmidi, inoltre sono sottoposti ad un controllo di replica-

zione rilassato, il che significa che possono accumularsi in quantità cospicue (fino a 1000 genomi per cellula) quando i batteri ospiti cessano di moltiplicarsi (Tomizawa e al. 1974). Data la loro aumentata resa in materiale questi plasmidi sono i più utilizzati come vettori di clonazione.

Identificazione delle colonie batteriche che contengono plasmidi ricombinanti.

Una volta avvenuta la trasformazione dei batteri mediante plasmidi chimerici, si tratta di identificare le colonie batteriche che contengono tali plasmidi. Esistono quattro metodi utilizzati comunemente a questo scopo:

1. analisi di restrizione su DNA plasmidico;
2. α-complementazione;
3. inattivazione per inserzione;
4. screening mediante ibridazione.

1. Analisi di restrizione

Questa tecnica prevede il prelievo di alcune colonie batteriche trasformate che vengono fatte crescere in coltura. I DNA plasmidici isolati da ciascuna coltura vengono analizzati mediante digestione con enzimi di restrizione ed elettroforesi in gel di agarosio. Questa procedura, sebbene laboriosa, è il metodo di scelta quando esiste una elevata possibilità di trovare i ricombinanti desiderati nell'ambito di un piccolo numero di colonie trasformate; per esempio quando il legame del vettore al frammento di DNA estraneo produce un numero di colonie trasformate significativamente più elevato che entrambi i controlli di legame (vettore da solo e frammento estraneo da solo). Con notevole pratica è possibile, mediante questa metodica, estrarre ed analizzare 36 minipreparazioni di DNA plasmidico in 2-3 ore (Maniatis e al. 1989a).

2. α-complementazione

La maggior parte dei vettori d'uso corrente (per es. la serie pUC) veicola un breve segmento del DNA di E.coli che contiene le sequenze regolatrici e le informazioni geniche per i primi 146 aminoacidi dell'enzima β-galattosidasi (lac Z) (fig.3).

In questo segmento è presente un polilinker (sito multiplo di clonazione) responsabile dell'inserzione di alcuni aminoacidi nel frammento aminoterminale della β-galattosidasi. Vettori di questo tipo vengono usati in cellule ospiti che codificano per la porzione carbossiterminale della β-galattosidasi. Sebbene nessuno dei due frammenti, presi singolarmente, (né quello dell'ospite, né quello plasmidico) siano attivi, in associazione essi possono formare una proteina enzimaticamente attiva. Questo tipo di complementazione, in cui mutanti di batteri lac Z positivi (lac^+), deleti nel segmento prossimale dell'operatore, sono complementati da mutanti di batteri lac Z negativi (lac^-), con la regione dell'operatore prossimale intatta, è detta α-complementazione. (Ull-

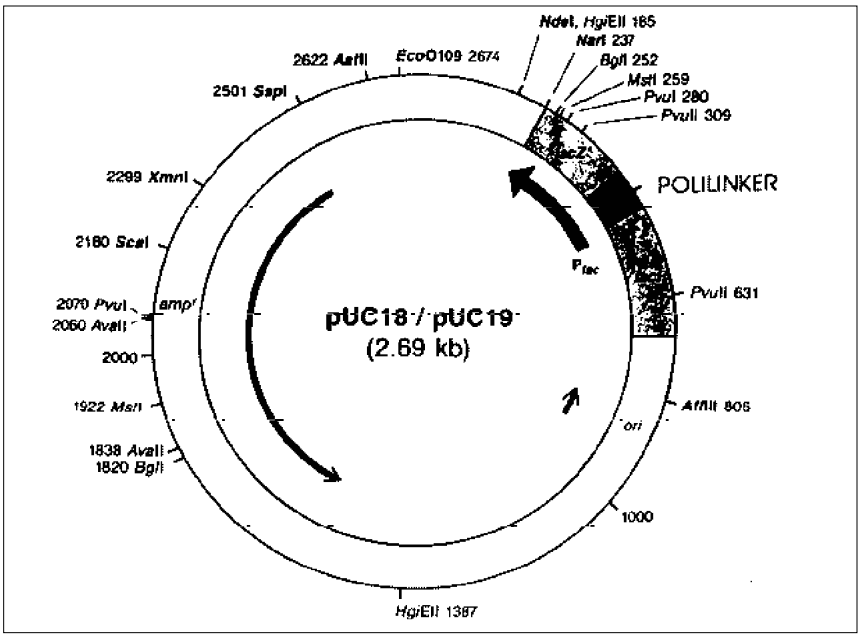


Figura 3. Mappa genica dei plasmidi pUC18/pUC19. In figura sono rappresentati il gene per la resistenza all'ampicillina, l'operatore lac Z ed i siti di restrizione delle endonucleasi.

mann e al. 1967). I batteri lac$^+$, in seguito ad α-complementazione sono facilmente riconoscibili perché formano colonie di colore blu in presenza di un substrato cromogeno (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galattoside) (Horwitz e al. 1964) (fig.4a).

L'inserzione di un frammento di DNA estraneo nel polilinker del plasmide, risulta nella produzione di un frammento aminoterminale che non permette l'α complementazione. I batteri che portano plasmidi ricombinanti formano quindi colonie bianche (fig.4b).

Figura 4. Screening di colonie batteriche trasformate mediante α complementazione. (a) colonie trasformate dal plasmide originario (blu), (b)colonie trasformate dal plasmide chimerico (bianche).

Lo sviluppo di questo semplice saggio colorimetrico ha notevolmente semplificato l'identificazione di ricombinanti costruiti in vettori plasmidici di questo tipo. Questo metodo permette di saggiare visivamente migliaia di colonie e di riconoscere quelle che portano il plasmide ricombinante. La struttura di questo plasmide viene poi verificata mediante analisi di restrizione in minipreparazioni di DNA plasmidico.

3. Inattivazione per inserzione

Questo metodo viene solitamente utilizzato con i vettori più primitivi (es. pBR322) che portano i geni per la resistenza a due o più antibiotici ed opportuni siti di taglio per gli enzimi di restrizione (Maniatis e al. 1989a) (fig.5).

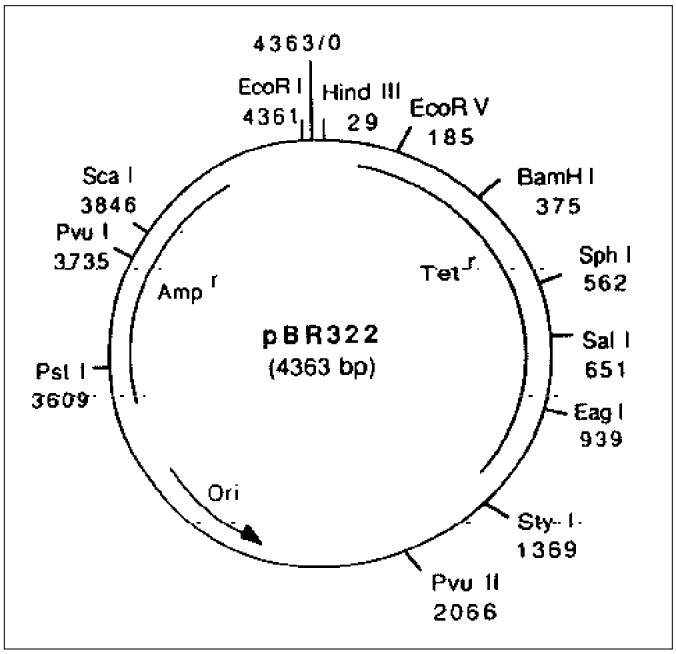


Figura 5. Mappa genica del plasmide pBR322. In figura sono rappresentati i geni per la resistenza all'ampicillina (amp^r)e alla tetraciclina (tet^r) ed i siti di restrizione delle endonucleasi.

Il DNA da inserire ed il DNA plasmidico vengono digeriti con enzimi di restrizione che riconoscono siti localizzati in uno solo dei geni per l'antibiotico-resistenza (es. gene tet^r, responsabile della resistenza alla tetraciclina) (fig.6).

Dopo il legame dei due DNA e successiva trasformazione in E.coli, le cellule trasformate vengono selezionate per la resistenza al secondo antibiotico (es. ampicillina). Alcune colonie che crescono in presenza di ampicillina conterranno i

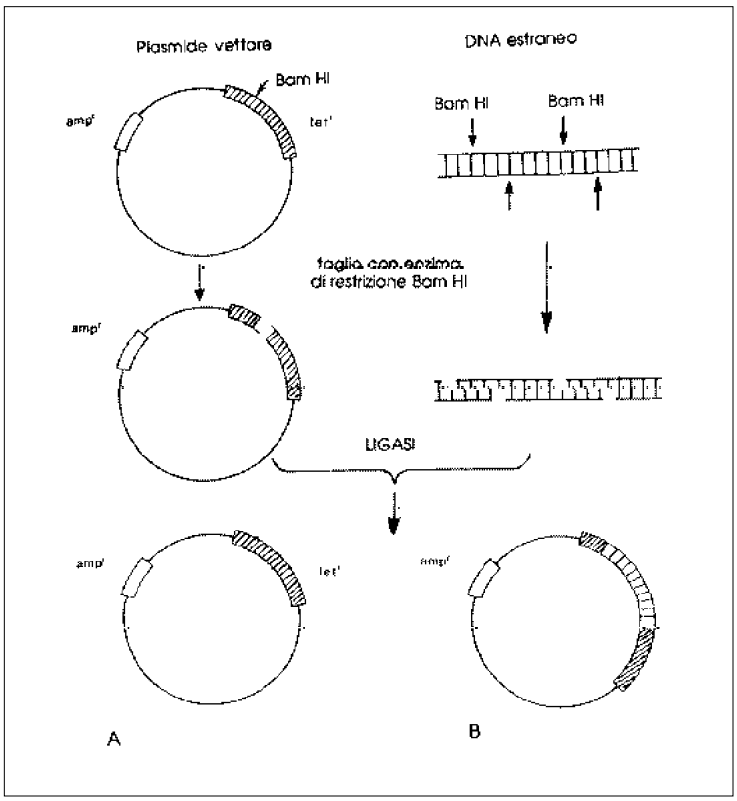


Figura 6. Clonazione del DNA in un vettore plasmidico (pBR322) mediante inserzione nel gene responsabile della resistenza alla tetraciclina (tet^r).

plasmidi ricombinanti; altre, invece, DNA plasmidico che si è ricircolarizzato, durante il legame, senza inserire il DNA estraneo. Per discriminare tra i due tipi di colonie, si inoculano separatamente piastre contenenti ampicillina e piastre contenenti tetraciclina, con alcune colonie, mantenendo invariata nelle due piastre la posizione che esse occupano nella piastra madre.

Le colonie che sopravvivono e crescono in presenza di tetraciclina contengono plasmidi con il gene tet^r attivo ed è quindi improbabile che tali cellule contengano plasmidi ricombinanti.

Le colonie che non crescono in presenza di tetraciclina ma in piastre contenenti ampicillina contengono plasmidi con il gene tet^r inattivo ed è quindi probabile che questi plasmidi portino sequenze di DNA estraneo (Bolivar e al. 1977) (fig.7).

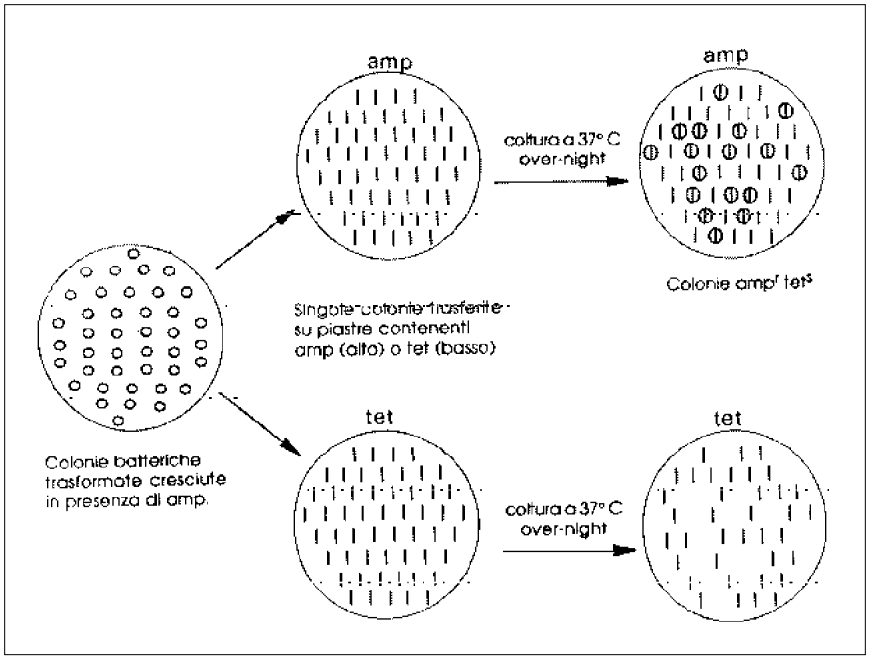


Figura 7. Screening di colonie batteriche trasformate mediante inattivazione per inserzione.

4. Screening mediante ibridazione

E' il metodo più comunemente impiegato per identificare colonie batteriche singole portatrici di plasmidi ricombinanti. Questa tecnica permette di saggiare centinaia di migliaia di colonie contemporaneamente e di riconoscere quelle portatrici di plasmidi chimerici contenenti la sequenza bersaglio. Il metodo consiste nel deporre un filtro di nylon (contrassegnato in tre punti corrispondenti a tre punti sulla piastra) sulla superficie dell'agar di una piastra su cui sono cresciute le colonie batteriche da esaminare (fig.8).

In questo modo le colonie batteriche vengono trasferite dall'agar al filtro di nylon, che viene poi rimosso e trattato in modo da lisare le cellule batteriche ed esporre, così, il DNA plasmidico. Si effettua quindi un'ibridazione degli acidi nucleici utilizzando una sonda specifica per la sequenza ricercata. (Grunstein e Hogness, 1975) Un altro tipo di sistema vettore è rappresentato dai fagi. Il fago è un virus batterico, costituito da una molecola lineare di DNA, cosicché un singolo taglio di restrizione genera due frammenti che vengono uniti al DNA estraneo per generare un fago chimerico (fig.9).

La procedura per isolare i geni del fago chimerico consiste nel permettere al fago di effettuare un ciclo litico e quindi di produrre una progenie di particelle virali contenenti il DNA ibrido. (Murray e Murray, 1974) Questa tecnica offre il vantaggio di un isolamento conveniente dei genomi chimerici, ma impone un limite alle dimensioni del

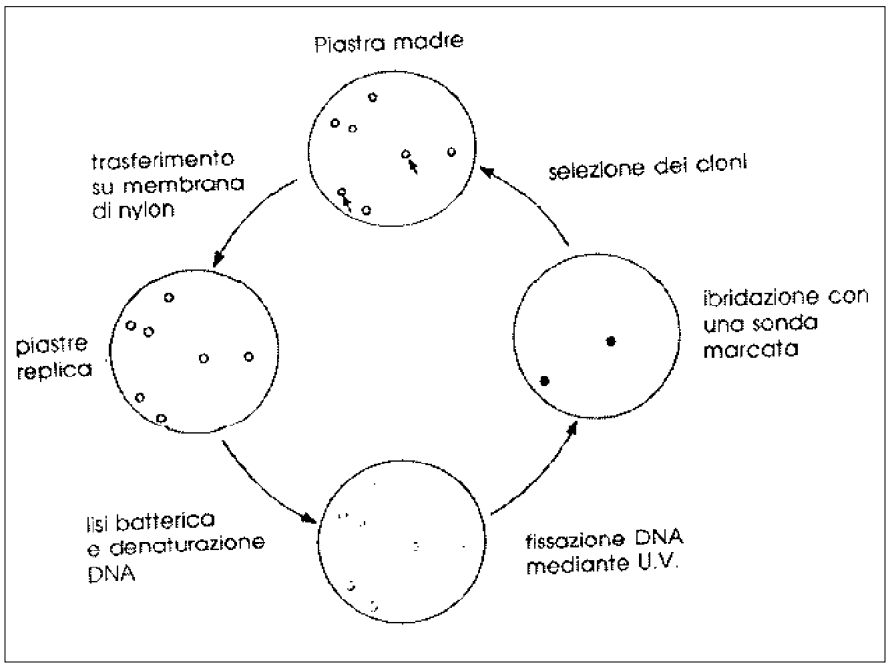


Figura 8. Screening di colonie batteriche trasformate mediante ibridazione degli acidi nucleici.

DNA da clonare, perché la capacità limitata della testa del fago impedisce ai genomi troppo lunghi di essere incapsidati nelle particelle virali della progenie.

Per ovviare a questo inconveniente, invece di limitarsi ad inserire materiale addizionale nel genoma fagico, si può sostituire un frammento del vettore, che non porta alcun gene fagico essenziale, con il frammento di DNA da clonare (Rambach e Tiollais, 1974).

L'utilità di questo tipo di vettore è stata recentemente incrementata dallo sviluppo di sistemi che permettono l'incapsidazione del DNA nella testa del fago in vitro (Sternberg e al. 1977).

Un tentativo di combinare alcuni dei vantaggi presentati dalla clonazione del DNA in plasmidi con quelli della clonazione in fagi, ha portato alla costruzione di un altro tipo di vettori, i cosiddetti cosmidi.

Si tratta di plasmidi nei quali sono state inserite particolari sequenze di DNA (dette siti cos) che vengono riconosciute dal fago lambda per venire incapsidate nelle particelle virali della progenie fagica (Collins e Hohn, 1975) (fig.10).

I vettori di clonazione fin qui esaminati vengono utilizzati in ospiti batterici; spesso però è utile disporre di ospiti eucarioti. I soli plasmidi eucariotici noti risiedono in alcuni lieviti. Mediante tecniche di ricostruzione del DNA è stato possibile ottenere plasmidi bifunzionali che portano sequenze necessarie per la replicazione sia in ospiti batterici (Escherichia coli) sia in ospiti eucariotici (Saccharomyces cerevisiae). In questo modo un unico vettore può essere utilizzato in entrambi gli ospiti (Burke e al. 1987).

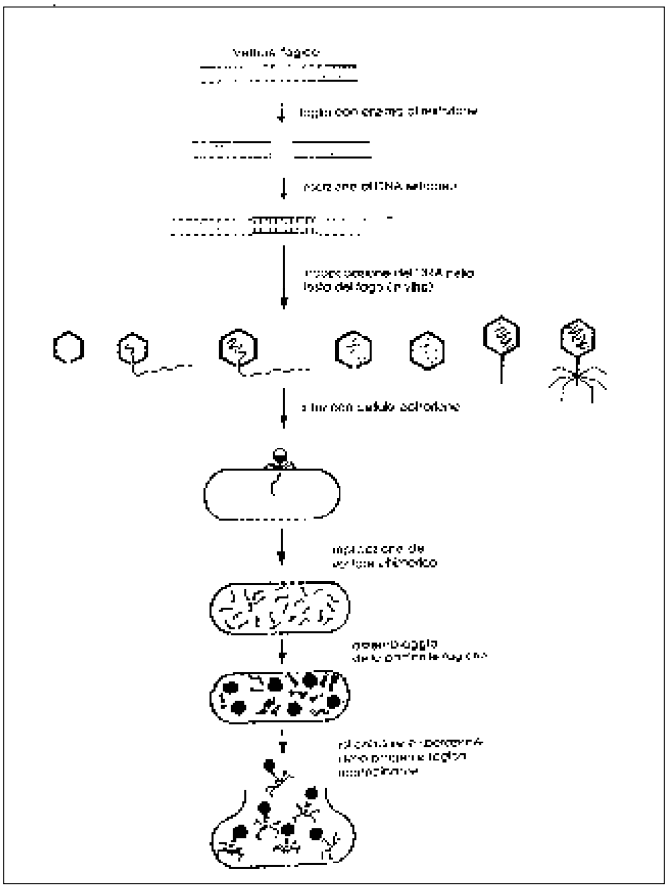


Figura 9. Clonazione del DNA in vettori fagici.

Le sonde a DNA

Un'applicazione fondamentale delle tecniche di clonazione del DNA è rappresentata dalla costruzione di sonde genetiche che permettano l'identificazione e l'isolamento di singoli geni direttamente dal materiale genetico (Swaminathan e Prakash, 1989).

Ciascun particolare gene rappresenta solo una porzione molto limitata di un genoma, quindi, per identificarlo, è necessario disporre di una sonda specifica che reagisca solo con la sequenza particolare cui si è interessati e che sia in grado di distinguerla all'interno di un grande eccesso di altre sequenze. La tecnica usualmente utilizzata a questo scopo comporta l'impiego di una sonda di DNA marcata ed il rilevamento della sua ibrida-

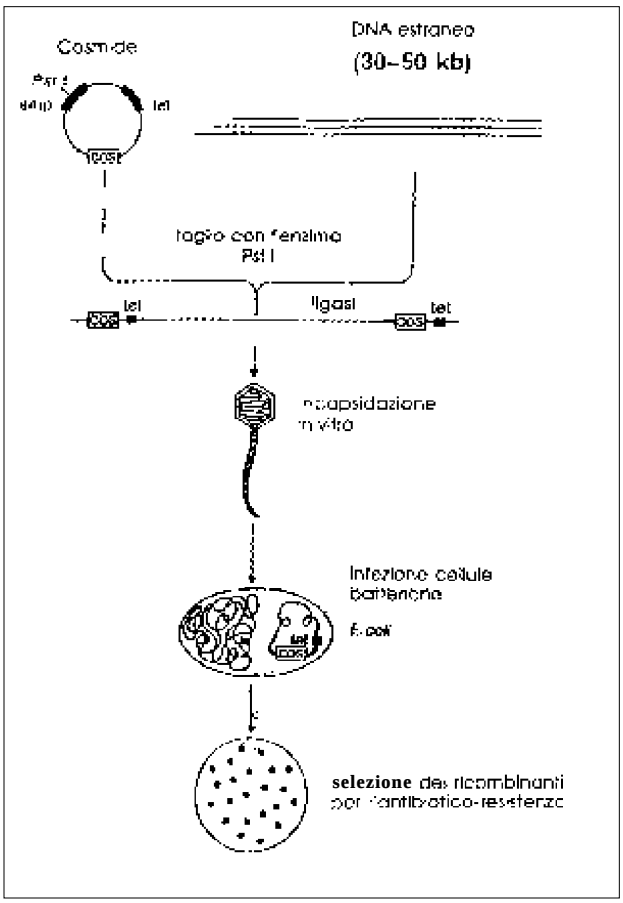


Figura 10. Clonazione del DNA in cosmidi.

zione con il gene in questione. Le sonde genetiche sono costituite da sequenze di DNA (o RNA) complementari a quelle ricercate e vengono costruite mediante clonazione del DNA in vettori genetici, oppure per sintesi a partire da desossinucleotidi trifosfati. Tali sonde presentano dimensioni variabili dall'oligomero a frammenti di alcune migliaia di nucleotidi; possono essere costituite da DNA (o RNA) a singolo filamento o da DNA bicatenario. Mentre le sonde a DNA monocatenario vengono ottenute per clonazione utilizzando come vettori fagi filamentosi (con genoma a DNA monocatenario), le sonde di DNA bicatenario vengono ottenute per clonazione in plasmidi, in fagi con genoma a DNA bicatenario e in cosmidi, a seconda delle dimensioni del frammento di DNA da veicolare.

Le sonde inoltre devono essere dotate di un sistema di rivelazione che è determinante per la sensibilità della sonda.

Metodi di marcatura delle sonde

I metodi di marcatura delle sonde a DNA prevedono l'incorporazione di nucleotidi marcati (per modificazione chimica o per accoppiamento ad una molecola enzimatica) nel DNA sonda mediante reazioni enzimatiche (Tchen e al. 1984; Jablonski e al. 1986).

1. Fosforilazione dell'estremo 5'

Questa reazione prevede il trasferimento di un gruppo fosfato di una molecola di adenosin-trifosfato (ATP) al gruppo ossidrile del nucleotide all'estremo 5' del DNA sonda. Tale reazione viene catalizzata dall'enzima T4 polinucleotide cinasi (Maniatis e al. 1989a) (Fig. 11).

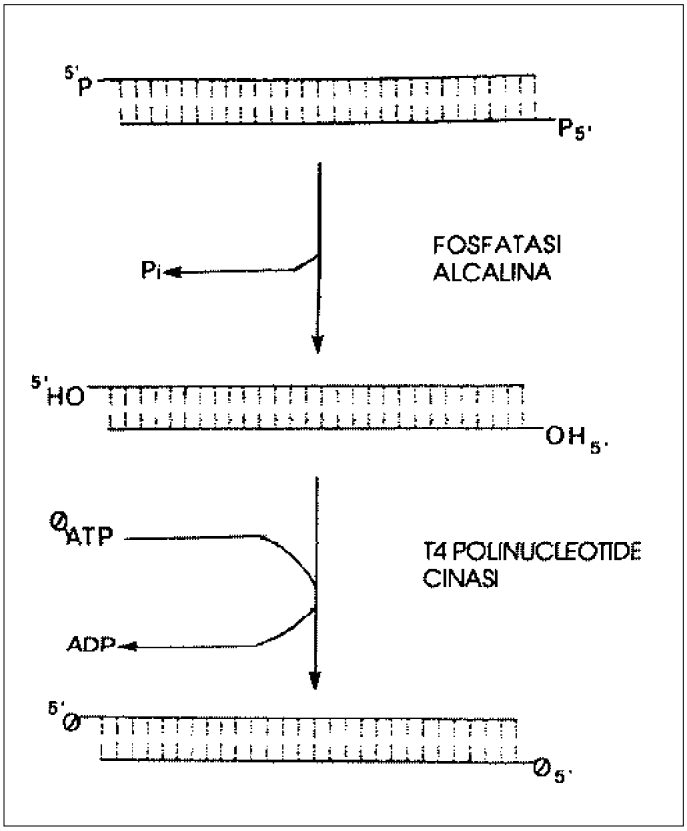


Figura 11. Marcatura del DNA sonda mediante fosforilazione diretta dell'estremo 5' (Ø molecola marcante).

2. Marcatura dell'estremo 3'

In questa reazione, catalizzata dall'enzima tranferasi terminale, si ha l'aggiunta di dNTP marcati al gruppo ossidrile del nucleotide all'estremo 3' del DNA sonda (Maniatis e al. 1989a) (Fig.12).

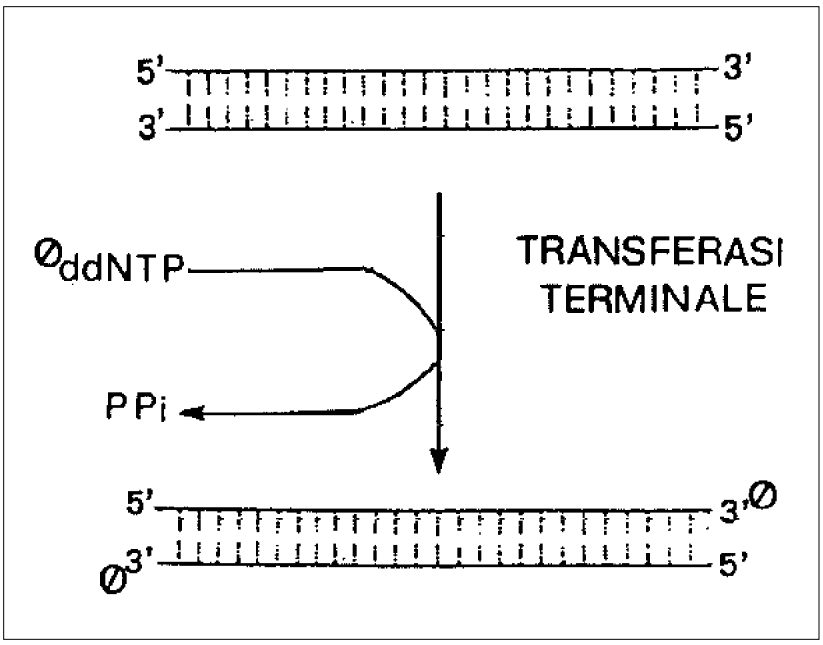


Figura 12. Marcatura dell'estremo 3' del DNA sonda (Ø molecola marcante).

3. Nick-translation

Questa tecnica di marcatura prevede l'impiego dell'enzima DNA polimerasi I di E.coli per sostituire nucleotidi di un DNA sonda bicatenario con nucleotidi marcati (Rigby e al. 1977) (Fig.13).

4. Random primer

Questo metodo di marcatura prevede la neosintesi di un filamento di DNA marcato a partire da una molecola di DNA sonda bicatenario che funge da stampo. L'enzima Klenow (un frammento della DNA polimerasi I di E.coli) catalizza tale reazione in presenza di una miscela di esanucleotidi random, che fungono da innesco, e dei 4 dNTP (dei quali uno è marcato) (Feinberg e Vogelstein, 1984) (Fig. 14).

La marcatura con radioisotopi fornisce le sonde più sensibili (sonde calde), in quanto la loro sensibilità dipende esclusivamente dalla radioattività specifica del radionuclide

Fig.15 M

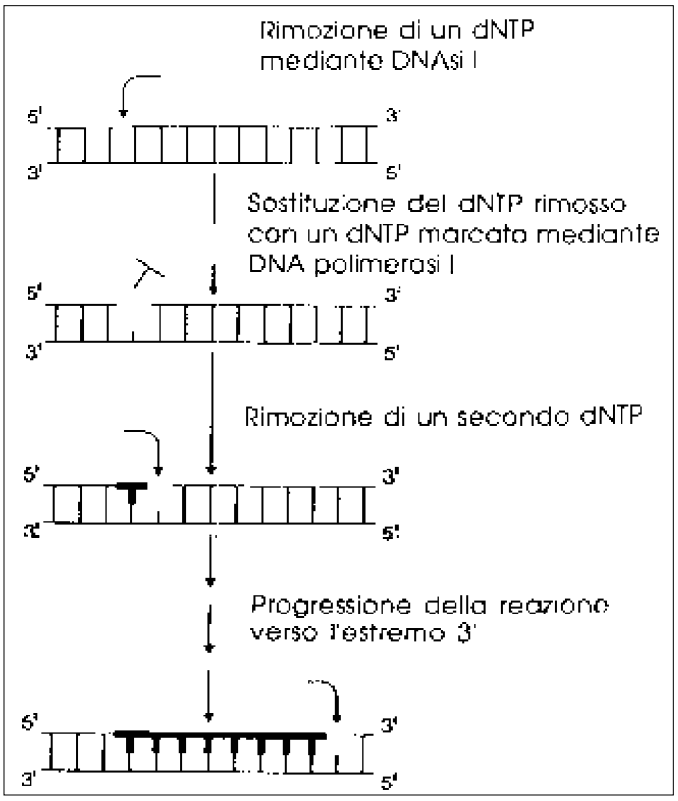


Figura 13. Marcatura del DNA sonda mediante tecnica di nick-translation.

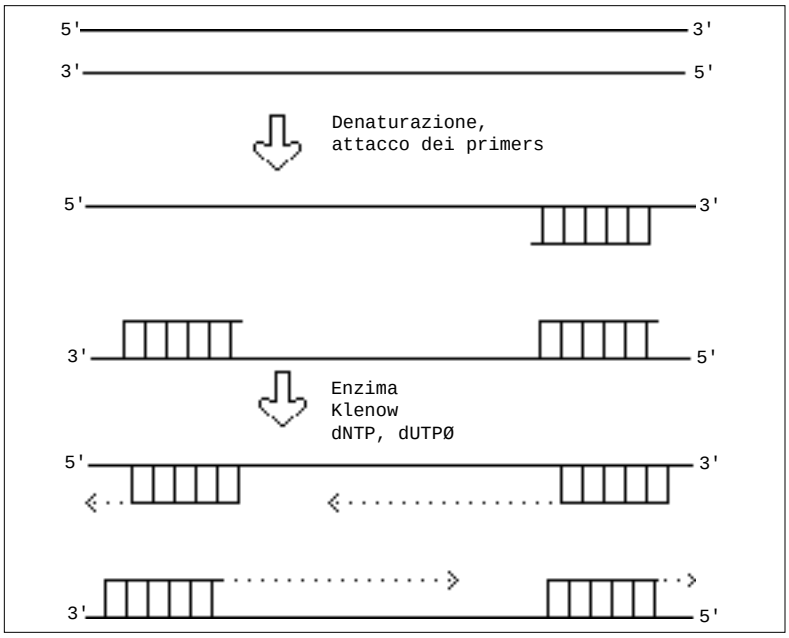


Figura 14. Marcatura del DNA sonda mediante tecnica di random primer.

incorporato. Utilizzando, per esempio, nucleotidi marcati con ^{32}P ad elevata attività specifica, si possono ottenere sonde in grado di rivelare quantità di DNA bersaglio inferiori al picogrammo (Kelly e al. 1970; Maniatis e al. 1975). Esistono tuttavia numerosi svantaggi e rischi nell'uso di sonde calde, che comprendono gli alti costi, i pericoli legati alla radioattività, le difficoltà nel maneggiare queste sonde e, soprattutto, data la breve emivita del ^{32}P, l'impossibilità di conservarle per lunghi periodi. Queste considerazioni hanno portato allo sviluppo di metodi di marcatura alternativi che non prevedono l'uso di traccianti radioisotopici. Le sonde marcate con traccianti non radioisotopici sono dette sonde fredde e sono tuttora oggetto di continui perfezionamenti e sviluppi; in questa sede ci si limiterà a considerare i tipi maggiormente sperimentati. Alcuni Autori hanno modificato chimicamente i nucleotidi (in posizione 5 dell'anello pirimidinico) in modo da introdurre in essi una molecola di biotina (fig.15).

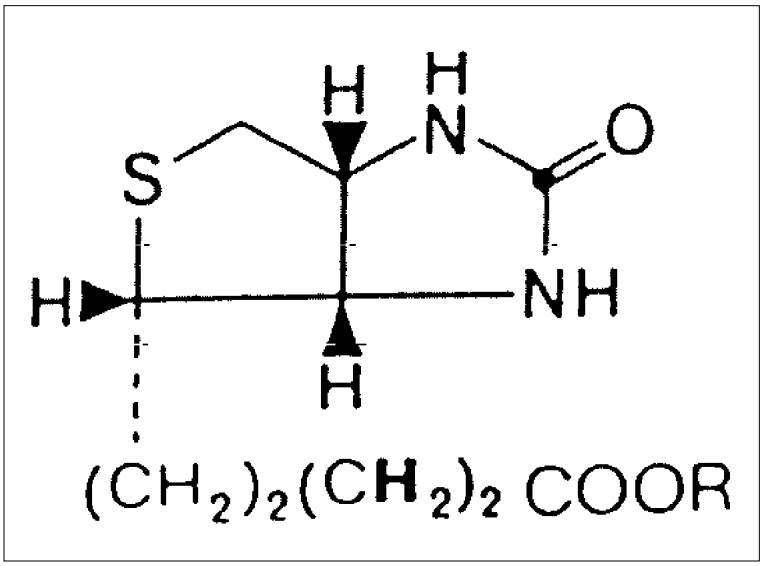


Figura 15. Molecola di D-biotina.

Questa vitamina viene legata al nucleotide mediante un braccio spaziatore, le cui dimensioni ottimali sono 11 atomi di carbonio, necessario per ridurre l'ingombro sterico della biotina (Brigati e al. 1983). Il nucleotide biotinilato, così ottenuto, viene poi introdotto, per via enzimatica, nel DNA sonda. Sempre per via enzimatica sono stati introdotti in sonde a DNA, nucleotidi recanti molecole di bromo desossiuridina trifosfato (BrdUTP) (Sakamoto e al. 1987).

Un'altra tecnica utilizzata per marcare le sonde genetiche si basa sulla modificazione chimica della molecola di acido nucleico introducendo un gruppo sulfonico in posizione C6 dei residui citidinici (sonde solfonate) oppure legando N-acetossi-N-2- acetilaminofluorene in posizione C8 dei residui guanidinici (Tchen e al. 1984). Recentemente è stata realizzata, per modificazione chimica di nucleotidi pirimidinici, la marcatura di sonde genetiche con digossigenina, un alcaloide di origine vegetale (fig.16).

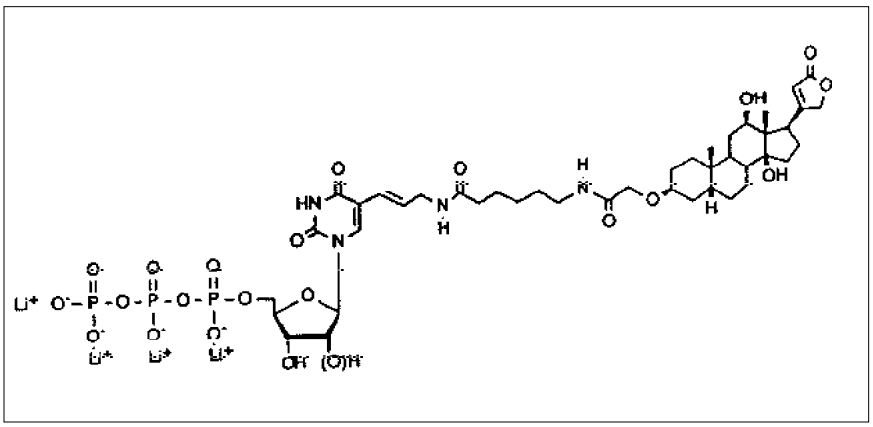


Figura 16. Molecola di digossigenina.

I nucleotidi così marcati vengono poi introdotti enzimaticamente nel DNA sonda. Altri Autori hanno ottenuto sonde genetiche coniugando il DNA con enzimi quali fosfatasi alcalina o perossidasi (Renz e Kurz, 1984). Le sonde fredde così ottenute possono essere utilizzate con le stesse modalità di quelle marcate con radioisotopi con il solo accorgimento di non denaturarle con alcali, se i legami che portano il tracciante sono sensibili, o di non denaturarle affatto se sono coniugate con enzimi. In quest'ultimo caso è necessario che le sonde siano a singolo filamento.

Le sonde ad RNA

La tecnica utilizzata per la costruzione di sonde ad RNA è rappresentata dalla sintesi di molecole di RNA monofilamento, mediante trascrizione in vitro di DNA stampo bicatenari, per mezzo di RNA polimerasi-DNA dipendenti di origine fagica (Melton e al. 1984; Schenborn e Mierendorf, 1985) (fig.17).

La sintesi di sonde ad RNA monocatenario è stata resa possibile dallo sviluppo di vettori plasmidici contenenti polilinkers localizzati a valle di promotori di origine fagica (derivati dal batteriofago SP6 di Salmonella typhymurium o dai batteriofagi T3 e T7 di Escherichia coli) (Green e al. 1983; Studier e Rosenberg, 1981; Davanloo e al. 1984). Questi promotori vengono riconosciuti specificamente da RNA polimerasi—DNA dipendenti codificate dai rispettivi batteriofagi. Sebbene queste RNA-polimerasi siano simili dal punto di vista biochimico, ciascuna di esse presenta una diversa specificità per il proprio promotore e non utilizza promotori riconosciuti da altre polimerasi (Chamberlin e Ryan, 1982; Tabor e Richardson, 1985).

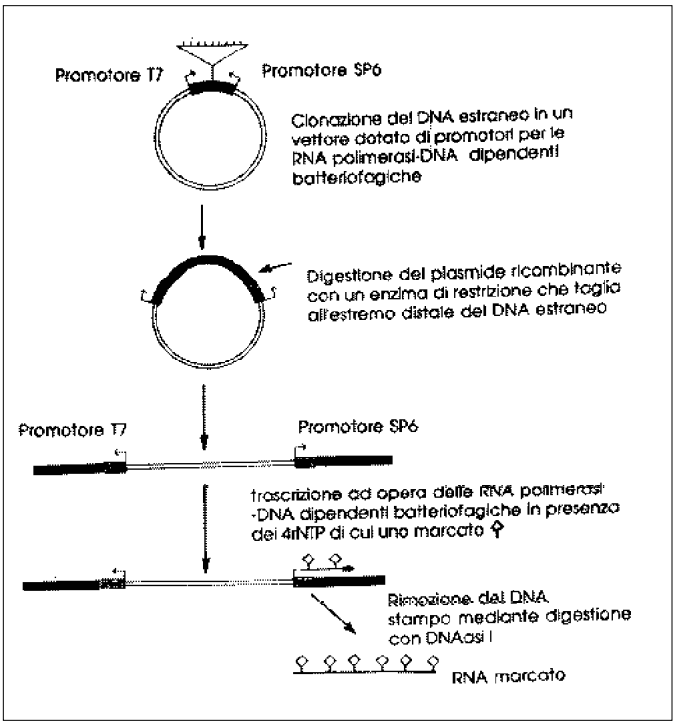


Figura 17. Sintesi di sonde ad RNA mediante trascrizione in vitro.

Inoltre questi enzimi fagici non riconoscono promotori batterici, plasmidici o eucariotici in sequenze di DNA clonato; iniziano la sintesi di RNA ad una velocità molto bassa, trascrivendo tratti omopolimerici di almeno 30 nucleotidi in lunghezza e sono in grado di trascrivere in vitro lunghi segmenti di DNA clonato. Così, quando un plasmide linearizzato viene incubato in vitro con l'appropriata RNA polimerasi-DNA dipendente, ed i quattro ribonucleotidi trifosfato (rNTP), la sintesi dell'RNA viene iniziata dal promotore fagico. I trascritti, che terminano alla fine della molecola lineare di DNA, sono complementari ad uno solo dei due filamenti stampo e possono essere utilizzati come sonde specifiche per un filamento, in reazioni di ibridazione. Gli RNA generati mediante trascrizione in vitro presentano alcuni vantaggi rispetto alle sonde di DNA:

- ibridano con il loro bersaglio in modo molto più efficiente;
- poiché i filamenti di DNA usati come stampo possono essere trascritti varie volte, la quantità di RNA prodotta supera di svariate volte il peso del DNA stampo, quindi la resa quantitativa di queste sonde è nettamente superiore;
- le RNA polimerasi-DNA dipendenti funzionano efficacemente in vitro in presenza di basse concentrazioni di rNTP (1-20 μM), cosicché è possibile sintetizzare sonde di RNA a costi relativamente bassi;

- le sonde ad RNA possono essere separate dal DNA stampo mediante un semplice trattamento con DNAsi I e non necessitano, quindi, di purificazione mediante elettroforesi in gel;

- data l'elevata stabilità intrinseca degli ibridi che coinvolgono l'RNA, le sonde ad RNA forniscono, generalmente, nelle reazioni di ibridazione, segnali molto più intensi delle sonde a DNA. (Casey e Davidson, 1977).

Vettori plasmidici per la costruzione di sonde ad RNA

Sono attualmente disponibili numerosi vettori plasmidici che recano un promotore di origine fagica adiacente ad un polilinker (es: pSP64 e pSP65) ed altri vettori che contengono due diversi promotori fagici arrangiati in orientamenti opposti e separati dal polilinker (es: pGEM)(Melton e al. 1984) (fig.18); grazie all'elevata specificità delle

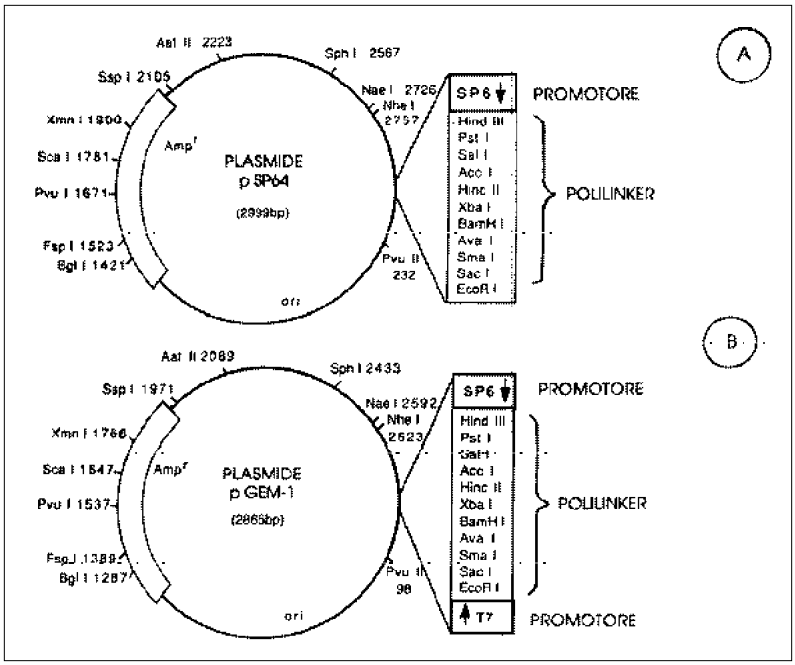


Figura 18. Mappe geniche dei vettori plasmidici pSP64 (a)e pGEM (b). In figura sono rappresentati i geni per la resistenza all'ampicillina, i promotori fagici SP6 e T7 ed i polilinkers.

polimerasi fagiche per i propri promotori, questi vettori possono essere impiegati per generare sonde ad RNA monocatenario complementari all'uno o all'altro filamento di DNA estraneo. Sono disponibili inoltre plasmidi molto complessi (pGEM 3Zf) che, oltre ai promotori fagici ed il polilinker, contengono la regione del gene lac Z di E. coli, che codifica per l'α-peptide della β-galattosidasi e/o l'origine di replicazione di un fago filamentoso (fig.19).

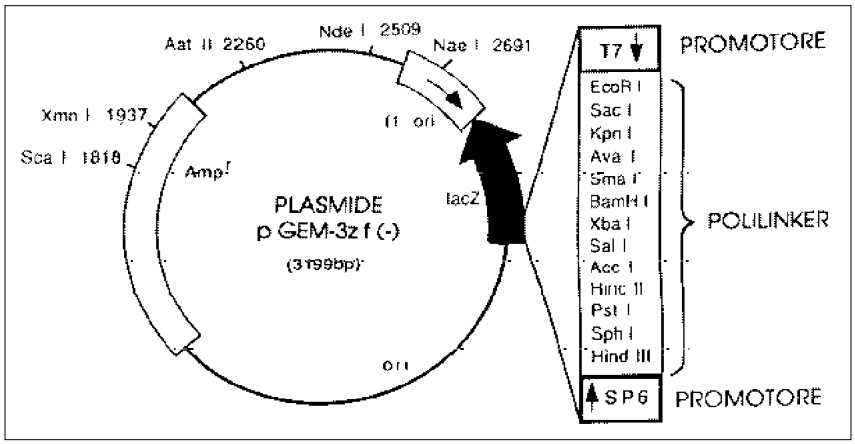


Figura 19. Mappa genica del plasmide pGEM-3Zf(-). In figura sono rappresentati i geni per la resistenza all'ampicillina (amp^r), i promotori fagici SP6 e T7,il polilinker ed i geni dell'operatore lacZ.

L'inserzione di sequenze di DNA estraneo nel polilinker si evidenzia, in questo caso, con la soppressione dell'α-complementazione e quindi con la comparsa di colonie di colore bianco in piastre di agar contenenti il substrato cromogeno 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galattoside (X-gal).

Nella scelta del vettore da utilizzare per costruire sonde ad RNA, è importante considerare che, se si desidera ottenere i trascritti da entrambi i filamenti del DNA stampo, è meglio utilizzare un plasmide dotato di due diversi promotori, piuttosto che inserire il DNA stampo con due diversi orientamenti, in plasmidi dotati di un singolo promotore. E' importante considerare, inoltre, la disposizione dei siti di restrizione all'interno del DNA stampo e a valle di questo; infatti, mentre l'estremo 5' dei trascritti viene definito dal promotore, l'estremo 3' viene determinato dal sito di taglio dell'enzima di restrizione.

Quindi è possibile sintetizzare numerose sonde diverse a partire da un singolo plasmide ricombinante, utilizzando diversi enzimi di restrizione, tenendo presente, però, che l'eventuale presenza di sequenze plasmidiche può determinare un aumento del fondo nelle reazioni di ibridazione. Per ovviare a questo inconveniente è sufficiente utilizzare un plasmide dotato di un sito di restrizione a valle della regione del polilinker.

Costruzione di sonde genetiche mediante sintesi di oligonucleotidi

Un'alternativa alla tecnica di clonazione del DNA, nella costruzione di sonde genetiche, è rappresentata dalla produzione di oligonucletidi sintetici (Maniatis e al. 1989a; Thein e Wallace,1986).

La sintesi di oligonucleotidi viene attuata per assemblaggio di nucleotidi trifosfati su supporti solidi (gel di silice, vetro poroso, copolimeri di polistirene), mediante un metodo derivato per modificazione dalla sintesi su fase solida di polipeptidi.

In passato la fase più critica della sintesi chimica di oligonucleotidi era rappresentata dalla preparazione dei reagenti e dei nucleotidi trifosfati "protetti". Attualmente questi problemi sono stati ovviati grazie alla disponibilità in commercio di tali reagenti chimici ed all'avvento di sistemi di sintesi completamente automatizzati (sintetizzatori di oligonucleotidi) che sono in grado di produrre millimoli di oligonucleotidi di lunghezza non superiore a 70-100 basi.

Le sonde costituite da oligonucleotidi (fino a 70 basi) vengono marcate solitamente mediante una reazione di fosforilazione dell'estremo 5', con adenosin-trifosfato (ATP) legato al tracciante desiderato, catalizzata dall'enzima polinucleotide cinasi del fago T4 (Maniatis e al. 1989a) (Fig. 11).

Sonde oligonucleotidiche di dimensioni superiori alle 100 basi possono essere realizzate a partire da due oligonucleotidi che contengano sequenze complementari nei loro estremi 3' (Derync e al. 1984; Betsholtz e al. 1986).

Questi oligonucleotidi vengono appaiati per le loro sequenze complementari, quindi si provvede al completamento delle sequenze monocatenarie con nucleotidi marcati.

Se necessario, prima della reazione di completamento, si può marcare anche l'estremo 5' per fosforilazione. Per i dettagli tecnici delle reazioni chimiche implicate nella sintesi degli oligonucleotidi si rimanda a letture specializzate (Narang e al. 1983; Itakura e al. 1984).

E' utile ricordare, però, che, dati i costi elevati delle attrezzature per la sintesi e la successiva purificazione degli oligonucleotidi, non tutti i laboratori sono in grado di realizzare sonde oligonucleotidiche se non rivolgendosi a ditte chimico-farmaceutiche che sintetizzano, su ordinazione, qualsiasi oligonucleotide a costi relativamente accessibili.

Ibridazione degli acidi nucleici

L'identificazione di specifiche sequenze di DNA o di RNA per mezzo di sonde genetiche viene realizzata mediante ibridazione degli acidi nucleici: si tratta di una reazione basata sulla proprietà di una sequenza nucleotidica monocatenaria di formare duplex stabili in presenza di sequenze complementari.

Se i due acidi nucleici, che devono essere ibridati, sono bicatenari, devono essere prima denaturati, cioè dissociati nei singoli filamenti che li compongono. Dopodichè i filamenti bersaglio e quelli sonda vengono fatti riassociare in molecole bicatenarie.

Vari fattori influiscono sulla reazione di ibridazione, alterando la velocità di formazione e la stabilità delle molecole bicatenarie; tra questi la temperatura di denaturazione del DNA, la concentrazione salina del mezzo ed il grado di omologia tra le sequenze del DNA test e sonda.

Denaturazione del DNA

La struttura a doppia elica della molecola del DNA è dovuta alla presenza di legami ad idrogeno tra le basi complementari e può essere distrutta dal calore; siccome non esistono legami covalenti che uniscano i due filamenti complementari, le due catene polinucleotidiche di un DNA bicatenario si separano completamente quando tutti i legami ad idrogeno vengono scissi.

Il processo di separazione delle due catene complementari, cioè la denaturazione o fusione del DNA, avviene in un ambito di temperature abbastanza ristretto e si riflette in notevoli cambiamenti di alcune proprietà fisiche del DNA.

Un cambiamento, particolarmente utile ai fini sperimentali, si osserva nella densità ottica: gli anelli eterociclici dei nucleotidi assorbono luce ultravioletta con un massimo a 260 nm, caratteristico per ciascuna base (Lewin, 1990).

L'assorbimento di luce ultravioletta del DNA in forma duplex è, però, circa il 40% in meno rispetto all'assorbimento mostrato da una miscela di nucleotidi liberi; questo fenomeno, detto effetto ipocromico, diminuisce ogniqualvolta ci si allontani dallo stato di duplex e si riflette in un aumento della densità ottica.

Alla luce di queste osservazioni la denaturazione del DNA può essere seguita valutando la comparsa del fenomeno inverso, cioè dell'effetto ipercromico. Il valore medio dell'intervallo di temperatura in cui i due filamenti si denaturano è detto temperatura di fusione (Tm) (Marmur e Doty, 1961) (fig.20).

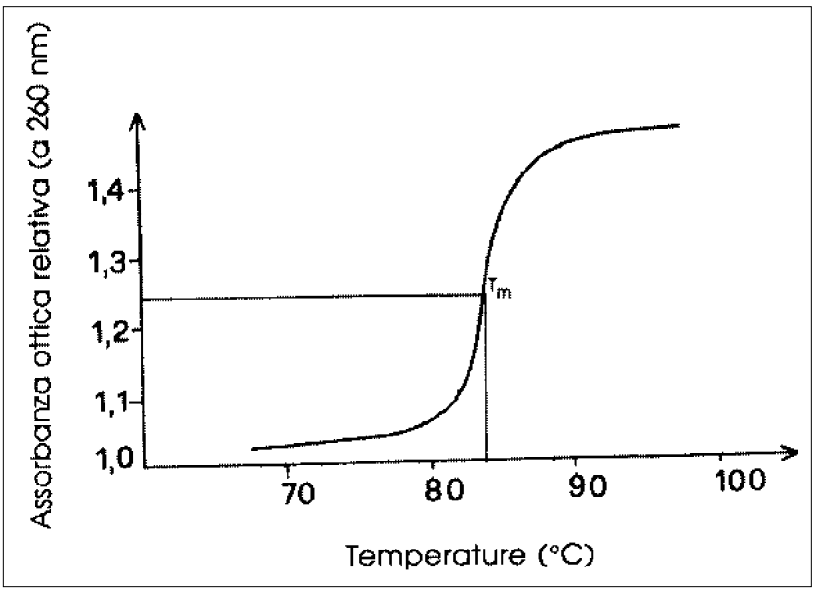


Figura 20. La denaturazione del DNA può essere seguita osservando l'aumento di densità ottica (effetto ipercromico). Il punto di mezzo della curva rappresenta la tamperatura di denaturazione del DNA (Tm).

La curva di denaturazione assume sempre la stessa forma, ma la sua posizione sulla scala delle temperature (cioè Tm) è influenzata sia dalla composizione in basi del DNA, sia dalle condizioni usate per ottenere la denaturazione.

Quando il DNA è in soluzione, in condizioni approssimativamente fisiologiche, il valore di Tm varia solitamente da 85° C a 95° C. Questo valore dipende dalla composizione in basi. La maggior energia libera di formazione delle coppie guanina-citosina (GC), con tre legami ad idrogeno, le rende più resistenti alla denaturazione rispetto alle coppie adenina-timina (AT) con due legami ad idrogeno (Bautz e Bautz, 1964; Kotaka e Baldwin, 1964).

La dipendenza della Tm dalla composizione in basi è lineare: essa aumenta di circa 0,4° C per ogni incremento percentuale del contenuto di GC; così un DNA che sia costituito per il 40% da GC (tipico dei genomi delle cellule di mammifero) si denaturerà ad una Tm di circa 87° C mentre un DNA con il 60% di GC avrà una Tm di circa 95° C nelle stesse condizioni (Ullmann e McCarthy, 1973).

Un altro effetto rimarchevole sulla Tm è esercitato dalla forza ionica della soluzione di denaturazione.

La temperatura di fusione aumenta di 16,6° C per ogni incremento di 10 volte della concentrazione di cationi monovalenti (Na^+) (Marmur e Lane, 1960).

Comunemente la reazione viene condotta in tampone citrato 0,12 M che dà una concentrazione in cationi Na^+ pari a 0,18 M.

La Tm può essere variata notevolmente effettuando la reazione in presenza di reagenti che destabilizzino i legami ad idrogeno (es: formamide) (Schmeckpeper e

Smith, 1972; Legault-Demare e al. 1967; Bonner e al. 1967; Hutton, 1977) ; ciò permette di ridurre la Tm fino ad un valore di 40-42° C e presenta il vantaggio che il DNA non va incontro a danni intrinsechi (quali ad es: la rottura dei filamenti) dovuti alla elevata temperatura.

In condizioni appropriate, le due catene complementari separate possono riassociarsi per riformare una molecola bicatenaria stabile.

Questo fenomeno detto, rinaturazione, dipende dalla specificità di accoppiamento delle basi nelle due catene complementari.

La reazione avviene in due stadi: nel primo, due brevi sequenze complementari, dei filamenti singoli che partecipano alla reazione, si incontrano casualmente e si appaiano per formare una regione a doppia elica. Nel secondo stadio la regione di accoppiamento delle basi si estende lungo la molecola per formare una doppia elica a tutta lunghezza; la ricostituzione della doppia elica è accompagnata dal ritorno alle proprietà fisiche originali, che erano state perdute dal DNA denaturato (Britten e Kohne, 1968) (fig.21).

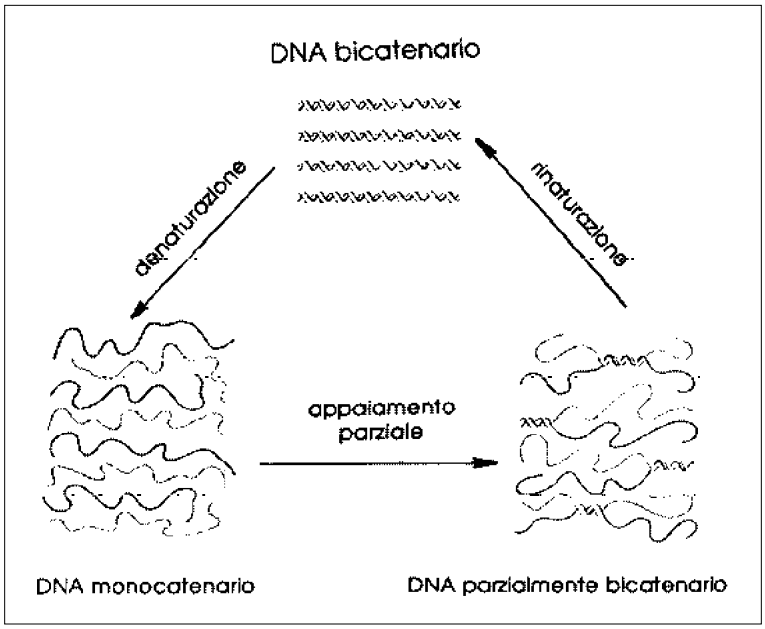


Figura 21. Stadi di denaturazione e riassociazione di molecole di DNA.

La rinaturazione coinvolge due sequenze nucleotidiche complementari che erano state separate dalla denaturazione; questa reazione viene utilizzata anche per permettere a due sequenze complementari di qualunque DNA di legarsi tra loro per formare un duplex stabile; se i due acidi nucleici coinvolti nella reazione sono di origine diversa, la reazione prende il nome di ibridazione.

Il principio della reazione consiste nell'esporre l'una all'altra le due preparazioni di DNA denaturato (quindi i singoli filamenti) e nell'evidenziare l'avvenuta formazione di molecole bicatenarie ibride. Tale reazione può essere condotta in soluzione, su matrice solida o in situ.

a. Ibridazione in soluzione

In questa reazione le preparazioni di DNA denaturato vengono mescolate insieme in soluzione. Per grandi quantità di materiale, la reazione può essere seguita osservando il cambiamento di densità ottica; quando invece sono coinvolte piccole quantità di materiale, si utilizzano sonde marcate, il cui ingresso nelle molecole bicatenarie viene seguito evidenziando la quantità di DNA a doppia elica marcato (Gillespie e Gillespie, 1971).

Questo può essere fatto sia degradando tutti i filamenti singoli che non hanno ibridato, sia separando i filamenti duplex da quelli singoli per cromatografia. Un problema dell'ibridazione in soluzione insorge quando è necessario indagare sulla relazione tra due preparazioni di DNA di cui una o entrambe consistono di molecole duplex.

Infatti se le due diverse preparazioni di DNA duplex vengono denaturate e poste a contatto, si possono avere due tipi di interazione: si può avere la rinaturazione tra filamenti complementari originali, oppure ciascun singolo filamento può ibridare con una sequenza nucleotidica complementare dell'altro, ma, poiché le due reazioni sono in competizione, è difficile stimare il grado di ibridazione (Vogelstein e al. 1977).

b. Ibridazione su matrice solida (o su filtro o dot blot ibridazione)

Per ovviare agli inconvenienti dell'ibridazione in soluzione, una delle preparazioni di DNA (DNA test) viene immobilizzata su un supporto solido. A questo scopo si utilizzano filtri di nylon o filtri di carta alla nitrocellulosa sui quali vengono fatti adsorbire, per filtrazione, i filamenti singoli del DNA test. Si aggiunge poi il DNA sonda, anch'esso previamente denaturato, che rimarrà legato al filtro solo se in grado di ibridare con il DNA test immobilizzato (Gillespie e Spiegelmann, 1966; Denhardt, 1966; Thomas, 1980) (fig.22).

c. Ibridazione in situ

In questa tecnica le sonde di DNA vengono utilizzate per localizzare in situ (in cellule) determinate sequenze di acidi nucleici.

Nelle prime ibridazioni in situ si usavano ibridare acidi nucleici sonda, altamente radioattivi, con cromosomi cellulari, previamente esposti a pH elevati per denaturare il DNA.

Dopo alcuni lavaggi, si mettevano in evidenza le regioni cromosomiche che avevano legato la sonda radioattiva, mediante autoradiografia. Recentemente questa tecnica è stata resa più agevole dall'utilizzazione di sonde fredde (Brigati e al. 1984).

Figura 22. Ibridazione su matrice solida. In figura sono visualizzate diluizioni scalari di un DNA bersaglio ibridate con un DNA sonda marcato con digossigenina.

Sistemi di rivelazione

I metodi di rivelazione degli ibridi con sonde marcate seguono strategie diverse a seconda del tipo di marcante utilizzato.

Per le sonde calde la visualizzazione dell'ibrido avviene tramite autoradiografia.

Per quanto riguarda, invece, le sonde fredde, l'ibrido viene rivelato tramite sistemi enzimatici semplici che trasformano substrati incolori in prodotti colorati che precipitano nel punto stesso in cui è avvenuta l'ibridazione.

In questo caso i metodi di rivelazione utilizzati vengono distinti in metodi indiretti e in metodi diretti. I metodi indiretti utilizzano molecole intermediarie in grado di riconoscere i marcatori fissati sulla sonda. Questo riconoscimento può essere del tipo anticorpo-aptene oppure proteina-coenzima.

A loro volta questi elementi intermedi vengono appaiati ad enzimi di rivelazione (fosfatasi alcalina, perossidasi, β-galattosidasi).

Uno dei sistemi attualmente più usati si basa sul legame tra biotina e avidina (una glicoproteina dell'albume dell'uovo) e consta di due passaggi: nel primo l'ibrido, recante la sonda biotinilata, viene incubato con l'avidina; nel secondo un enzima rivelatore biotinilato viene messo a contatto con il complesso DNA-biotina-avidina, che si è formato (Hsu e al. 1981). Dato che l'avidina possiede più siti di legame per la biotina, legherà più molecole di enzima rivelatore biotinilato (fig.23).

Recentemente l'avidina è stata sostituita dalla streptavidina (proteina di origine batterica) che presenta una maggiore affinità per la molecola della biotina (Leary e al. 1983) (Fig.24).

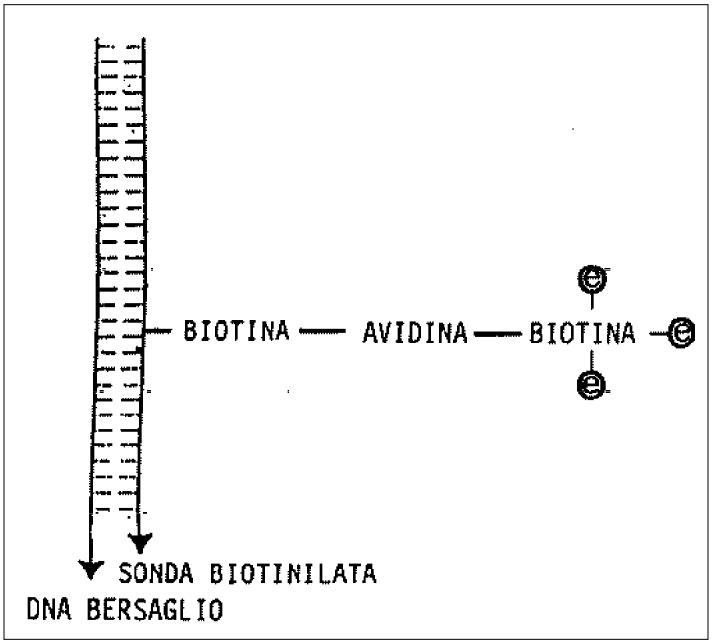


Figura 23. Rivelazione di un ibrido DNA bersaglio-DNA sonda biotinilato mediante avidina. (ⓔ enzima rivelatore)

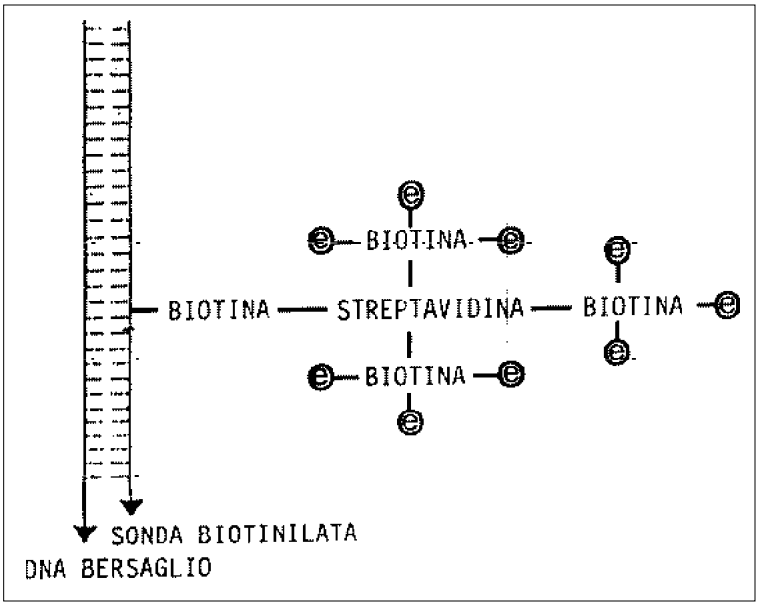


Figura 24. Rivelazione di un ibrido DNA bersaglio-DNA sonda biotinilato mediante streptavidina. (ⓔ enzima rivelatore).

La sensibilità di questo sistema consente di rivelare picogrammi di DNA bersaglio ed è quindi paragonabile alla sensibilità ottenuta con sonde calde. Un ulteriore miglioramento di questa strategia è stato ottenuto tramite incubazione dell'ibrido biotinilato con complessi preformati costituiti da streptavidina-enzima rivelatore biotinilato; ciò ha consentito di ottimizzare il numero di molecole enzimatiche legate per molecola di streptavidina, permettendo di raggiungere sensibilità inferiori al picogrammo (Garbutt e al. 1985; Koch e al. 1986) (fig.25).

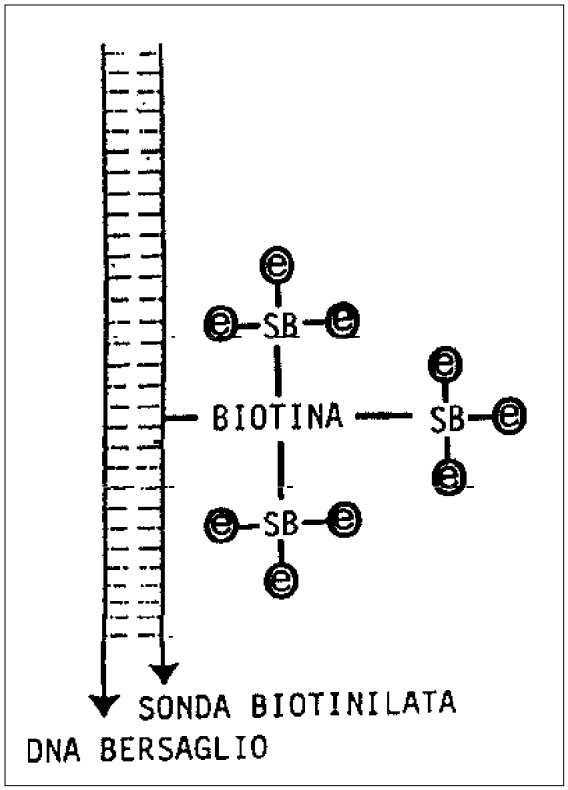


Figura 25. Rivelazione di un ibrido DNA bersaglio-DNA sonda biotinilato mediante un complesso preformato costituito da streptavidina-biotina (SB)-enzima rivelatore (e).

Un altro metodo indiretto di rivelazione prevede il riconoscimento dell'ibrido tramite anticorpi diretti contro la molecola marcante (es. anticorpi antibiotina) (Langer e al. 1981). Quando l'ibrido avrà fissato l'anticorpo monoclonale, si ricerca quest'ultimo tramite un anticorpo biotinilato anti-Ig di topo, che viene evidenziato mediante l'aggiunta di un complesso formato da streptavidina-biotina-perossidasi (o fosfatasi alcalina) (fig.26).

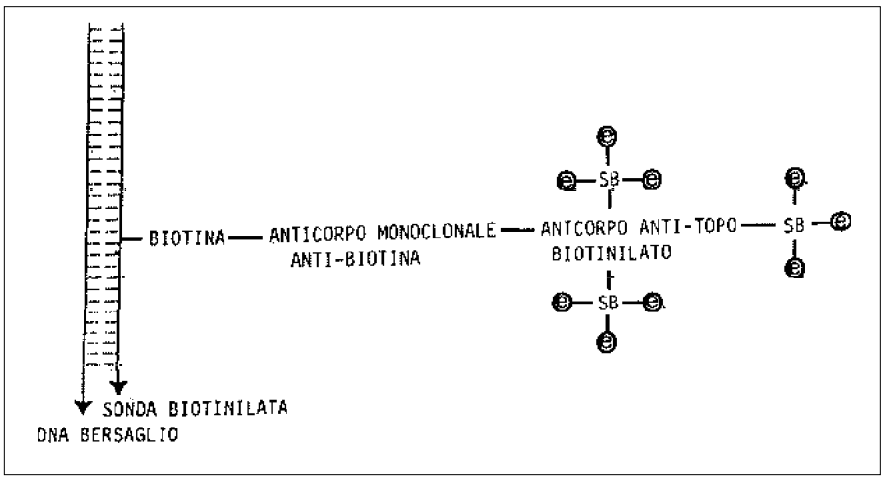


Figura 26. Rivelazione di un ibrido DNA bersaglio-DNA sonda biotinilato mediante impiego di anticorpi monoclonali anti-biotina. (e enzima rivelatore)

Recentemente è stata effettuata la marcatura di sonde genetiche con digossigenina (un aptene steroideo di origine vegetale) e l'avvenuta formazione dell'ibrido con tali sonde, viene evidenziata tramite anticorpi anti-digossigenina coniugati con un enzima rivelatore (Gentilomi e al. 1989) (fig.27).

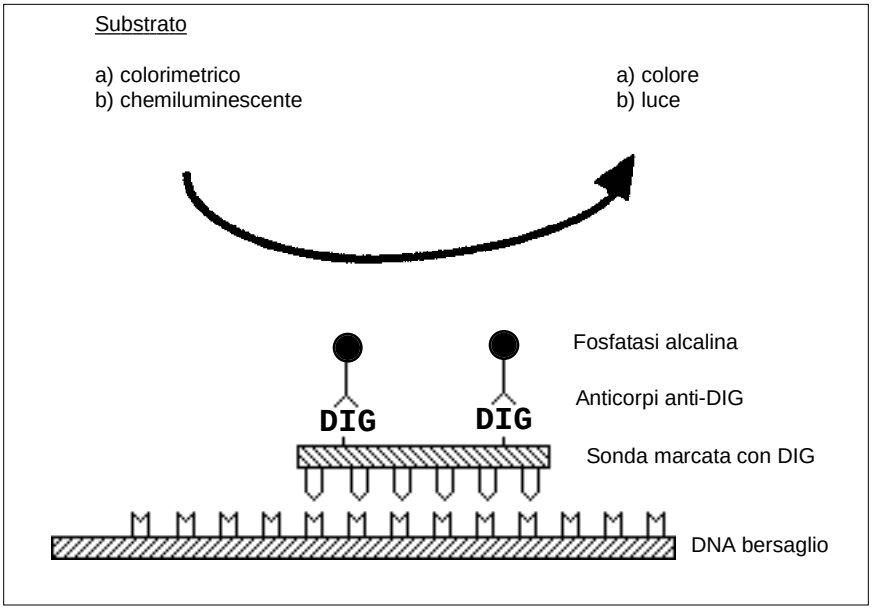


Figura 27. Rivelazione di un ibrido DNA bersaglio-DNA sonda marcato con digossigenina (Dig) mediante anticorpi anti-Dig coniugati con fosfatasi alcalina. In figura sono rappresentati i due tipi di segnali ottenuti impiegando un substrato colorimetrico o un substrato chemiluminescente.

Anche questa tecnica, per la sua sensibilità, è paragonabile ai metodi che impiegano sonde calde. Per quanto riguarda i metodi diretti di rivelazione questi prevedono il legame dell'enzima rivelatore alla sonda. In questi casi però è indispensabile disporre di una sonda a singolo filamento che non necessiti di denaturazione, oppure l'enzima rivelatore, legato alla sonda, deve essere resistente alle condizioni di denaturazione. Di recente introduzione è, inoltre, l'impiego di substrati enzimatici chemiluminescenti come sistemi di rivelazione di ibridi marcati (direttamente o indirettamente) con fosfatasi alcalina o perossidasi. Un esempio di tali sostanze è rappresentato dall'AMPPD (3-2'-spiroadamantano-4-metossi-4-3'-fosforilossi-fenil-1,2 diossietano), che viene de-fosforilato in presenza di fosfatasi alcalina dando origine ad un intermedio altamente instabile che si decompone con emissione di energia luminosa (Musiani e al. 1991b) (fig.28).

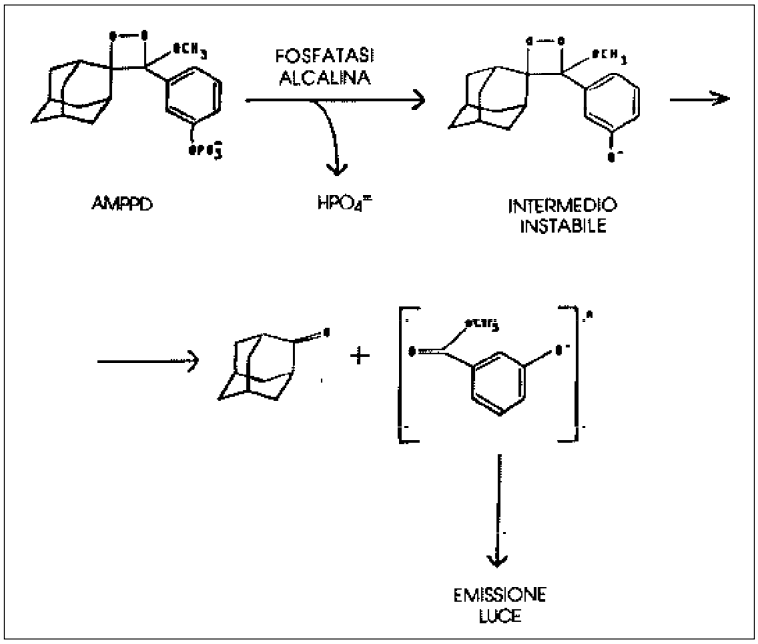


Figura 28. Amplificazione del segnale di ibridazione mediante impiego di substrati chemiluminescenti (AMPPD).

L'intensità del segnale luminoso (rivelato mediante impressione di una pellicola fotografica o mediante un luminometro) è direttamente proporzionale al numero di molecole di fosfatasi alcalina implicate nella reazione. L'amplificazione del segnale di ibridazione si riflette in un notevole incremento della sensibilità che, in condizioni ottimali, può raggiungere valori dell'ordine di 0,03-0,01 pg.

Metodi di amplificazione

Alcuni Autori hanno ideato sistemi di amplificazione da introdurre nello schema generale d'uso delle sonde genetiche, dimostrando che è possibile intervenire a diversi livelli:

1) si può arricchire la quantità di DNA bersaglio presente nel materiale in esame utilizzando una tecnica nota come polymerase chain reaction (PCR);

2) si possono utilizzare due diverse sonde nello stesso saggio di ibridazione. Le strategie utilizzate a questo scopo sono: l'ibridazione a sandwich e l'ibridazione a strand displacement.

Polymerase chain reaction

In questa tecnica di amplificazione si utilizza una DNA polimerasi (Taq polimerasi) resistente a temperature molto elevate (97° C) ed in grado di funzionare fino ad una temperatura di 65° C (Innis e al. 1989). In questo modo il campione di partenza viene riscaldato, per qualche secondo, a 96° C in modo da denaturare il DNA presente nel campione stesso. A questo punto si aggiunge una miscela contenente quattro desossinucleotidi trifosfati e due primers, cioè brevi sequenze nucleotidiche complementari a due diverse regioni del DNA bersaglio (con funzione di inneschi della reazione enzimatica), e si abbassa la temperatura a 55° C. Se il DNA bersaglio è presente nel campione, esso ibriderà con i primers, e le zone a doppia elica così formatesi, serviranno da innesco per la Taq polimerasi. Questo enzima inizierà la sua attività catalitica di trascrizione sintetizzando due nuovi filamenti per ogni molecola di DNA bersaglio originaria. Dopo qualche minuto la temperatura viene nuovamente portata a 96° per consentire la denaturazione del DNA neoformato e si riprende con un altro ciclo (Fig.29).

In questo modo ad ogni ciclo di replicazione corrisponde un'amplificazione del substrato ricercato secondo una potenza di due. (Saiki e al. 1988) Questa tecnica di recente introduzione è dotata di una sensibilità talmente elevata che permette l'amplificazione di una singola molecola di DNA (Mullis e al.1986; Mullis e Faloona, 1987). Esistono comunque numerose variabili delle quali bisogna necessariamente tener conto ai fini di una buona riuscita della P. C. R.:

1) Concentrazione di Taq polimerasi

La concentrazione di questo enzima può oscillare tra 1 e 2,5 unità (U) per 100 µl di miscela di reazione. Si raccomanda comunque di saggiare diverse concentrazioni di enzima in un ambito di 0,5-5U e di controllare poi i risultati mediante elettroforesi. Si è osservato, infatti, che se la concentrazione di Taq polimerasi è troppo elevata si possono accumulare dei prodotti di reazione aspecifici, se, invece, la concentrazione dell'enzima è troppo bassa, difficilmente si raggiungono le rese ottimali di DNA bersaglio (Lawyer e al. 1989).

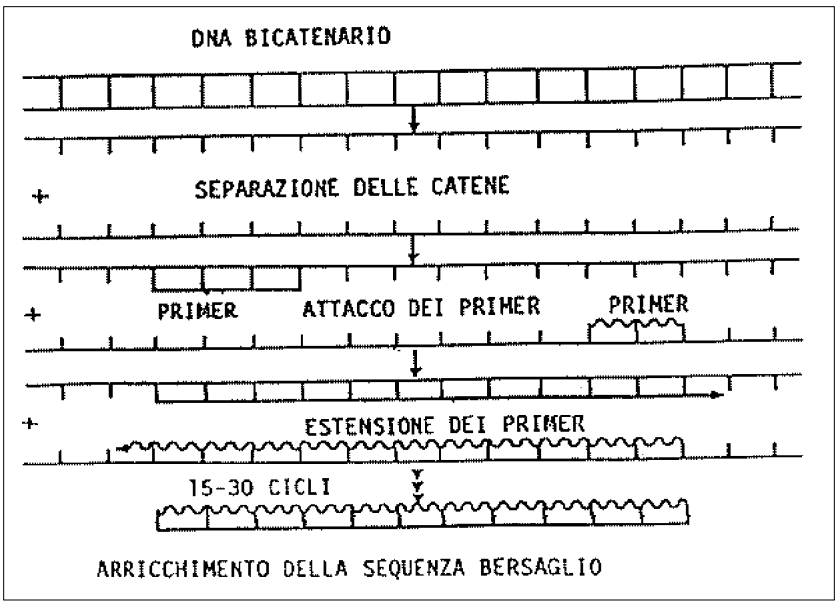


Figura 29. Amplificazione del DNA bersaglio mediante polimerase chain reaction (P.C.R.).

2) Concentrazione dei desossinucleotidi trifosfati (dNTP)

Le concentrazioni ottimali per ciascun nucleotide variano da 20 a 200 μM ed è consigliabile utilizzare i quattro nucleotidi alla stessa concentrazione per evitare errori di incorporazione (Innis e al. 1988).

3) Concentrazione degli ioni magnesio

La concentrazione di ioni Mg^{++} è un fattore limitante in quasi tutte le fasi della reazione: attacco dei primers, temperatura di denaturazione del DNA bersaglio, specificità dei prodotti di reazione, formazione di dimeri tra i primer ed attività della Taq polimerasi. Si consiglia, pertanto, di utilizzare concentrazioni di Mg^{++} nell'ambito di 0,5-2,5 mM.

4) Attacco dei primers

Le temperature ed i tempi richiesti perché avvenga il legame dei primers al DNA bersaglio, dipendono dalla lunghezza, composizione in basi e concentrazione dei primers stessi. Temperature comprese tra i 55° e i 72° forniscono i migliori risultati e ad una concentrazione ottimale dei primers (0,2 μM) la reazione di legame richiede solo alcuni secondi (Kim e Smithies, 1988).

5) Estensione dei primers

I tempi di estensione dei primers dipendono dalla lunghezza e dalla concentrazione delle sequenze bersaglio e dalle temperature di reazione. Classicamente l'estensione si effettua a 72° C il numero di nucleotidi incorporati a tale temperatura varia da 30 a 100

nucleotidi al secondo e dipende dal pH e dalla concentrazione salina del mezzo, nonché dalla natura del DNA stampo. Un periodo di estensione di un minuto a 72° C è considerato sufficiente a produrre circa 2 kilobasi (kb) in lunghezza. Tempi di estensione più lunghi possono essere necessari soprattutto nei primi cicli della reazione, se la quantità di DNA bersaglio risulta molto bassa, e nei cicli finali quando la concentrazione dei prodotti è in eccesso rispetto a quella dell'enzima (Saiki e al. 1988).

6) Tempi e temperature di denaturazione

Una delle più frequenti cause di insuccesso nella P.C.R. è l'incompleta denaturazione del DNA bersaglio e/o dei prodotti di reazione. Le condizioni tipiche di denaturazione sono: 95° C per 30 secondi o 97° C per 15 secondi. Temperature più elevate sono necessarie nel caso di bersagli particolarmente ricchi in GC; si tenga presente, però che temperature eccessive possono determinare la perdita di attività della Taq polimerasi. L'emivita di questo enzima diminuisce drasticamente con l'aumentare della temperatura (> 2 ore a 92,5° C, 40 minuti a 95° C e 5 minuti a 97,5° C (Innis e al. 1989).

7) Numero di cicli

Il numero ottimale di cicli di reazione dipende da vari parametri, e principalmente dalla quantità di DNA bersaglio di partenza (tab. 1).

n° molecole bersaglio	n° cicli
3.10^5	25-30
$1,5.10^4$	30-35
10^3	35-40
50	45-50

Tabella 1. P.C.R.: relazione tra numero di cicli di amplificazione e quantità iniziale di DNA bersaglio.

8) Primers

La concentrazione ottimale dei primers varia da 0,1 a 0,5 μM; concentrazioni più elevate possono promuovere l'accumulo di prodotti aspecifici ed aumentare le probabilità di generare artefatti indipendenti dal DNA stampo. Questi sottoprodotti, competendo con i dNTP ed i primers come substrati per la Taq polimerasi, determinano un notevole calo in resa dei prodotti desiderati. Dal punto di vista strutturale un primer ideale deve avere una lunghezza compresa tra i 18 ed i 28 nucleotidi ed una composizione in G+C tra il 50% ed il 60%; inoltre la sua temperatura di fusione (Tm) deve oscillare tra i 50° C e gli 80° C. Si deve poi evitare l'uso di primers che presentino complementarietà all'estremo 3', perché in tal caso si possono formare dei dimeri tra primers (Thein e Wallace,1986).

9) Effetto plateau

E' un fenomeno di attenuazione della reazione enzimatica, dovuto all'accumulo dei prodotti, che si osserva durante gli ultimi cicli; per ovviare a tale inconveniente è necessario ottimizzare il numero dei cicli di reazione (Innis e al. 1989).

10) Attendibilità del saggio

Quando le concentrazioni rispettive dei dNTP non sono bilanciate si possono verificare errori di incorporazione; tali errori promuovono la terminazione della catena in via di sintesi e bloccano, quindi, il processo di amplificazione del DNA bersaglio. La maggiore attendibilità nei prodotti finali della P.C.R. si osserva combinando alte temperature di legame / estensione (>55° C) e basse concentrazioni di dNTP (da 10 a 50 μM ciascuno). (Petruska e al. 1988). Recentemente la tecnica di P.C.R. è stata oggetto di ulteriori perfezionamenti che hanno portato alla messa a punto di due diversi metodi di amplificazione: la "nested P. C. R." e la "ligase chain reaction".

Nested P.C.R.

Prevede l'impiego di due coppie di oligonucleotidi primers; la prima coppia viene utilizzata per amplificare una sequenza bersaglio, mediante cicli di P.C.R., la seconda coppia di oligonucleotidi viene impiegata per amplificare i prodotti della prima reazione (Porter-Jordan e al. 1990).

Ligase chain reaction

Questa reazione prevede l'impiego di due coppie di oligonucleotidi primers legati a due diversi traccianti (es: biotina e ^{32}P). Ciascuna coppia di oligonucleotidi è omologa a sequenze adiacenti del DNA bersaglio; dopo denaturazione del DNA bersaglio si ha l'attacco dei primers che vengono poi uniti per azione di una DNA ligasi (ligation).

Questa reazione fa sì che, nel successivo ciclo di denaturazione, le sequenze originate dalla ligation restino connesse e fungano da stampo per l'attacco e la ligation di altri oligonucleotidi. Inoltre la reazione genera una singola molecola recante due diversi marcatori che vengono impiegati per separare e quantificare i prodotti di reazione (Innis e al. 1989a).

Ibridazione a sandwich

Questo metodo utilizza una sonda a filamento singolo, non marcata, come intermediario tra il DNA bersaglio ed una seconda sonda marcata (Virtanen e al. 1983). In pratica una sonda non marcata viene fissata su matrice solida e viene utilizzata per catturare il DNA bersaglio, previamente ibridato con una sonda marcata (fig.30).

Questo schema presuppone che le due sonde utilizzate siano ambedue specifiche per il DNA bersaglio, ma rispetto a sequenze diverse.

Ibridazione a "strand displacement"

Anche in questo caso si sfruttano due sonde delle quali la prima, marcata, è costituita da oligonucleotidi (25-100 paia di basi) omologhi a sequenze della seconda sonda, non marcata, a singolo filamento anch'essa, ma di maggiori dimensioni.

Le due sonde vengono fatte ibridare tra loro e poi fissate su matrice solida. Questo ibrido viene messo a contatto con un campione in cui si ricerchi il DNA bersaglio. Se il DNA bersaglio è presente potrà riconoscere una zona a singolo filamento dell'ibrido costituito dalle due sonde ed inizierà a legarsi ad essa formando un ibrido nascente.

Questo ibrido, estendendosi, finirà per incappare in una delle zone già a doppio filamento dell'ibrido-sonda, per la presenza di un oligonucleotide; a questo punto si è visto che il DNA bersaglio sposta l'oligonucleotide che va in soluzione in quanto, essendo il DNA bersaglio di dimensioni maggiori, formerà ibridi più stabili. In questo modo gli oligonucleotidi marcati vengono spostati in soluzione e possono essere quantificati dopo aver rimosso la matrice solida contenente le sequenze marcate in eccesso (fig.31).

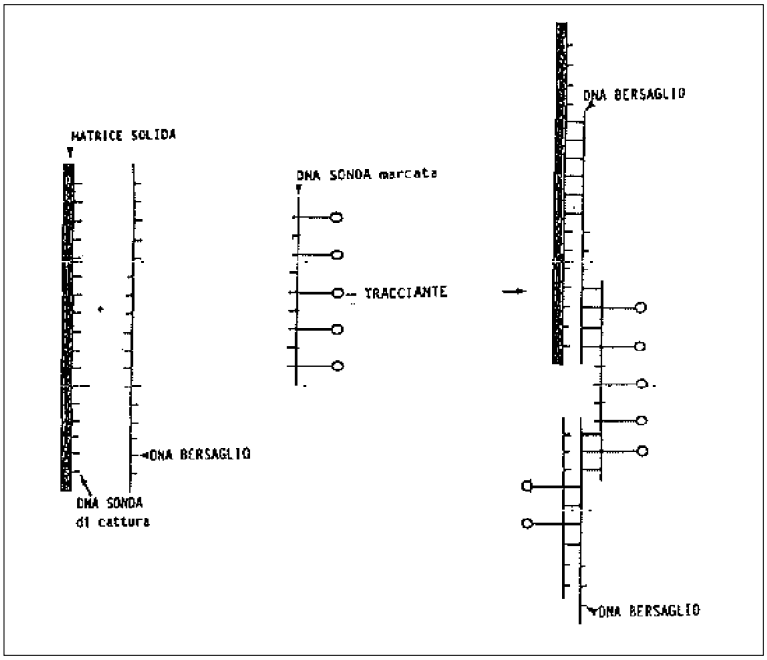


Figura 30. Amplificazione del segnale di ibridazione mediante metodo sandwich.

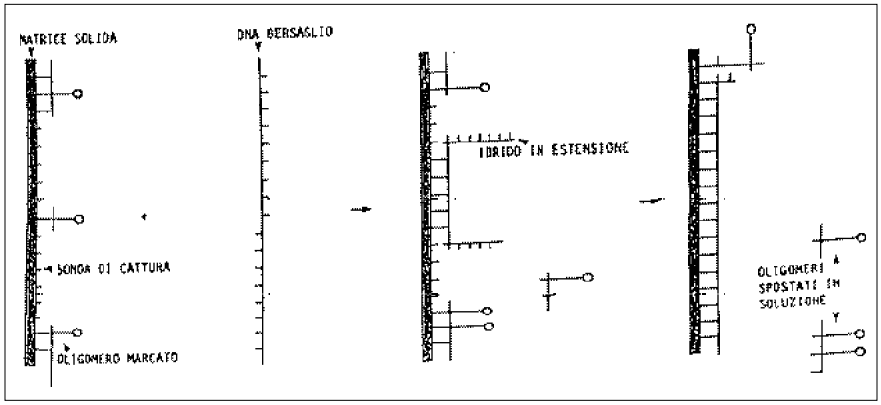


Figura 31. Amplificazione del segnale di ibridazione mediante tecnica di "strand displacement".

La quantità di oligonucleotidi marcati, presenti in soluzione, sarà direttamente proporzionale alla quantità di DNA bersaglio. Un'ulteriore amplificazione si può ottenere facendo ibridare alla sonda di cattura un grande numero di oligonucleotidi diversi in modo che ogni molecola di DNA bersaglio liberi, in soluzione, numerose molecole marcate.

Preparazione dei campioni

Di notevole importanza, ai fini della riuscita delle tecniche di ibridazione, sono gli aspetti metodologici per la preparazione dei campioni da ibridare.

Le sonde a DNA devono ibridare con gli acidi nucleici contenuti in campioni biologici quali fluidi, tessuti, emulsioni, nei quali la concentrazione di sostanze estranee può essere molto elevata e costituire quindi una barriera alla diffusione e al legame delle sonde con i loro bersagli.

Un altro aspetto fondamentale ai fini dell'ibridazione, è la denaturazione del DNA bersaglio affinché esso possa ibridare con la sonda. Per esempio, nel caso di ibridazione in situ su tessuti (biopsie e colture cellulari) è necessario fissare il campione con solventi come etanolo, cloroformio, paraformaldeide, quindi procedere a trattamenti con acidi diluiti e/o proteasi per eliminare le proteine presenti nel campione che ostacolerebbero il passaggio della sonda.

La sonda viene aggiunta al campione in una miscela costituita da un tampone citrato, in presenza di sostanze che favoriscano la destabilizzazione dei filamenti di DNA dopo la denaturazione, in modo che essi non si riassocino tra loro (es. formamide) e di altre sostanze che, invece, tendano ad accelerare la reazione di ibridazione (es. sali, destran solfato). L'insieme di questi parametri definisce le condizioni di stringenza della reazione di ibridazione: tanto più elevate sono tali condizioni, tanto maggiore è la probabilità che la reazione di ibridazione si verifichi tra sequenze di DNA ad elevato grado di omologia. Il passaggio successivo della reazione consiste nella denaturazione contemporanea del DNA sonda e del DNA bersaglio, eventualmente presente nel campione, quindi si lascia avvenire la reazione di ibridazione ad una temperatura e per un periodo di tempo che variano in funzione delle dimensioni della sonda e della sua concentrazione nella miscela di reazione. Si effettuano poi alcuni lavaggi, per eliminare le molecole di sonda che non hanno reagito. Infine si procede alla rivelazione dell'ibrido DNA sonda-DNA bersaglio in base al tipo di marcante impiegato nella sonda. Nel caso di campioni fluidi quali saliva, urine, feci, è necessario ridurre la viscosità del materiale e concentrare il DNA presente nel campione, che può essere molto diluito. Quindi, a seconda del tipo di campione, si procede con trattamenti con detergenti, alcali, proteasi, si rimuovono le proteine con solventi e si ultracentrifuga il campione. Eventualmente si possono combinare più di una di queste procedure allo scopo di liberare il DNA

ricercato dal materiale che, diversamente, lo nasconderebbe alla sonda. Il passaggio successivo consiste nel deporre, per filtrazione, su fogli di nylon o di nitrocellulosa, il preparato denaturato. Il DNA viene poi fissato al calore o per esposizione a radiazioni ultraviolette (a seconda che il supporto sia nitrocellulosa o nylon). A questo punto si mette a contatto il filtro con la miscela di ibridazione, contenente la sonda e, anche in questo caso, la temperatura ed i tempi di ibridazione verranno scelti in base alla stringenza con la quale si vuole limitare l'ibridazione.

Impiego delle sonde genetiche nella diagnostica microbiologica

Negli ultimi anni sono state realizzate numerose sonde genetiche per la ricerca di microrganismi patogeni.

L'intento di questo capitolo è quello di fornire una panoramica sullo stato attuale dell'impiego di tali sonde nel campo della microbiologia clinica.

A. Gastroenteriti

1. E. coli enterotossigenica (ETEC)

L' Escherichia coli enterotossigenica (ETEC) è una delle principali cause di manifestazioni diarroiche nei paesi in via di sviluppo. La produzione di enterotossine (termolabile e termostabile), mediata da plasmidi, viene rivelata utilizzando tecniche diagnostiche indaginose e costose (Sack e Sack, 1975). Allo scopo di facilitare la diagnosi di ETEC, alcuni Autori hanno caratterizzato i geni che codificano per la tossina termolabile (LT) e per quella termostabile (ST), e hanno costruito delle sonde genetiche per clonazione di alcuni frammenti di tali geni. (Moseley e al. 1980, 1982 a; Seriwatana e al. 1983; Georges e al. 1983; Echeverria e al. 1984, 1985a, 1986b) Queste sonde, marcate con radioisotopi (^{32}P) sono state impiegate in reazioni di ibridazione su filtro e paragonate alle tecniche diagnostiche classiche, ottenendo, in alcuni casi, sensibilità e specificità intorno al 100% (Bialkowska-Hobrzanska, 1986). Recentemente Olive (1989) ha impiegato la tecnica di P.C.R. per l'identificazione diretta di ETEC in campioni clinici, amplificando il gene che codifica per la tossina termolabile.

2. Shighelle ed E.coli enteroinvasive (EIEC)

Questi batteri sono importanti agenti etiologici di dissenteria in tutto il mondo; la loro virulenza è dovuta alla capacità di penetrare la mucosa intestinale e di produrre enterotossine, la cui sintesi è mediata da plasmidi. I plasmidi responsabili della virulenza di 4 diverse specie di Shigella e dell'EIEC presentano un elevato grado di omologia, quindi il plasmide di una specie può essere clonato ed impiegato come sonda nell'identificazione delle altre specie di Shigella e di E.coli enteroinvasive. Boileau e collaboratori (1984) hanno costruito sonde radioattive utilizzando DNA plasmidico di Sh. flexneri 5 ed hanno impiegato tali sonde in saggi di ibridazione con numerosi ceppi di Shigella e di E. coli, per valutarne la sensibilità e specificità. I risultati sono stati paragonati con quelli ottenuti mediante saggi standard di virulenza e si è osservata una sensibilità intorno al 100%. Sethabutr e collaboratori (1985) hanno impiegato sonde biotinilate, costruite a partire da frammenti di DNA plasmidico di Shigella flexneri 5, in reazioni di ibridazione, ottenendo sensibilità paragonabili a quelle ottenute con sonde radioattive, a parità di tempi di rivelazione. Sonde genetiche sono state impiegate, inoltre, in studi di carattere epidemiologico (Litwin e al. 1990).

3. Salmonella typhi

Nei paesi in via di sviluppo le febbri tifoidi costituiscono un grave problema di salute pubblica. Allo scopo di facilitarne la diagnosi di laboratorio alcuni Autori (Rubin e al. 1985) hanno prodotto sonde radioattive che riconoscono il locus genico responsabile della sintesi dell'antigene Vi di S. typhi e hanno saggiato la loro sensibilità e specificità in reazioni di ibridazione con numerosi ceppi batterici noti. I risultati hanno dimostrato una piena concordanza con quelli ottenuti mediante saggi standard di virulenza, raggiungendo una sensibilità di 10^4 cellule esprimenti l'antigene Vi. Recentemente gli stessi Autori (Rubin e al. 1988) hanno valutato la sensibilità e la specificità della sonda da loro realizzata, in studi di ibridazione in situ su colonie batteriche.

4. Rotavirus

I rotavirus sono causa di casi sporadici ed epidemici di gastroenteriti acute nei bambini, negli adolescenti e, occasionalmente, negli adulti. Il metodo diagnostico di elezione è la visualizzazione diretta del virus in campioni clinici, mediante microscopia elettronica (EM). Più comunemente la diagnosi si basa sulla ricerca immunologica di antigeni virali sia mediante tecniche immunoenzimatiche (ELISA), sia mediante agglutinazione al lattice (LA) e saggi radioimmunologici (RIA). Recentemente sono state realizzate sonde genetiche radioattive (^{32}P, ^{125}I) che sono state impiegate per la ricerca dell'RNA virale in campioni clinici (Dimitrov e al. 1985). Paragonando la sensibilità di tali sonde con quella delle tecniche classiche, gli Autori hanno osservato che la quantità di RNA visualizzata mediante ibridazione varia a seconda dei ceppi di rotavirus

presenti nei campioni clinici. Si ritiene, comunque, che utilizzando diverse sonde, in condizioni di alta stringenza, sia possibile caratterizzare sottogruppi e sierotipi di rotavirus, mediante reazioni di ibridazione.

5. Adenovirus enterici

Gli adenovirus enterici, responsabili di gastroenteriti nei bambini e negli adolescenti, appartengono a due diversi tipi: il tipo 40 (Ad 40) ed il tipo 41 (Ad 41). La diagnosi di gastroenterite da adenovirus è indaginosa a causa della difficoltà di coltivare tali virus: quindi i metodi diagnostici di elezione sono rappresentati dalla visualizzazione diretta delle particelle virali mediante EM o ricerca diretta dell'antigene mediante tecnica ELISA. Alla luce di queste considerazioni alcuni Autori hanno realizzato sonde a DNA radioattive a partire dal DNA di adenovirus di tipo 2 (Ad 2) che, però, hanno dato risultati insoddisfacienti, probabilmente a causa del basso grado di omologia tra i genomi di Ad 2 ed i genomi di Ad 40 e Ad 41 (Stalhandske, 1983). Recentemente sono state realizzate sonde marcate con ^{32}P a partire da genomi di Ad 40 e Ad 41 e con tali sonde si è ottenuta una sensibilità dell'ordine del picogrammo ed inoltre, non si sono osservate reazioni crociate con altri adenovirus non enterici (Takiff e al. 1985; Kidd e al. 1985).

C. Infezioni del tratto respiratorio

1. Legionelle

La più comune manifestazione di infezione da legionelle è una polmonite che può manifestarsi in forma epidemica con elevata morbosità e mortalità, se non trattata. Le legionelle, inoltre, sono state riconosciute come importanti cause di polmoniti nosocomiali e occasionalmente sono responsabili di episodi di polmonite in comunità chiuse. La diagnosi di infezione da legionelle si basa sulla coltivazione o sulla dimostrazione del batterio mediante immunofluorescenza diretta (DFA). Il test diagnostico più sensibile e definitivo è, comunque, l'isolamento batterico che richiede alcuni giorni, seguito dalla DFA o dalla reazione di agglutinazione per l'identificazione della specie e del sierogruppo. Allo scopo di semplificare la ricerca e l'identificazione del microrganismo, alcuni Autori (Grimont e al. 1985; Wilkinson e al. 1986; Edelstein 1986) hanno realizzato sonde genetiche a partire dal DNA batterico di L. pneumophila. I risultati ottenuti in reazioni di ibridazione su filtro suggeriscono che tali sonde radioattive possono essere impiegate in sostituzione della DFA, ma in associazione con l'isolamento colturale. Negli ultimi anni Starnbach e collaboratori (1989) hanno sviluppato una tecnica di amplificazione e successiva ibridazione per la ricerca di L.pneumophila nelle acque.

2. Adenovirus

Gli adenovirus sono importanti agenti etiologici di infezioni febbrili del tratto respiratorio superiore. I sierotipi più frequentemente isolati in queste affezioni sono quelli appartenenti al gruppo B (sierotipi 3 e 7) e al gruppo C (sierotipi 1, 2 e 5). La diagnosi è basata sull'isolamento virale in colture cellulari (che può richiedere alcune settimane), seguito dall'identificazione mediante immunofluorescenza o ELISA. Due diversi gruppi di ricercatori hanno utilizzato tecniche di ibridazione a sandwich per la ricerca del DNA virale in campioni clinici, impiegando sonde marcate con ^{125}I (Ranki e al. 1983; Virtanen e al. 1983). I risultati, paragonati con quelli ottenuti mediante le metodiche classiche, sono stati in parte discordanti suggerendo la necessità di ulteriori conferme. Recentemente sono state sviluppate tecniche di ibridazione in situ per la ricerca del DNA virale in colture cellulari infettate e in materiale bioptico (Hogg e al. 1989).

3. Citomegalovirus (CMV)

L'infezione da citomegalovirus, che decorre per lo più in maniera asintomatica, può dare gravi manifestazioni in pazienti immunocompromessi e in neonati con infezione congenita. La diagnosi di infezione da CMV si basa sull'isolamento virale in colture cellulari che, però, può richiedere fino ad alcune settimane. Tecniche diagnostiche più rapide sono rappresentate dalla visualizzazione diretta di particelle virali mediante EM e reazioni immunochimiche per la ricerca di antigeni virali. Le prime sonde genetiche impiegate nella diagnosi di infezione attiva da CMV sono state sonde a DNA marcate con radioisotopi (^{32}P) (Spector e al. 1984; Martin e al. 1984; Chou e Merigan, 1983; Virtanen e al. 1984a). Successivamente Buffone e collaboratori (1986) hanno utilizzato sonde biotinilate in saggi di ibridazione, su filtro, che si sono dimostrate sensibili come quelle radioattive, a parità di tempi di rivelazione. Nel nostro laboratorio abbiamo realizzato sonde a DNA marcate con digossigenina che abbiamo utilizzato sia in reazioni di ibridazione su filtro in campioni di urina, sia in reazioni di ibridazione in situ su materiale bioptico (rene, polmone ed intestino) (Gentilomi e al. 1989; Musiani e al. 1989, 1990a) (figg. 32-33).

Le tecniche da noi messe a punto si sono rivelate sensibili, specifiche e rapide se paragonate ai metodi diagnostici classici.

4. Mycoplasma pneumoniae

L'infezione primaria da M. pneumoniae è la principale causa di polmoniti atipiche in giovani adulti. La diagnosi è prevalentemente clinica e sierologica, poiché l'isolamento in coltura richiede fino a 21 giorni. Per rendere più rapida l'identificazione del microrganismo, alcuni Autori (Shaw e al. 1986) hanno realizzato sonde a DNA marcate con ^{125} I omologhe all'rRNA di M. pneumoniae, raggiungendo sensibilità e specificità paragona-

Figura 32. Ricerca del DNA di citomegalovirus mediante ibridazione in situ, su biopsia renale di un paziente affetto da A.I.D.S., utilizzando una sonda marcata con digossigenina. In figura si osservano alcune cellule positive con evidenti inclusioni nucleari.

Figura 33. Ricerca del DNA del virus herpes simplex di tipo 2 mediante ibridazione in situ, in una coltura cellulare infetta, utilizzando una sonda biotinilata. In figura si osservano alcune cellule positive, con evidenti inclusioni nucleari.

bili all'isolamento in coltura. Bernet e collaboratori (1989) hanno utilizzato una tecnica di P.C.R., per la ricerca di M.pneumoniae in campioni biologici, che si è dimostrata altamente sensibile rispetto alle metodiche colturali classiche.

5. Micobatteri

Il M. tubercolosis ed il M. avium-intracellulare rappresentano ancora oggi importanti patogeni polmonari e, siccome l'identificazione di questi microrganismi è molto lenta ed

indaginosa, sono stati sviluppati metodi alternativi di diagnosi rapida. Sono state realizzate a tale scopo sonde marcate con ^{32}P e ^{125}I omologhe al DNA cromosomico o all'rRNA del genere Micobacterium (Dean e al. 1985; Shoemaker e al. 1985; Roberts e Coyle, 1986). L'impiego di queste sonde in reazioni di ibridazione su filtro ha fornito risultati incoraggianti anche se preliminari. Negli ultimi anni numerosi Autori hanno utilizzato tecniche di P.C.R. per la ricerca e l'identificazione di differenti specie di micobatteri (Pao e al. 1990; Eisenach e al. 1990; Patel e al. 1990; Boddinghaus e al. 1990; DeWitt e al. 1990). I risultati ottenuti suggeriscono la potenziale utilità di tali tecniche nella diagnosi precoce delle infezioni da micobatteri.

D. Malattie a trasmissione sessuale

1. Chlamidia trachomatis

Le infezioni da C. trachomatis rappresentano alcune tra le più diffuse malattie sessualmente trasmesse. I sierotipi D e K sono associati a malattie a trasmissione sessuale (cerviciti, uretriti, congiuntiviti neonatali e polmoniti), i sierotipi A, B e C sono gli agenti etiologici del tracoma iperepidemico e i sierotipi L1, L2 e L3 sono responsabili del linfogranuloma venereo. Il metodo standard di diagnosi di infezione da clamidie è la coltura cellulare, seguita dall'identificazione rapida con specifici anticorpi monoclonali fluorescenti. L'uso delle sonde genetiche è stato quindi studiato come mezzo di identificazione rapida delle specie del genere Clamidia. Alcuni Autori hanno impiegato sonde a DNA marcate con radioisotopi in reazioni di ibridazione a sandwich ottenendo elevate sensibilità e specificità. (Palva e al. 1984). Risultati incoraggianti si sono ottenuti anche utilizzando sonde marcate con ^{35}S, realizzate a partire dal DNA del plasmide criptico ospitato da tutti i serovars di C. trachomatis (Horn e al. 1986; Peterson e al. 1989). Recentemente Ratti e collaboratori (1991) hanno impiegato una tecnica di P.C.R. per la ricerca del DNA di C. trachomatis in pazienti affetti da uretrite non-gonococcica.

2. Neisseria gonorrhoeae

N. gonorrhoeae è l'agente etiologico di una delle malattie sessualmente trasmesse più diffuse nel mondo. La diagnosi viene effettuata mediante isolamento in coltura seguito dall'identificazione della specie. Sonde genetiche, omologhe al plasmide criptico presente nella maggior parte dei batteri della specie N. gonorrhoeae, sono state impiegate per la ricerca di gonococchi in campioni clinici (Totten e al. 1983; Perine e al. 1985). Queste sonde si sono dimostrate sensibili e specifiche in campioni ottenuti dall'uretra maschile, mentre sono ancora da valutare, come metodi diagnostici, in campioni clinici poveri di batteri come la cervice, il retto o il faringe. Alcuni Autori

(Granato e al.1989) hanno impiegato sonde a DNA chemiluminescenti, specifiche per l'mRNA di N. gonorrhoeae, in reazioni di ibridazione. A paragone con le tecniche colturali classiche, per la diagnosi di laboratorio di infezione gonococcica, queste sonde si sono rivelate altamente sensibili e specifiche.

3. Herpes Simplex virus (HSV)

Negli ultimi anni si è verificato un aumento di infezioni genitali da HSV, che si riflettono principalmente nella trasmissione neonatale del virus. Il metodo diagnostico più sensibile per le infezioni erpetiche è rappresentato dall'isolamento virale in colture cellulari che, però, richiede alcuni giorni. Come tecniche diagnostiche alternative, alcuni Autori (Redfield e al. 1983; Nago e al. 1988) hanno impiegato sonde a DNA radioattive per la ricerca di genomi virali mediante reazioni di ibridazione su filtro ottenendo risultati paragonabili a quelli forniti dalle tecniche classiche. Risultati analoghi sono stati ottenuti con l'impiego di sonde biotinilate che, inoltre richiedono tempi di reazione molto ridotti (2-3h) (Fung e al. 1985). Recentemente sono state utilizzate tecniche di ibridazione in situ in associazione con tecniche di centrifugazione per la ricerca del DNA dell'HSV in colture cellulari infette (Woods e al. 1989).

4. Virus dell'immunodeficienza acquisita (HIV I)

L'HIV I è l'agente etiologico della sindrome da immunodeficienza acquisita e viene trasmesso per via ematica e per contatto sessuale. I gruppi di soggetti a rischio di infezione sono rappresentati dagli omosessuali, dai tossicodipendenti, dagli emofiliaci, da neonati di madri infette e dai partners eterosessuali di individui infetti. La diagnosi di A.I.D.S. viene effettuata mediante reazioni sierologiche (ELISA e/o Western blotting) e, poiché l'isolamento virale in colture cellulari è estremamente indaginoso, numerosi Autori hanno cominciato a valutare l'uso di sonde genetiche. I migliori risultati, a riguardo, sono stati ottenuti con sonde radioisotopiche impiegate in reazioni di ibridazione su filtro ed in situ (su sezioni di linfonodi e cerebrali) (Shaw al. 1984, 1985a; Harper e al. 1986; Matijs e al. 1988; Busch e al. 1989). Di notevole importanza ai fini diagnostici si è rivelato l'impiego di tecniche di P.C.R., in grado di rivelare la presenza di un singolo genoma virale in campioni clinici (Loche e al. 1988; Kemp e al. 1989; Phair e al. 1989).

5. Treponema pallidum

L'identificazione del T. pallidum, agente etiologico della sifilide, costituisce un serio problema diagnostico per molti laboratori. Per rendere più agevole tale identificazione sono state realizzate sonde a DNA marcate con ^{32}P che, però, hanno dimostrato una bassa sensibilità (66-81%) (Perine e al. 1985). Recentemente Burstain e collaboratori

(1991) hanno utilizzato una tecnica di P.C.R. per la ricerca del T. pallidum in campioni clinici di pazienti affetti da sifilide, ottenendo una elevata sensibilità (0,01 pg di DNA).

6. Papillomavirus umani (HPV)

Gli HPV sono gli agenti etiologici di varie forme tumorali benigne cutanee e mucose e sono stati implicati nella genesi del carcinoma della cervice uterina. Non essendo ancora disponibili sistemi di coltura, la diagnosi si basa sulla ricerca dei papillomavirus mediante EM o mediante ricerca degli antigeni virali nelle lesioni da HPV. L'applicazione delle sonde genetiche nella diagnostica degli HPV è stata indirizzata, prevalentemente, allo studio di eventuali correlazioni tra sierotipo virale e lesione, mediante reazioni di ibridazione su filtro ed in situ (Gissman e al. 1983; Durst e al. 1983; Lancaster e al. 1983; Beckmann e al. 1985; Vallejos e al. 1987; Melchers e al.1989; Schneider e Grubert, 1989). Shibata e collaboratori (1988) hanno impiegato una tecnica di P.C.R. per la ricerca del DNA di papilloma virus tipo 16 e 18 in biopsie cervicali.

E. Meningiti ed encefaliti

1. Enterovirus

Sono i più comuni agenti etiologici di meningiti asettiche ed encefaliti. La diagnosi di infezione da enterovirus si basa sull'isolamento virale in coltura che spesso richiede alcune settimane. Data l'importanza delle infezioni sostenute da tali virus è necessario poter disporre di tecniche diagnostiche rapide e a questo scopo alcuni Autori hanno realizzato sonde genetiche marcate con ^{32}P per la ricerca degli RNA dei diversi enterovirus (echovirus, poliovirus, coxsackievirus), in campioni clinici. I risultati più incoraggianti sono stati ottenuti impiegando combinazioni delle diverse sonde (Hyypia e al. 1984; Rotbart e al. 1984, 1985a). Kopecka e collaboratori (1988) hanno valutato la sensibilità e la specificità di sonde ad RNA nella diagnosi di infezione da poliovirus di tipo 1.

2. Herpes simplex virus

L'HSV di tipo I è una delle più comuni cause di encefaliti sporadiche che vengono diagnosticate mediante dimostrazione del virus in biopsie cerebrali. L'HSV di tipo 2 è responsabile, invece, di meningiti asettiche nei neonati che, nell'adulto, possono insorgere come complicanze di infezioni primarie genitali. Nel caso di encefaliti la diagnosi rapida è fondamentale, quindi sono state impiegate a tale scopo, sonde

genetiche biotinilate in reazioni di ibridazione in situ su biopsie cerebrali (Forghani e al. 1985). I risultati, paragonati con quelli ottenuti mediante reazioni di immunofluorescenza indiretta, hanno dimostrato un'ottima correlazione.

3. Panencefalite Subacuta Sclerosante (SSPE)

E' una malattia progressiva lenta del sistema nervoso centrale che colpisce i bambini e i giovani adulti ed è causata da una variante defettiva del virus del morbillo. La diagnosi di SSPE è prevalentemente sierologica, ma recentemente sono state impiegate sonde a DNA marcate con ^{3}H in reazioni di ibridazione in situ su sezioni cerebrali (Haase e al. 1981). Nonostante l'elevata sensibilità ottenuta con tali sonde, la tecnica richiede tempi alquanto lunghi poiché la rivelazione dell'ibrido DNAsonda-DNAbersaglio richiede 2 settimane di esposizione autoradiografica.

F. Malattie cutanee

1. Virus della varicella-zoster (VZV)

L'infezione da VZV si manifesta come varicella nei bambini e come herpes zoster negli adulti. La diagnosi è prevalentemente clinica, ma in certe situazioni è necessaria una diagnosi di laboratorio specifica che viene effettuata mediante isolamento virale in coltura.

Questa tecnica, lunga ed indaginosa, non sempre, però, porta all'isolamento del virus data la sua natura labile. Per ovviare a questi inconvenienti sono state realizzate sonde a DNA radioattive e impiegate in reazioni di ibridazione su filtro che sono risultate altamente sensibili e specifiche rispetto alla tecnica di isolamento in coltura (Seidlin e al. 1984).

2. Leishmanie

Le specie L. tropica, mexicana e brasiliensis sono responsabili di lesioni cutanee che possono risultare in cicatrici deturpanti se non trattate prontamente. Le attuali tecniche di coltura ed isolamento delle leishmanie sono difficoltose e spesso senza esito; inoltre i test sierologici disponibili sono di difficile interpretazione a causa di reazioni crociate con altre affezioni.

La necessità di metodi diagnostici rapidi, specifici e sensibili ha portato alcuni Autori ad analizzare l'impiego di sonde a DNA radioattive in reazioni di ibridazione su filtro per la diagnosi di leishmaniosi (Wirth e Pratt, 1982; Barker,1987). Il numero di campioni clinici analizzati è però ancora troppo esiguo per poter valutare l'utilità di tali sonde in campo diagnostico.

G. Epatiti

1. Epatiti A e B

La diagnosi di infezione da virus dell'epatite A (HAV) è tipicamente sierologica. Sonde genetiche radioattive sono state realizzate per la ricerca dell'RNA dell'HAV in campioni fecali in associazione con saggi radioimmunologici per la ricerca delle particelle virali (Jansen e al. 1985). La diagnosi di epatite B è tipicamente sierologica. Numerosi ricercatori hanno inoltre valutato l'impiego di sonde genetiche radioisotopiche nella diagnosi di epatite B ottenendo risultati discordanti, anche se in alcuni casi, l'impiego di tali sonde si è rivelato più sensibile delle tecniche tradizionali (Beminger e al. 1982; Scotto e al. 1983; Feinman e al. 1984; Lie-Injo e al. 1983). Recentemente, nella diagnosi di epatite, sono state impiegate sonde genetiche non-radioisotopiche in reazioni di ibridazione su filtro su campioni di siero (Quibriac e al. 1987; Chien-Feng Sung e al. 1988; Casacuberta e al. 1988).

H. Sindromi varie

1. Poliomavirus

I poliomavirus umani JC, BK e PML-SV40 sono virus ubiquitari, ma causano malattie soltanto in soggetti immunocompromessi ed il 40-70% degli individui adulti possiede anticorpi nei loro confronti. Questi virus crescono con relativa facilità in colture cellulari ed inoltre possono essere ricercati mediante esame citologico del sedimento urinario e/o visualizzati mediante EM. I virus BK e JC possono anche essere evidenziati in sezioni di tessuto renale e cerebrale mediante reazioni di immunofluorescenza o immunocitochimica. Gibson e collaboratori (1985) hanno realizzato sonde a DNA radioattive che sono state utilizzate in reazioni di ibridazione su filtro su campioni clinici con risultati paragonabili a quelli ottenuti mediante metodiche standard.

2. Parvovirus

Nel 1975 Cossart e collaboratori osservarono nel siero di un donatore di sangue un parvovirus umano, ora noto come parvovirus B 19. Successivamente si è scoperto che questo virus è l'agente etiologico dell'eritema infettivo, una malattia esantematica dell'infanzia ed è responsabile di crisi aplastiche in pazienti con anemie emolitiche croniche, e in pazienti immunodepressi. La diagnosi di infezione da parvovirus è

sierologica (RIA, ELISA, counterimmunoelettroforesi) in quanto non esistono finora sistemi cellulari permissivi per la replicazione del virus. Anderson e collaboratori (1985) hanno messo a punto tecniche di ibridazione su filtro per la ricerca del parvovirus in campioni clinici, impiegando sonde marcate con ^{32}P. Nel nostro laboratorio abbiamo, invece, realizzato una sonda fredda, marcata con digossigenina, che è stata impiegata in reazioni di ibridazione su filtro su campioni di siero (Zerbini e al. 1990; Musiani e al. 1991; Azzi e al. 1990). I risultati dei nostri saggi sono stati paragonati a quelli ottenuti impiegando una sonda marcata con ^{32}P ed abbiamo osservato che, a parità di tempi di rivelazione, la sensibilità e la specificità della nostra sonda erano paragonabili a quelle della sonda radioattiva.

3. Plasmodi

Delle 4 specie di plasmodi che infettano l'uomo il P. falciparum provoca l'infezione più grave, che porta al blocco renale e al coma nel giro di pochi giorni. La diagnosi rapida di malaria, importante soprattutto per la sempre più frequente resistenza del P. falciparum alla clorochina, viene effettuata mediante osservazione microscopica di strisci di sangue di pazienti sospetti. Franzen e collaboratori (1984) hanno utilizzato una sonda a DNA marcata con ^{32}P, realizzata a partire da DNA di P. falciparum, in reazioni di ibridazione su filtro ottenendo una sensibilità di 25 pg. Altri Autori (Fucharoen e al. 1988) hanno impiegato sonde radioattive in reazioni di ibridazione su filtro per la tipizzazione dei parassiti malarici.

4. Virus di Epstein-Barr (EBV)

E' l'agente etiologico della mononucleosi infettiva (IM) ed è stato associato al linfoma africano di Burkitt e al carcinoma dello spazio naso-faringeo. La diagnosi di IM viene effettuata facilmente mediante saggi sierologici. L'ibridazione degli acidi nucleici è stata utilizzata, comunque, per la ricerca di sequenze di DNA virale in tessuti umani ed ha fornito le prove dell'implicazione dell'EBV in vari processi neoplastici inclusi il carcinoma naso-faringeo, il linfoma di Burkitt e alcuni linfomi non-Burkitt (Hochberg e al. 1983; Andiman e al. 1983; Wolf e al. 1984). Inoltre sonde biotinilate sono state impiegate in reazioni di ibridazione in situ per la ricerca di DNA ed RNA virali in cellule epiteliali dell'orofaringe di pazienti con IM, ottenendo risultati paragonabili al saggio classico di trasformazione in vitro (Sixbey e al. 1984; Weiss e al. 1989).

Conclusioni

L'avvento della tecnologia del DNA ricombinante e l'evoluzione delle tecniche di sintesi chimica hanno permesso di realizzare sonde genetiche che, mediante reazioni di ibridazione degli acidi nucleici, sono state ampiamente impiegate in campo microbiologico.

Fino ad oggi, però, le sonde genetiche hanno trovato applicazione prevalentemente nel campo della ricerca mentre, a livello diagnostico, le applicazioni sono ancora ad uno stadio preliminare ed i risultati ottenuti alquanto frammentari.

L'impiego di sonde genetiche in sostituzione dei metodi diagnostici classici deve essere finalizzato al perfezionamento delle tecniche già esistenti. E' quindi importante valutare attentamente la loro utilità potenziale facendo riferimento alle metodiche diagnostiche già in uso; infatti, se per la ricerca di un microrganismo patogeno sono già disponibili tecniche rapide, sensibili e poco costose, l'impiego di tecniche di ibridazione degli acidi nucleici diviene superfluo.

Nel caso in cui, invece, la diagnosi di un agente patogeno sia difficoltosa con le tecniche in uso, ecco che l'impiego di sonde genetiche altamente sensibili e specifiche, può divenire un valido strumento di indagine. Un'altra considerazione da fare per chi si accosta all'impiego di sonde genetiche riguarda la natura di tali sonde; infatti le sonde "calde", più sensibili di quelle fredde, non possono essere utilizzate se non in laboratori attrezzati ed autorizzati per la manipolazione di radioisotopi.

Inoltre le sonde radioattive hanno una durata soggetta al tempo di decadimento del radionuclide utilizzato per la marcatura che, essendo prevalentemente ^{32}P, è molto breve (circa 30 giorni). Nonostante l'efficacia delle sonde fredde sia solo in alcuni casi paragonabile a quella delle sonde calde, la loro adozione diventa una scelta d'obbligo per la maggior parte dei laboratori se si considerano alcuni notevoli vantaggi che le caratterizzano rispetto alle sonde calde:

a) non necessitano di locali attrezzati per la manipolazione di prodotti radioattivi;

b) sono semplici da utilizzare ed il tempo necessario per le reazioni di ibridazione può essere notevolmente ridotto perché il rapporto segnale / rumore di fondo è solitamente migliore rispetto a quello dato dalle sonde radioattive, quindi la concentrazione della sonda nella miscela di ibridazione può essere notevolmente aumentata, con una considerevole riduzione del tempo di ibridazione;

c) possono essere conservate per almeno un anno senza subire nessun calo in resa;

Inoltre la produzione di queste sonde non presenta problemi particolari e viene effettuata secondo due diverse modalità : la prima, più comune, consiste nella produzione di batteri trasformati con vettori ricombinanti; la seconda è data dalla produzione di oligonucleotidi sintetici. Ambedue i metodi garantiscono rese sufficienti alla produzione di kit diagnostici (per esempio la resa di un litro di brodocoltura può raggiungere i 5 mg di DNA), inoltre i ceppi batterici ricombinanti sono relativamente stabili e si conservano con facilità. Altri punti di forza delle sonde genetiche sono rappresentati dalla possibilità di predeterminare la loro selettività, scegliendo l'esatta sequenza

desiderata, e la loro elevata specificità anche in presenza di DNA bersaglio mutati rispetto alla sequenza della sonda: una mutazione puntiforme non ha praticamente nessun effetto sul riconoscimento, in condizioni standard di ibridazione. Ciò è particolarmente importante in campo microbiologico dove alcuni batteri e virus vanno incontro a variazioni geniche con notevole frequenza. La possibilità di disporre di test diagnostici per la ricerca del microrganismo infettante, dotati di una elevata specificità e di una sensibilità che viene continuamente perfezionata, rappresenta la speranza di un notevole salto qualitativo nella routine diagnostica.

Bibliografia

Anderson,M.J., Jones,S.E. and Minson, A.C. Diagnosis of human parvovirus infection by dot-blot hybridization using cloned viral DNA. Lancet 1:72-73,1985.

Andiman,W., Gradoville,L., and Heston,L. Use of cloned probes to detect Epstein-Barr viral DNA in tissue of patients with neoplastic and limphoproliferative diseases. J.Infect.Dis. 184:967-977,1983.

Azzi,A., Zakrzewska,K., Gentilomi,G., Musiani,M. and Zerbini,M. Detection of B19 parvovirus infections by a dot-blot hybridization assay using a digoxigenin-labelled probe. J.Virol.Meth.,27:125-134,1990.

Barker,D.C. DNA diagnosis of human leishmaniasis. Parasitology Today 3:177-184, 1987.

Bautz,E.K.V., and Bautz,F.A. The influence of noncomplementary bases on the stability of ordered polynucleotides. Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,52:1476-1481, 1964.

Beckmann,A.M., Myerson,D., Daling,J.R., Kiviat,N.B., Fenoglio,C.M., and McDougall,J.K. Detection and localization of human papillomavirus DNA in human genital condylomas by in situ hybridization with biotinylated probes. J.Med.Virol.,16:265-273,1985.

Beminger,M., Hammer,M., Hoyer,B., and Gerin,J.L. An assay for the detection of the DNA genome of hepatitis B virus in serum. J.Med.Virol., 9:57-68, 1982.

Bernet,C., Garret,M., Bertille de Barbeyrac, Bebear,C., and Bonnet,J. Detection of Mycoplasma pneumoniae by using polymerase chain reaction. J.Clin.Microbiol. 27:2492-2496, 1989.

Betsholtz,C., Johnsson,A., Heldin,C.H., Westermark,B., Lind,P., Urdea,M.S., Eddy,R.,Shows,T.B., Philpott,K., Mellor,A.R., Knott,T.J., and Scott,J. cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumor cell lines. Nature,320:695, 1986.

Bialkowska-Hobrzanska,H., Evaluation of the sensitivity and specificity of biotinylated DNA probe hybridization (BDPH)assay in diagnosis of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC). Abstr.Annu.Meet.Am.Soc.Microbiol. C-163,1986.

Boddinghaus,B., Rogall,T., Flohr,T., Blocker,H., and Bottger,E.C. Detection and identification of Mycobacteria by amplification of rRNA. J.Clin.Microbiol. 28:1751-1759, 1990.

Boileau,C.R., D'Hauteville,H., and Sansonetti,P.J. DNA hybridization technique to detect Shigella species and enteroinvasive Escherichia coli in stools of children with diarrhea. J.Clin.Microbiol. 20:959-961, 1984.

Bolivar,F., Rodriguez,R.L., Bettlach,M.C., and Boyer,H.W. Construction and characterization of new cloning vehicles.I.Ampicillin-resistant derivatives of the plasmid pMB9. Gene 2:75, 1977.

Bolivar,F., Rodriguez,R.L., Greene,P.J., Betlach,M.C., Heyneker,H.L., Boyer,H.W., Crosa,J.H., and Falkow, S. Construction and characterization of new cloning vehicles.II.A multipurpose cloning system. Gene 2:95, 1977a.

Bonner,J. Kung,G., and Bekhor,I. A method for the hybridization of nucleic acid molecules at low temperature. Biochemistry 6:3650-3653, 1967.

Brigati,D.J., Myerson,D., Leary,J.J., Spalholz,B., Travis,S.Z., Fong,C.K.Y., Hsiung,G.D., and Ward,D.C. Detection of viral genomes in cultured cells and paraffin-embedded tissue section using biotin-labeled hybridization probes. Virology,126:32,1983.

Britten,R.J., and Kohne,D.E. Repeated sequences in DNA. Science 161:529-540,1968.

Buffone,G.J., Schimbor,C.M., Demmler,G.J., Wilson,D.R., and Darlinton,G.J. Detection of cytomegalovirus in urine by nonisotopic DNA hybridization. J.Infect.Dis. 154:163-166.

Burke,D.T., Carle,G.F., and Olson,M.V. Cloning of large segment of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. Science 236:806, 1987.

Burstain,J.M., Grimprel,E., Lukehart,S.A., Norgard,M.V., and Radolf,J.D. Sensitive detection of Treponema pallidum by using the polymerase chain reaction. J.Clin.Microbiol. 29:62-69, 1991.

Busch,M.P., Beckstead,J.H., Hollander,H., and Vyas,G.N. In situ hybridization: a histomolecular approach to the detection and study of human immunodeficiency virus infection. In HIV detection by genetic engineering methods. Publ. by: Marcel Dekker,New York, NY (USA). 209-242, 1989.

Casacuberta,J.M., Jardi,R., Buti,M., Puigdomenech,P., and San Segundo,B. Comparison of different non-isotopic methods for hepatitis B virus detection in human serum. Nucleic Acid Res. 24:11834, 1988.

Casey,J., and Davidson,N. Rates of formation and thermal stabilities of RNA:DNA and DNA:DNA duplexes at high concentrations of formamide. Nucleic Acid Res. 4:1539,1977.

Chamberlin,M., and Ryan,T. Bacteriophage DNA-dependent RNA polymerases. In The enzymes,3rd edition (ed. P.D. Boyer), vol.15,p.87. Academic Press, New York, 1982.

Chien-Feng Sun, Pao,C.C., Shaw-YunWu, and Yun-FanLiaw. Screening for hepatitis B virus in health blood donors by molecular DNA hybridization analysis. J.Clin.Microbiol. 26:1848-1852, 1988.

Chou,S., and Merigan,T.C. Rapid detection and quantitation of human cytomegalovirus in urine through DNA hybridization. N.Engl.J.Med. 308:921-925, 1983.

Cohen,S.N., Chang,A.C.Y., Boyer,H.W., and Helling,R.B. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. Proc.Natl.Acad.Sci. 70:3240, 1973.

Collins,J., and Hohn,B. Cosmids: a type of plasmid gene-cloning vector that is packageable in vitro in bacteriophage heads. Proc.Natl.Acad.Sci. 75:4242, 1978.

Cossart,Y.E., Field,A.M., Cant,B., and Widdows,D. Parvovirus-like particles in human sera. Lancet 1:72-73, 1975.

Covarrubias,L., Cervantes,L., Covarrubias,A., Soberon,X., Vichido,I., Blanco,A., Kuperasztoch-Portnoy,Y.M., and Bolivar,F. Construction and characterization of new cloning vehicles. V. Mobilization and cloning properties of pBR322 and several deletion derivatives including pBR327 and pBR328. Gene 13:25, 1981.

Davanloo,P., Rosenberg,A.H., Dunn,J.J., and Studier,F.W. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. Proc.Natl.Acad.Sci. 81:2035, 1984.

Dean,E.D., Dalyl,W.J, Hoppe,M.S., Mikhall,R., Murphy,K.A., Smith,R.D., and Kacian,D.L. Rapid, specific detection of Mycobacterium species by DNA:rRNA hybridization. Abstr.Annu.Meet.Am.Soc.Microbiol. C-374, 1985.

Denhardt,D.T. A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. Biochem.Biophys.Res. Commun. 23:641-646, 1966.

Derynck,R., Roberts,A.B., Winkler,M.E., Chen,E.Y., and Goeddel,D.V. Human transforming growth factor-α: Precursor structure and expression in E.coli. Cell 38:287,1984.

De Wit,D., Steyn,L., Shoemaker,S., and Sogin,M. Direct detection of Mycobacterium tubercolosis in clinical specimens by DNA amplification. J.Clin.Microbiol. 28:2437-2441, 1990.

Dimitrov,D.H., Graham,D.Y., and Estes,M.K. Detection of rotavirus by nucleic acid hybridization with cloned DNA of simian rotavirus SA11 genes. J.Infect.Dis. 152:293-300, 1985.

Durst,M., Gissmann,L., Ikenberg,H., and zur Hausen,H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. Proc.Natl.Acad.Sci. 80:3812-3815, 1983.

Echeverria,P., Seriwatana,J., Patamaroj,U., Mose-ley,S.L., McFarland,A., Chityothin,O., and Chaicumpa,W. Prevalence of heat-stable II enterotoxigenic Escherichia coli in pigs, water, and people at farms in Thailand as determined by DNA hybridization. J.Clin.Microbiol. 19:489-491, 1984.

Echeverria,P., Seriwatana,J., Sethabutr,O., and Taylor,D.N. DNA hybridization in the diagnosis of bacterial diarrhea. Clin.Lab.Med. 5:447-462, 1985a.

Echeveriia,P., Taylor,D.N., Seriwatana,J., Chat-Kaeomorakot,A., Khungvalert,V., Sakuldaipeara,T., and Smith,R.D. A comparative study of enterotoxin gene probes and tests for toxin production to detect enterotoxigenic Escherichia coli. J.Infect.Dis. 153:255-260, 1986b.

Edelstein,P.H. Evaluation of the Gen-Probe DNA probe for the detection of Legionella in culture. J.Clin.Microbiol. 23:481-484, 1986.

Eisenach,K.D., Cave,M.D., Bates,J.H., and Crawford,J.T. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for Mycobacterium tubercolosis. J.Infect.Dis. 161:977-981, 1990.

Feinberg,A.P., and Vogelstein,B. A technique for radio-labeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal.Biochem. 137:266-267, 1984.

Feinman,S.V., Berris,B., Guha,A., Sooknanan,R., Bradley,D.W., Bond,W.W., and Maynard,J.E. DNA:DNA hybridization method for the diagnosis of hepatitis B infection. J.Virol.Methods. 8:199-206, 1984.

Forghani,B., Dupuis,K.W., and Schmidt,N.J. Rapid detection of herpes simplex DNA in human brain tissue by in situ hybridization. J.Clin.Microbiol. 22:672-675, 1985.

Franzen,L., Westin,G., and Shabo,R. Analysis of clinical specimens by hybridization with probe containing repetitive DNA from Plasmodium falciparum. Lancet 1:525-527, 1984.

Fucharoen,S., Tirawanchai,N., Wilairat,P., Panyim,S., and Thaithong,S. Differentiation of Plasmodium falciparum clones by means of a repetitive DNA probe. Transaction Royal Soc.Tropical Med.and Hyg. 82:209-211, 1988.

Fung,J.C., Shanley,J., and Tilton,R.C. Comparison of the detection of herpes simplex virus in direct clinical specimens with herpes simplex virus-specific DNA probes and monoclonal antibodies, J.Clin.Microbiol. 22:748-753, 1985.

Garbutt,G.J., Wilson,J.T., Leary,J.J., and Ward,D.C. Use of biotinylated probes for detecting sickle cell anemia. Clin.Chem. 31:1203-1206, 1985.

Gentilomi,G, Musiani,M., Zerbini,M., Gallinella,G., Gibellini,G., and La Placa,M. A hybrido-immunocytochemical assay for the in situ detection of cytomegalovirus DNA using digoxigenin-labeled probes. J.Immunol.Methods 125:177-183, 1989.

Georges,M.C., Wachsmuth,J.K., Birkness,K.A., Moseley,S.L., and Georges,A.J. Genetic probes for enterotoxigenic Escherichia coli isolated from childhood diarrhea in the Central African Republic. J.Clin.Microbiol. 18:199-202, 1983.

Gibson,P.E., Gardner,S.D., and Porter,A.A. Detection of human polyomavirus DNA in urine specimens by hybridot assay. Arch.Virol. 84:233-240, 1985.

Gillespie,D., and Spiegelman,S. A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane. J.Mol.Biol. 12:829-842, 1966.

Gillespie,S., and Gillespie,D. Ribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in aqueous solutions and in solution containing formamide. Biochem.J. 125:481-487, 1971.

Gissman,L., Wolnik,L., Ikenberg,H., Koldovsky,U., Schnurch,H.G., and zur Hausen,H. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80:560-563, 1983.

Granato,P.A., and Franz,M.A.R. Evaluation of a prototype DNA probe test for the noncultural diagnosis of gonorrhea. J.Clin.Microbiol. 27:632-635, 1989.

Green,M.R., Maniatis,T., and Melton,D.A. Human β-globin pre-mRNA synthesized in vitro is accurately spliced in Xenopus oocyte nuclei. Cell 32:681, 1983.

Grimont,P.A.D., Grimont,F., Desplaces,N., and Chen,P. DNA probe specific for Legionella pneumophila. J.Clin.Microbiol. 21:431-437, 1985.

Grunstein,M, and Hogness,D.S. Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. Proc.Natl.Acad.Sci. 72:3961, 1975.

Haase,A.T., Ventura,P., Gibbs Jr.,C.J., and Tourtellotte,W.W. Measles virus nucleotide sequences: Detection by hybridization in situ. Science 212:672-675, 1981.

Harper,M.E., Marselle,L.M., Gallo,R.C., and Wong-Stal,F. Detection of lymphocytes expressing human T-limphotropic virus type III in lymph nodes and peripheral blood from infected individuals by in situ hybridization. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 83:772-776, 1986.

Hochberg,F.H., Miller,G., Schooley,R.T., Hirsch,M.S., Feorino,P., and Henle,W. Central-nervous system lymphoma related to Epstein-Barr virus. N.Engl.J.Med. 309:745-748, 1983.

Hogg,J.C., Irving,W.L., Porter,H., Evans,M., Dunnill,M.S., and Fleming,K. In situ hybridization studies of adenoviral infections of the lung and their relationship to follicular bronchiectasis. Am.Rev.Respir.Dis. 139:1531-1535, 1989.

Horn,J.E., Hammer,M.L., Falkow,S., and Quinn,T.C. Detection of Chlamidia trachomatis in tissue culture and cervical scrapings by in situ DNA hybridization. J.Infect.Dis. 153:1155-1159, 1986.

Horwitz,J.P., Chua,J., Curby,R.J., Tomson,A.J., DaRooge,M.A., Fisher,B.E., Mauricio,J., and Klundt,I. Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity.I. Some substituted 3-indolyl-β-D-glycopyranosides. J.Med.Chem. 7:574, 1964.

Hsu,S.M., Raine,L., and Fanger,H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP)procedures. J.Histochem.Cytochem. 29:577-580, 1981.

Hutton,J.R. Renaturation kinetics and thermal stability of DNA in aqueous solutions of formamide and urea. Nucleic Acid Res. 4:3537-3555,1977.

Hyypia,T., Stalhandske,P., Vainionpaa,R., and Pettersson,U. Detection of enteroviruses by spot hybridization. J.Clin.Microbiol. 19:436-438, 1984.

Innis,M.A., Myambo,K.B., Gelfand,D.H., and Brow,A.D. DNA sequencing with Thermus aquaticus DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:9436-9440, 1988.

Innis,M.A., Gelfand,D.H., Sninsky,J.J., and White,T.J. PCR protocols: A guide to the methods and application. Academic Press Inc. 1989a.

Itakura,K., Rossi,J.J., and Wallace,R.B. Synthesis and use of synthetic oligonucleotides. Annu.Rev.Biochem. 53:323,1984.

Jablonski,E., Moomaw,E.W., Tullis,R.H., and Ruth,J.L. Preparation of oligodeoxynucleotide-alkaline phosphatase conjugates and their use as hybridization probes. Nucleic Acid Res. 14:6115-6128, 1984.

Jansen,R.W., Newbold,J.E., and Lemon,S.M. Combined immunoaffinity cDNA-RNA hybridization assay for detection of hepatitis A virus in clinical specimens. J.Clin.Microbiol. 22:984-989, 1985.

Kelly,R.B., Cozzarelli,N.R., Deutscher,M.P., Lehman,I.R., and Kornberg,A. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XXXII. Replication of duplex deoxyribonucleic acid by polymerase at a single strand break. J.Biol.Chem. 245:39, 1970.

Kidd,A.H., Harley,E.H., and Erasmus,M.J. Specific detection and typing of adenovirus types 40 and 41 in stool specimens by dot-blot hybridization, J.Clin.Microbiol. 22:934-939, 1985.

Kim,H.S., and Smithies,O. Recombinant fragment assay for gene targeting based on the polymerase chain reaction. Nucleic Acid Res. 16:8887-8903, 1988.

Koch,J., Gregerson,N., Kolvraa,S., and Bolund,L. The use of biotinylated hybridization probes for routine analysis of unique sequences in DNA. Nucleic Acid Res. 14:7133, 1986.

Kopecka,H., Prevot,J., Girard,M., Fuchs,F., and Aymard,M. Advantage of cRNA probes (riboprobes) synthesized in vitro in the detection of enteroviruses by molecular hybridization. Ann.Inst.Pasteur Virol. !39:217-225, 1988.

Kemp,D.J., Smith,D.B., Foote,S.J., Samaras,N., and Peterson,M.G. Colorimetric detection of specific DNA segments amplified by polymerase chain reaction. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:2423-2427, 1989.

Kotaka,T., and Baldwin,R.L. Effects of nitrous acid on the dAT copolymer as a template for DNA polymerase. J.Mol.Biol. 9:323-339, 1964.

Lancaster,W.D., Kurman,R.J., Sanz,L.E., Perry,S., and Jenson,A.B. Human papillomaviruses: Detection of viral DNA sequences and evidence for molecular heterogeneity in metaplasias and dysplasias of the uterine cervix. Intervirology 20:202-212, 1983.

Langer,P.R., Waldrop,A.A., and Ward,D.C. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:6633-6637, 1981.

Lawyer,F.C., Stoffel,S., Saki,R.K., Myambo,K., Drummond,R., and Gelfand,D.H. Isolation, characterization, and expression in Escherichia coli of the DNA polymerase gene from Thermus aquaticus. J.Biol.Chem. 264:6427-6437, 1989.

Leary,J.J., Brigati,D.J., and Ward,C. Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 80:4045-4049, 1983.

Legault-Demare, Desseaux,B, Heyman,T., Seror,S., and Ress,G.P. Studies on hybrid molecules of nucleic acids.I.DNA-DNA hybrids on nitrocellulose filters. Biochem.Biophys.Res.Commun. 28:550-557, 1967.

Lewin,B. Gene IV. Oxford University Press. 1990.

Lie-Injo,L.E., Balasegaram,M., Lopez,C.G., and Herrera,A.R. Hepatitis B virus DNA in liver and white blood cells of patients with hepatoma. DNA 2:301-308, 1983.

Litwin,C.M., Ryan,K.J., Chipowsky,S., Storm,A., and McCombie,S. Molecular epidemiology of Shigella sonnei in Pima County, Arizona: evidence for a Mexico-related plasmid. J.Infect.Dis. 161:797-800, 1990.

Loche,M., and Mach,B. Identification of HIV-infected seronegative individuals by a direct diagnostic test based on hybridization to amplified viral DNA. Lancet 2:418-421, 1988

Maniatis,T., Jeffrey,A., and Kleid,D.G. Nucleotide sequence of the rightward operator of phage lambda. Proc.Natl.Acad.Sci. 72:1184, 1975.

Maniatis,T, Fritsch,E.F., and Sambrook,J. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 1989a.

Marmur,J., and Doty,P. Thermal renaturation of deoxyribonucleic acids. J.Mol.Biol. 3: 585-594, 1961 b.

Marmur,J., and Lane,D. Strand separation and specific recombination in deoxyribonucleic acids: Biological studies. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 46:453-461,1960.

Martin,D.C., Katzenstein,D.A., Yu,G.S.M., and Jor-don,M.C. Cytomegalovirus viremia detected by molecular hybridization and electron microscopy. Ann.Intern.Med. 100:222-225,1984.

Mathijs,J.M., Hing,M., Grierson,J., Dwyer,D.E., Goldschmidt,C., Cooper, D.A., and Cunningham,A.L. HIV infection of rectal mucosa. Lancet 1:1111, 1988.

Melchers,W.J.G., Herbrink,P., Walboomers,J.M.M., Meijer,C.J.L.M., Drift,H.V.D., Lindeman,J., and Quint,W.G.V. Optimization of human papillomavirus genotype detection in cervical scrapes by a modified filter in situ hybridization test. J.Clin.Microbiol. 27:106-110, 1989.

Melton,D.A., Krieg,P.A., Rebagliati,M.R., Maniatis,T., Zinn,K., and Green,M.R. Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. Nucleic Acid Res. 12:7035, 1984.

Moseley,S.L., Huq,I., Alim,A.R.M.A., So,M., Samadpour-Motalibi,M., and Falkow,S. Detection of enterotoxigenic Escherichia coli by DNA colony hybridization. J.Infect.Dis. 142:892-898, 1980.

Moseley,S.L., Echeverria,P., Seriwatana,J., Tirapat,C., Chaicumpa,W., Sakuldaipeara,T, and Falkow,S. Identification of enterotoxigenic Escherichia coli by colony hybridization using three enterotoxin gene probes. J.Infect.Dis. 145:863-869, 1982a.

Mullis,K.B., Faloona,F.A., Scharf,S.J., Saiki,R.K., Horn,G.T., and Erlich,H.A. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro : the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 51:263-273,1986.

Mullis,K.B., and Faloona,F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalized chain reaction. Methods Enzymol. 155:335-350,1987a.

Murray,N.E., and Murray,K. Manipulation of restriction targets in phage lamda to form receptor chromosome for DNA fragments. Nature 251:476,1974.

Musiani,M., Gentilomi,G., Zerbini,M., Gibellini,D., Gallinella,G., Pileri,S., Baglioni,P., and LaPlaca,M. In situ detection of cytomegalovirus DNA in biopsies of AIDS patients using a hybrido-immunocytochemical assay. Histochemistry 94:21-25, 1989.

Musiani,M., Zerbini,M., Gentilomi,G., Gallinella,G., Venturoli,S., Gibellini,D., and LaPlaca,M. Rapid detection of cytomegalovirus DNA in urine samples with a dot blot hybridization immunoenzymatic assay. J.Clin.Microbiol. 28:2101-2103, 1990a.

Musiani,M., Zerbini,M., Gibellini,D., Gentilomi,G., Venturoli,S., Gallinella, G., Ferri,E., and Girotti,S. Chemiluminescent dot blot hybridization assay for the detection of B19 parvovirus DNA in human sera. J.Clin.Microbiol. 1991 (in press).

Nago,R., Hayashi,K., Ochiai,H., Kubota,Y., and Niwayama,S. Detection of herpes simplex virus type 1 in herpetic ocular diseases by DNA-DNA hybridization using a biotinylated DNA probe. J.Med.Virol. 25:259-270, 1988.

Narang,S.A., Brousseau,R., Hsiung,H.M., and Michnie-wicz,J.J. Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides by the modified triester method. Methods Enzymol. 65:610, 1980.

Olive,D.M. Detection of enterotoxigenic Escherichia coli after polymerase chain reaction amplification with a thermostable DNA polymerase. J.Clin.Microbiol. 27:261-265, 1989.

Palva,A., Jousimies-Somer,H., Saikku,P., Vaananen,P., Soderlund,H., and Ranki,M. Detection of Chlamidia trachomatis by nucleic acid sandwich hybridization. FEMS Microbiol.Lett. 23:83-89, 1984.

Pao,C.C., Benedict Yen,T.S., Jinn-Bang You, Juehn-Shin Maa, Fiss,E.H., and Chau-Hsiung Chang. Detection and identification of Mycobacterium tubercolosis by DNA amplification. J.Clin.Microbiol. 28:1877-1880, 1990.

Patel,R.J., Fries,J.W.U., Piessens,W.F., and Wirth,DF. Sequence analysis and amplification by polymerase chain reaction of a cloned DNA fragment for identification of Mycobacterium tubercolosis. J.Clin.Microbiol. 28:513-518, 1990.

Perine,P.L., Totten,P.A., Holmes,K.K., Sng,E.H., Ratnam, A.V., Widy-Wersky,R., Nsanze,H., Habte-Gabr,E., and Westbrook,W.J. Evaluation of DNA hybridization method for detection of African and Asian strains of Neisseria gonorrhoeae in men with urethritis. J.Infect.Dis. 152:59-63, 1985.

Peterson,E.M., Oda,R., Alexander,R., Greenwood,J.R., and De La Maza,L.M. Molecular techniques for detection of Chlamydia trachomatis. J.Clin.Microbiol. 27:2359-2363, 1989.

Petruska,J., Goodman,M.F., Boosalis,M.S.,Sowern,L.C., Chaejoon,C., and Tinoco,I. Comparison between DNA melting thermodynamics and DNA polymerase fidelity. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:6252-6256,1988.

Phair,J.P., and Wolinsky,S. Diagnosis of infection with the human immunodeficiency virus J.Infect.Dis. 159:320-323, 1989.

Plummer,F.A., Hammond,G.W., Forward,K., Selka,L., Thompson,L.M., Jones,S.E., Kidd,I.M., and Anderson,M.J. An erythema infectiosum-like illness caused by human parvovirus infection. N.Engl.J.Med. 313:74-79, 1985.

Porter-Jordan, K., Rosenberg, E.I., Keiser, J.F., Gross, J.D., Ross, A.M., Nasim, S., and Garrett, C.T. Nested polymerase chain reaction assay for the detection of cytomegalovirus overcomes false positives caused by contamination with fragmented DNA? J.Med. Virol. 30:85-91, 1990.

Quibriac,M., Petitjean,J., Novel,M., and Freymuth,F. Non-radioactive spot hybridization test for detection of hepatitis B virus DNA in serum. Ann.Inst.Pasteur Virol. 138:377-384, 1987.

Rambach,A., and Tiollais,P. Bacteriophage lambda having EcoRI endonuclease sites only in the nonessential region of the genome. Proc.Natl.Acad.Sci. 71:3927, 1974.

Ranki,M., Virtanen,M., Palva,A., Laaksonen,M., Petterson,R., Kaariainen,L., Halonen,P., and Soderlund,H.. Nucleic acid sandwich hybridization in adenovirus diagnosis. Curr.Top.Microbiol.Immunol. 104:307-318, 1983.

Ratti,G., Moroni,A., and Cevenini,R. Detection of Chlamydia trachomatis DNA in patients with non-gonococcal urethritis by the polymerase chain reaction. J.Clin.Pathol. 1991 (in press).

Redfield,D.C., Richman,D.D., Albanil,S., Oxman,M.O., and Wahl,G.M. Detection of herpes simplex virus in clinical specimens by DNA hybridization. Diagn.Microbiol.Infect.Dis. 1:117-128, 1983.

Renz,M., and Kurz,C. A colorimetric method for DNA hybridization. Nucl. Acid Res. 12 : 3435-3444, 1983.

Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C., and Berg,P. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation whith DNA polymerase I.J. Mol. Biol. 113 : 237-251, 1977.

Roberts, M.C., and Coyle, M.B. Whole-chromosomal DNA probes for the rapid identification of Mycobacterium tubercolosis and Mycobacterium avium complex. Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. C-167, 1986.

Rotbart,H.A., Levin,M.J., and Villareal,L.P. Use of subgenomic poliovirus DNA hybridization probes to detect the major subgroups of enteroviruses. J.Clin.Microbiol. 20:1105-1108, 1985.

Rotbart,H.A., Levin,M.J., Villareal,L.P., Tracy,S.M., Semler,B.L., and Wimmer,E. Factors affecting the detection of enteroviruses in cerebrospinal fluid with coxsackievirus B3 and poliovirus 1 cDNA probes. J.Clin.Microbiol. 22:220-224, 1985a.

Rotbart,H.A., Abzug,M.J., Murray,R.S., Murphy,N.L., and Levin,M.J. Intracellular detection of sense and antisense enteroviral RNA by in situ hybridization. J.Virol.Methods 22:295-301, 1988b.

Rotbart,H.A. Human enterovirus infections: molecular approaches to diagnosis and pathogenesis. In Molecular aspects of picornavirus infection and detection. Publ. by: American Society for Microbiology, Washington,DC (USA), 243-264, 1989c.

Rubin,F.A., Kopecko,D.J., Noon,K.F., and Baron,L.S. Development of a DNA probe to detect Salmonella typhy. J.Clin.Microbiol. 22:600-605, 1985.

Rubin,F.A., Kopecko,D.J., Sack,R.B., Sudarmono,P., Yi,A., Maurta,D., Meza,R., Moechtar,M.A., Edman,D.C., and Hoffman,S.L. Evaluation of a DNA probe for identifying Salmonella typhi in Peruvian and Indonesian bacterial isolates. J.Infect.Dis. 157:1051-1053, 1988a.

Sack,D.A., and Sack,R.B. Test for enterotoxigenic Escherichia coli using Y1 adrenal cells in miniculture. Infect.Immun. 11:334-336, 1975.

Saiki,R.K., Gelfand,D.H., Stoffel,S., Scharf,S.J., Higuchi,R., Horn,G.T., Mullis,K.B., and Erlich,H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239:487-491, 1988.

Sakamoto,H., Traincard,F., Vo-Quang,T., Ternynck,T., Guesdon,J.L., and Avrameas,S. 5-Bromodeoxyuridine in vivo labeling of M13 DNA and its use as a non-radioactive probe for hybridization experiments. Mol.Cell.Probes 1:109-120, 1987.

Schenborn,E.T., and Mierendorf,R.C. A novel transcription property of SP6 and T7 polymerases: Dependence on template structure. Nucleic Acid Res. 13:6223, 1985.

Schmeckpeper,B.J., and Smith,K.D. Use of formamide in nucleic acid reassociation. Biochemistry 11:1319-1326, 1972.

Schneider,A., and Grubert,T. Diagnosis of HPV infection by recombinant DNA technology. In Genital human papilloma virus infection. H.Krebs (ed.), 127-140, 1989.

Scotto,J., Hadchouel,M., Hery,C., Yvart,J., Tiol-lais,P., and Brechot,C. Detection of hepatitis B virus DNA in serum by a simple spot hybridization technique: Comparison with results for other viral markers. Hepatology 3:279-284, 1983.

Seidlin,M., Takiff,H.E., Smith,H.A., Hay,J., and Straus,S.E. Detection of varicella-zoster virus by dot-blot hybridization using a molecularly cloned viral DNA probe. J.Med.Virol. 13:53-61, 1984.

Seriwatana,J., Echeverria,P., Escamilla,J., Glass,R., Huq,I., Rockhill,R., and Stoll,B.J. Identification of Escherichia coli in patients with diarrhea in Asia with three enterotoxin gene probes. Infect.Immun. 42:152-155, 1983.

Sethabutr,O., Hanghalay,S., Echeverria,P., Taylor,D.N., and Leksomboon,U. A non-radioactive DNA probe to identify Shigella and enteroinvasive Escherichia coli in stools of children with diarrhea. Lancet 2:1095-1097, 1985.

Shaw,G.M., Hahn,B.H., Arya,S.K., Groopman,J.E., Gallo,R.C., and Wong-Staal,F. Molecular characterization of human T-cell leukemia (lymphotropic)virus type III in the acquired immune deficiency syndrome. Science 226:1165-1171, 1984.

Shaw,G.M., Harper,M.E., Hahn,B.H., Epstein,L.G., Gajdusek,D.C., Price,R.W., Navia,B.A., Petito,C.K., O'Hara,C.J., Groopman,J.E., Cho,E.S., Oleske,J.M., Wong-Staal,F., and Gallo,R.C. HTLV III infection in brains of children and adults with AID" encephalopathy. Science 227:177-182, 1985a.

Shaw,S.B., Boas,L., Cabanas,D.K., et al. A rapid DNA probe assay for the specific detection of Mycoplasma pneumoniae. Abstr.Annu.Meet.Am.Soc.Microbiol. G-24, 1986.

Shibata,D., Sfu,Y., Gupta,J.W., Shah,K.V., Arnheim,N., and Martin,W.J. Detection of human papillomavirus in normal and dysplastic tissue by polymerase chain reaction. Lab.Invest. 59:555, 1988.

Shoemaker,S.A., Fisher,J.H., and Scoggin,C.H. Techniques of DNA hybridization detect small numbers of mycobacteria with no cross-hybridization with nonmycobacterial respiratory organisms. Am.Rev.Respir. Dis. 131:760-763, 1985.

Sixbey,J.W., Nedrud,J.G., Raab-Traub,N., Hanes,R.A., and Pagno,J.S. Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. N.Engl.J.Med. 310:1225-1230, 1984.

Spector,S.A., Rua,J.A., Spector,D.H., and McMillan,R. Detection of human cytomegalovirus in clinical specimens by DNA-DNA hybridization. J.Infect.Dis. 150:121-126, 1984.

Stalhandske,P., Hyypia,T., Gadler,H., Halonen,P., and Pettersson,U. The use of molecular hybridization of demonstration of adenoviruses in human stools. Curr.Top.Microbiol.Immunol. 104:299-306, 1983.

Starnbach,M.N., Falkow,S., and Thompkins,L.S. Species-specific detection of Legionella pneumophila in water by DNA amplification and hybridization. J.Clin.Microbiol. 27:1257-1261, 1989.

Sternberg,N., Tiemeier,D., and Enquist,L. In vitro packaging of a lambda Dam vector containing EcoRI DNA fragments of Escherichia coli and phage P1. Gene 1:255, 1977.

Studier,F.W., and Rosenberg,A.H. Genetic and physical mapping of bacteriophage T7 DNA by use of cloned fragments of T7 DNA. J.Mol.Biol. 153:503, 1981.

Swaminathan,B., and Prakash,G. Nucleic acid and monoclonal antibody probes. M.Dekker editor, New York-Basel, 1989.

Tabor,S., and Richardson,C.C. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. Proc.Natl.Acad.Sci. 82:1074, 1985.

Takiff,H.E., Seidlin,M., Krause,P., Rooney,J., Brandt,C., Rodriguez,W., Yolken,R.,and Straus,S.E. Detection of enteric adenoviruses by dot-blot hybridization using a molecularly cloned viral DNA probe. J.Med.Virol. 16:107-118, 1985.

Tchen,P., Fuchs,R.P.P., Sage,E., and Leng,M. Chemically modified nucleic acids as immunodetectable probes in hybridization experiments. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:3466-3470, 1984.

Thein,S.L., and Wallace,R.B. The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders. In Human genetic diseases: a practical approach (ed.K.E. Davis), p. 33-50. IRÃ Press, Herndon, Virginia, 1986.

Thomas,P.S. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:5201-5205, 1980.

Tomizawa,J., Sakakibara,Y., and Kakefuda,T. Replication of colicin E1 plasmid DNA in cell extracts. Origin and direction of replication. Proc.Natl.Acad.Sci. 71:2260, 1974.

Totten,P.A., Holmes,K.K., Handsfield,H.H., Knapp,J.S., Perine,P.L., and Falkow,S. DNA hybridization techniques for the detection of Neisseria gonorrhoeae in men with urethritis. J.Infect.Dis. 152:59-63, 1985.

Ullmann,A., Jacob,F., and Monod,J. Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the β-galactosidase structural gene of Escherichia coli. J.Mol.Biol. 24:339, 1967.

Ullman,J.S., and McCarthy,B.J. Alkali deamination of cytosine residues in DNA. Biochim.Biophys.Acta 294:396-404,1973.

Ullman,J.S., and McCarthy,B.J. The relationship between mismatched base pairs and the thermal stability of DNA duplexes. Biochim.Biophys.Acta 294:416-424, 1973a.

Vallejos,H., Del Mistro,A., Kleinhaus,S., Braunstein,J.D., Halwer,M., and Koss,L.G. Lab.Invest. 56:611-615, 1987.

Virtanen,M., Palva,A., Laaksonen,M., Halonen,P., Soderlund,H., and Ranki,M. Novel test for rapid viral diagnosis: Detection of adenovirus in nasopharyngeal mucus aspirates by means of nucleic acid sandwich hybridization. Lancet 1:381-383, 1983.

Virtanen,M., Syvanen,A., Oram,J., Soderlund,H., and Ranki,M. Cytomegalovirus in urine: Detection of viral DNA by sandwich hybridization. J.Clin.Microbiol. 20:1083-1088, 1984a.

Vogelstein,B., and Gillespie,D. RNA-DNA hybridization in solution without DNA reannealing. Biochem.Biophys.Res.Commun. 28:550-557, 1977.

Weiss,L.M., and Movahed,L.A. In situ demonstration of Epstein-Barr viral genomes in viral-associated B cell lymphoproliferation. Am.J.Pathol. 134:651-659, 1989.

Wilkinson,H.W., Sampson,J.S., and Plikaytis,B.B. Evaluation of a commercial gene probe for identification of Legionella cultures. J.Clin.Microbiol. 23:217-220, 1986.

Wirth,D.F., and Pratt,D.M. Rapid identification of Leishmania species by specific hybridization of kinetoplast DNA in cutaneous lesions. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79:6999-7003, 1982.

Wolf,H., Haus,M., Wilmes,E. Persistence of Epstein-Barr virus in the parotid gland. J.Virol. 51:795-798, 1984.

Woods,G.L., and Yam,P. Detection of herpes simplex virus in clinical specimens using a DNA probe after centrifugal inoculation of A94π cells. J.Virol.Methods 23:339-343, 1989.

Zerbini,M., Musiani,M., Venturoli,S., Gallinella,G., Gibellini,G., Gentilomi,G., and LaPlaca,M. Rapid screening for B19 parvovirus in clinical specimens with a digoxigenin-labeled DNA hybridization probe. J.Clin.Microbiol. 28:2496-2499, 19

Ringraziamenti

Si ringraziano le Proff. Monica Musiani e Marialuisa Zerbini per la lettura critica e l'aiuto nella correzione del testo.

Indice

Istruzioni per gli Autori.....pag. 2
Editoriale..... » 3
Presentazione ..... » 5
Introduzione..... » 7
Endonucleasi di restrizione..... » 7
Vettori di clonazione ..... » 8
Identificazione delle colonie batteriche che contengono plasmidi ricombinanti..... » 10
1. Analisi di restrizione ..... » 10
2. α - complementazione ..... » 10
3. Inattivazione per inserzione..... » 12
4. Screening mediante ibridazione ..... » 14
Le sonde a DNA..... » 16
Metodi di marcatura delle sonde ..... » 18
1. Fosforilazione dell'estremo 5'..... » 18
2. Marcatura dell'estremo 3'..... » 19
3. Nick-translation..... » 19
4. Random primer ..... » 19
Le sonde ad RNA..... » 22
Vettori plasmidici per la costruzione di sonde ad RNA ..... » 24
Costruzione di sonde genetiche mediante sintesi di oligonucleotidi ..... » 26
Ibridazione degli acidi nucleici..... » 27
Denaturazione del DNA..... » 27
a. Ibridazione in soluzione..... » 30
b. Ibridazione su matrice solida (o su filtro o dot blot ibridazione) .. » 30
c. Ibridazione in situ ..... » 30
Sistemi di rivelazione..... » 31
Metodi di amplificazione..... » 36
Polymerase chain reaction..... » 36
Nested P. C. R..... » 39
Ligase chain reaction ..... » 39
Ibridazione a sandwich ..... » 39
Ibridazione a "strand displacement" ..... » 39
Preparazione dei campioni..... » 41
Impiego delle sonde genetiche nella diagnostica microbiologica ..... » 42
A. Gastroenteriti..... » 42
1. E. coli enterotossigenica (ETEC) ..... » 42
2. Shighelle ed E. coli enteroinvasive (EIEC) ..... » 43

3. Salmonella typhi ..... » 43
4. Rotavirus ..... » 43
5. Adenovirus enterici ..... » 44
C. Infezioni del tratto respiratorio ..... » 44
1. Legionelle ..... » 44
2. Adenovirus ..... » 45
3. Citomegalovirus (CMV) ..... » 45
4. Mycoplasma pneumoniae ..... » 45
5. Micobatteri ..... » 46
D. Malattie a trasmissione sessuale ..... » 47
1.Chlamidia trachomatis ..... » 47
2. Neisseria gonorrhoeae ..... » 47
3.Herpes Simplex virus (HSV) ..... » 48
4. Virus dell'immunodeficienza acquisita (HIV I) ..... » 48
5.Treponema pallidum ..... » 48
6. Papillomavirus umani (HPV) ..... » 49
E. Meningiti ed encefaliti ..... » 49
1. Enterovirus ..... » 49
2. Herpes simplex virus ..... » 49
3. Panencefalite Subacuta Sclerosante (SSPE) ..... » 50
F. Malattie cutanee ..... » 50
1.Virus della varicella-zoster (VZV) ..... » 50
2. Leishmanie ..... » 50
G. Epatiti ..... » 51
1.Epatiti A e B ..... » 51
H. Sindromi varie ..... » 51
1. Poliomavirus ..... » 51
2. Parvovirus ..... » 51
3. Plasmodi ..... » 52
4. Virus di Epstein-Barr (EBV) ..... » 52
Conclusioni ..... » 53
Bibliografia ..... » 54
Indice ..... » 70
Volumi pubblicati nella collana Caleidoscopio ..... » 72
Volumi pubblicati nella collana Caleidoscopio letterario ..... » 74
Volumi pubblicati nella collana Caleidoscopio Edizione Spagnola ..... » 74
Videoteca Medical Systems ..... » 75
Concorso Pittura ..... » 76
Borsa di studio "I retrovirus" ..... » 77

Volumi pubblicati nella Collana Caleidoscopio

Medical Systems S.p.A.

TECNOLOGIA

1. **Rassu S.:** ***Principi generali di endocrinologia.*** **Gennaio '83**
2. **Rassu S.:** ***L'ipotalamo endocrino.*** **Giugno '83**
3. **Rassu S.:** ***L'ipofisi.*** **Dicembre '83**
4. **Alagna., Masala A.:** ***La prolattina.*** **Aprile '84**
5. **Rassu S.:** ***Il pancreas endocrino.*** **Giugno '84**
6. **Fiorini I., Nardini A.:** ***Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza).*** **Luglio '84.**
7. **Rassu S.:** ***L'obesita'.*** **Settembre '84**
8. **Franceschetti F., Ferraretti A.P, Bolelli G.F., Bulletti C.:*****Aspetti morfofunzionali dell'ovaio.*** **Novembre '84.**
9. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (1).*** **Dicembre '84.**
10. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima.*** **Gennaio'85.**
11. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda.*** **Febbraio '85.**
12. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima.*** **Aprile '85.**
13. **Nacamulli D, Girelli M.E, Zanatta G.P, Busnardo B.:** ***Il TSH.*** **Giugno '85.**
14. **Facchinetti F. e Petraglia F.:** ***La ß-endorfina plasmatica e liquorale.*** **Agosto '85.**
15. **Baccini C.:** ***Le droghe d'abuso (1).*** **Ottobre '85.**
16. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda.*** **Dicembre '85.**
17. **Nuti R.:** ***Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale.*** **Febbraio '86**
18. **Cavallaro E.:** ***Ipnosi: una introduzione psicofisiologica.*** **Marzo '86.**
19. **Fanetti G.:** ***AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti.*** **Maggio '86.**
20. **Fiorini I., Nardini A.:** ***Toxoplasmosi, immunologia e clinica.*** **Luglio '86.**
21. **Limone P.:** ***Il feocromocitoma.*** **Settembre '86.**
22. **Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.:** ***Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici.*** **Novembre '86.**
23. **Bolcato A.:** ***Allergia.*** **Gennaio '87.**
24. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio enzimoimmunologico ed fluoroimmunologico.*** **Febbraio '87.**
25. **Carani C.:** ***Patologie sessuali endocrino-metaboliche.*** **Marzo '87.**
26. **Sanna M., Carcassi R., Rassu S.:** ***Le banche dati in medicina.*** **Maggio '87.**
27. **Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.:** ***L'amenorrea.*** **Giugno '87.**
28. **Zilli A., Pagni E., Piazza M.:** ***Il paziente terminale.*** **Luglio '87.**
29. **Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.:** ***Patologie prostatiche.*** **Settembre '87.**
30. **Cingolani M.:** ***Manuale di ematologia e citologia ematologica.*** **Novembre '87.**
31. **Kubasik N.P.:** ***Ibridomi ed anticorpi monoclonali.*** **Gennaio '88.**
32. **Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.:** ***Diagnostica del carcinoma mammario.*** **Febbraio '88.**
33. **Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.:*****Neuroendocrinologia dello stress.*** **Marzo '88.**

34. Guastella G., Cefalù E., Carmina M.: ***La fecondazione in vitro.*** **Maggio '88.**
35. Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.: ***Il gozzo nodulare.*** **Giugno ’88.**
36. Baccini C.: ***Le droghe d’abuso (2).*** **Luglio ’88.**
37. Piantino P., Pecchio F.: ***Markers tumorali in gastroenterologia.*** **Novembre ’88.**
38. Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.: ***Le leucemie acute infantili.*** **Gennaio ’89.**
39. Sommariva D., Branchi A.: ***Le dislipidemie.*** **Febbraio '89.**
40. Butturini U., Butturini A.: ***Aspetti medici delle radiazioni.*** **Marzo '89.**
41. Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.: ***Diagnostica delle neoplasie colo-rettali.*** **Aprile '89.**
42. Palleschi G.: ***Biosensori in Medicina.*** **Maggio '89.**
43. Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.: ***HTLV-I.*** **Giugno '89.**
44. Fanetti G.: ***Emostasi: fisiopatologia e diagnostica.*** **Luglio '89.**
45. Contu L., Arras M..: ***Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie.*** **Settembre '89.**
46. Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.: ***Immunologia dell'occhio.*** **Ottobre '89.**
47. Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E. : ***Infezioni opportunistiche in corso di AIDS.*** **Gennaio '90.**
48. Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P. : ***La coriogonadotropina umana.*** **Febbraio '90.**
49. Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.: ***L'immunologia del diabete mellito*****. Marzo '90.**
50. Cappi F.: ***La trasfusione di sangue: terapia a rischio*****. Aprile '90.**
51. Tortoli E., Simonetti M.T.: ***I micobatteri*****. Maggio '90.**
52. Montecucco C.M., Caporali R., De Gennaro F.: ***Anticorpi antinucleo*****. Giugno '90.**
53. Manni C., Magalini S.I. e Proietti R.: ***Le macchine in terapia intensiva.*** **Luglio '90.**
54. Goracci E., Goracci G.: ***Gli allergo-acari.*** **Agosto '90.**
55. Rizzetto M.: ***L'epatite non A non B (tipo C).*** **Settembre '90.**
56. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Razzini E. e Gulminetti R.: ***Infezione da HIV-1:patogenesi ed allestimento di modelli animali*****. Ottobre '90.**
57. La Vecchia C. ***Epidemiologia e prevenzione del cancro (I).*** **Gennaio '91.**
58. La Vecchia C. ***Epidemiologia e prevenzione del cancro (II).*** **Febbrauio '91.**
59. Santini G.F., De Paoli P., Mucignat G., e Basaglia G., Gennari D.: ***Le molecole dell'adesività nelle cellule immunocompetenti.*** **Marzo '91.**
60. Bedarida G., Lizioli A.: ***La neopterina nella pratica clinica.*** **Aprile '91.**
61. Romano L.: ***Valutazione dei kit immunochimici.*** **Maggio '91.**
62. Dondero F. e Lenzi A.: ***L'infertilità immunologica*****. Giugno '91.**
63. Bologna M. Biordi L. Martinotti S.: ***Gli Oncogèni*****. Luglio '91.**
64. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Gulminetti R., Razzini E., Zambelli A. e Scevola D.: ***Infezione-malattia da HIV in Africa*****. Agosto '91.**
65. Signore A., Chianelli M., Fiore V., Pozzilli P., Andreani D. ***L'immunoscintigrafia nella diagnosi delle endocrinopatie autoimmuni.*** **Settembre '91.**
66. Gentilomi G.A.: ***Sonde genetiche in microbiologia*****. Ottobre '91.**

Caleidoscopio Letterario

1. Messina R.A.: *Vetri d'aria*. Novembre '90.
2. Pascarella S.: *Sui sentieri dell'anima*. Gennaio '91.
3. Mancini C.: *Scarti di logica.* Aprile '91.
4. Sanchetti P.: *Cronache.* Luglio '91.

Caleidoscopio (Ed. Española)

1. Piantino P. y Pecchio F.: *Marcadores tumorales en gastroenterologia*. Enero '91.
2. Bolcato A.: *Alergia*. Abril '91.
3. Cordido F., Peñalva A., De La Cruz L.F., Casanueva F.F. y Dieguez C.: *Hormona de Crecimiento.* Julio '91.
4. Di Maggio C., Andreoli C., Costa A. y Farante G.: *Neoplasias mamarias: métodos de diagnóstico.* Octubre '91.

Ad ogni passo nasce un pensiero!!!!!

Abbiamo una esperienza ultradecennale.
Abbiamo pubblicato riviste in italiano, inglese, francese, spagnolo, albanese...
Abbiamo distribuito le nostre riviste in tutto il mondo: dalle Americhe all'Australia, dall'Europa alla Cina, dall'Africa alla Confederazione degli Stati Indipendenti.

MEDICAL SYSTEMS S.P.A.

....IL FUTURO HA IL CUORE ANTICO

Editor in Chief: Dott. Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
Tel. e Fax 079 270464
Amministrazione: Medical Systems S.p.A.
Via Rio Torbido, 40 - 16165 Genova (Italy)
Tel. (010) 83401 Numero Verde 167 8 01005 (senza prefisso);
Telex 270310 Ideal I.
Telefax (010) 803498- 809070.

EDITORE

Abbiamo deciso di mettere a Vostra disposizione la nostra esperienza, la nostra passione, le nostre tecnologie
per la pubblicazione di Atti di Congressi,
per la ideazione e realizzazione di riviste scientifiche, per la pubblicazione di libri e monografie, per la raccolta e stampa di articoli scientifici.....

Consultateci!!!!!!

Caleidoscopio
Collana monografica di Medicina
anno 9, numero 66

user data-star
A service of Radio-Suisse

Direttore Responsabile
Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
Tel. Fax e Modem (079) 270464

Responsabile Commerciale
Alessandra Pater

European Association of Science Editors
EASE

Consulenti di Redazione
Giancarlo Mazzocchi
Angelo Maggio

Segretaria di Direzione
Fiorella Gaggero

Servizio Abbonamenti
Fina Grandeppieno
Giuseppe Gambetta

Editore
Medical Systems S.p.A.
TECNOLOGIA

Via Rio Torbido, 40
16165 Genova (Italy)
Tel. (010) 83401 (7 linee r.a.) Numero Verde 1678 01005 (senza prefisso);
Telex 270310 Ideal I.
Telefax (010) 809737- 802257.
La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Caleidoscopio (Ed. Española), Kaleidoscope (English Ed.), Caleidoscopio letterario, Pandora, Tribuna Biologica e Medica, The Medical Systems Voice, Journal of Preventive Medicine and Hygiene.

Stampa
ATA-Azienda Tipografi Associati
Via G. Torti, 32 C Rosso
16143 Genova - Tel. 010 503320

Registrazione Tribunale di Sassari n. 189 del 6/11/84
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989

Finito di stampare: Ottobre 1991
Sped. in Abb. Post. gr. III/70%

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento professionale continuo e riservata ai medici.

Associata all'USPI
Unione Stampa Periodica Italiana

USPI

Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:
"L'ECO DELLA STAMPA"
Via Compagnoni, 28 - Milano

SAGGIO FUORI COMMERCIO ESENTE IVA E BOLLA DI ACCOMPAGNAMENTO (Art. 4 - 3/8/6 DPR 627/78)

IMMULITE®

Accesso Random
Unico per sensibilità

Dosaggi disponibili

B2-Microglobulina
TSH 3° Generazione
TSH Rapido
T Uptake
T3
T4
PTH Intatto
C-Peptide
Ferritina
AFP
CEA
TPS
FSH
LH
hGH
Cortisolo
Digossina
Digitossina
Acido Folico
PAP
PSA
PSA Libero
PSA 3° Generazione
CA 19.9 (GI-MA)
CA 125 (OM-MA)
HCG (Total/Beta)
Prolattina
Progesterone
Free T4
AlaTOP Allergy Screen
Allergy Pannello Alimenti (FP5)
IgE Totali
CMV IgG
Herpes I & II IgG
Rubella IgG
Toxoplasma IgG
DHEA-SO4
Estradiolo

Di prossima disponibilità:

CA 15.3 (BR-MA), HPL, CMV IgM, Herpes IgM, Rubella IgM, Toxo IgM, IL-2R, IL-8, SHBG, TBG, Testosterone, Teofillina, Tireoglobulina, Vitamina B 12

PSA IMMULITE®
Free & 3° Generazione

PRIMI ed *UNICI* tests per il dosaggio di :
- PSA Ultra-SENSIBILE (Free+ACT-PSA) &
- PSA LIBERO (non complessato ad ACT) in:

- Completa Automazione con Accesso Random Immediato, Caricamento in Continuo e Gestione Campioni Urgenti in Tempo Reale, 24 ore su 24
  PIU'
- Separazione con Lavaggio Centrifugo (NSB < 0.002 Parti per Milione)
  PIU'
- Chemiluminescenza Amplificata ad Elevate Prestazioni, con Dioxetano (Lumigen®PPD) e Fosf.Alcalina (Sens.Segnale: 10^{-21} Moli di Coniugato)
  PIU'
- Stabilità Emissione Segnale: 12 Letture di Ogni Campione in 30 secondi
  PIU'
- Stabilità Calibrazione: 2 settimane
  PIU'

* Risultato in 70 min. (successivi ogni 30 secondi)	
* Estrema Sensibilità: 0.008 ng/ml	
* Ridotto Volume del Campione:	
- PSA 3° Generazione:	50 µl di siero
- Free PSA:	25 µl di siero
* "Working Range":	
- PSA 3° Generazione:	0.01-20 ng/ml
- Free PSA:	0.01-100 ng/ml
* No Effetto Gancio/Prozona:	
- PSA 3° Generazione:	sino a 90.000 ng/ml
- Free PSA:	sino a 10.500 ng/ml

MEDICAL SYSTEMS S.p.A.
IL FUTURO HA IL CUORE ANTICO