

03072

3
20
1



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES
Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y
HUMANIDADES

DETECCION DE *Entamoeba histolytica* POR MEDIO
DE LA REACCION EN CADENA CON DNA
POLIMERASA Y LA LIBERACION ENZIMATICA
DE HIBRIDOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A:

GEORGINA ESTRADA NAVARRETE

Cuernavaca, Mor.

Enero 1996.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice

Resumen.....	1
1 Introducción	2
1.1 Amibiasis y epidemiología.....	2
1.2 Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i>	2
1.3 Propiedades del núcleo de la amiba.....	3
1.4 Generalidades sobre los genes de RNA ribosomal de <i>Entamoeba histolytica</i>	3
1.5 Organización de las secuencias repetidas de <i>Entamoeba histolytica</i> HMI:IMSS.....	5
1.6 Familias de secuencias repetidas.....	6
2 Utilización de secuencias repetidas en el diagnóstico de parásitos	7
2.1 Diagnóstico de amibiasis.....	8
3 Métodos de detección de productos de PCR	10
3.1 Métodos tradicionales.....	10
3.2 Métodos avanzados.....	13
4 Justificación	17
5 Objetivos	18
6 Estrategia experimental	21
6.1 Formato PCR-HERA.....	21
7 Materiales y Métodos	23
7.1 Cultivos Celulares.....	23
7.2 DNAs utilizados.....	23
7.3 Oligonucleótidos utilizados.....	23
7.4 Reacción en cadena con <i>Taq</i> DNA Polimerasa (PCR).....	24
7.5 Reacción en cadena Asimétrica con <i>Taq</i> DNA Polimerasa (A-PCR).....	24
7.6 Derivatización de las Placas de Microtitulación.....	25
7.7 Metodo PCR-HERA.....	26
8 Resultados	27
8.1 Análisis de la secuencia D5.....	27
8.2 Secuencias repetidas en la clona D5.....	27
8.3 Amplificación de secuencias repetidas de <i>Entamoeba histolytica</i>	31
8.4 PCR Asimétrica de trofozoitos.....	35
8.5 Diseño de la sonda fluoresceinada.....	35
8.6 Eliminación de la sonda pegada inespecíficamente.....	37
8.7 Inmovilización de la sonda en la placa de microtitulación.....	37
8.8 Hibridación del producto de PCR con la sonda inmovilizada.....	39
8.9 Corte de híbridos con la Endonucleasa <i>Rsa</i> I.....	39
8.10 Detección de trofozoitos por PCR-HERA.....	43
8.11 Sensibilidad y especificidad con PCR HERA.....	43
8.12 Experimentos con PCR-HERA.....	48
9 Discusión y conclusiones	48
10 Bibliografía	52

Índice de figuras

Introducción

Figura 1. Mapa ribosomal de <i>Entamoeba histolytica</i> (HM1-IMSS).....	4
Figura 2. Formato de detección del oligonucleótido sonda.....	11
Figura 2a. Sistema de detección de señal SHARP.....	12

Estrategia Experimental

Figura 3. Esquema del procedimiento PCR-HERA	19
Figura 4. Esquema de las diferentes etapas en el desarrollo de PCR-HERA.	20

Materiales y Métodos

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y A-PCR.....	22
--	----

Resultados

Figura 5. Matriz de puntos de la secuencia D5.....	28
Figura 6. Alineamiento de las secuencias repetidas Rep-D5 con el fragmento P145.....	29
Figura 7. Familias de secuencias repetidas en la secuencia D5.....	30
Figura 8. Amplificación de secuencias repetidas del rDNA de <i>Entamoeba histolytica</i>	32
Figura 9. Productos de PCR en gel de agarosa al 2%.....	33
Figura 10. Producción de DNA cadena sencilla con A-PCR	34
Gráfica 1. Curva de fluorescencia del oligo GE-2Fu y FITC.....	36
Figura 11. Liberación de fluoresceína con la Endonucleasa <i>Rsa I</i>	38
Gráfica 2. Liberación de fluorescencia con 2 y 4 U de <i>Rsa I</i>	40
Gráfica 3. Liberación de fluorescencia con 2 U de <i>Rsa I</i> a diferentes tiempos de incubación	41
Gráfica 4. Ensayo PCR-HERA utilizando diferente número de moléculas de A-PCR.....	42
Figura 12. Productos de las reacciones de PCR y A-PCR de trofozoitos.....	44
Figura 12a. Productos de PCR y A-PCR de DNAs heterologos.....	45
Gráfica 5. Especificidad y sensibilidad de PCR-HERA	46
Tabla 2. Detección de <i>Entamoeba histolytica</i> utilizando PCR-HERA.....	47

Discusion y Conclusiones

Figura 13. Comparacion del número de pasos entre el sistema PCR-SHARP y el sistema PCR-HERA.....	49
---	----

DEDICATORIA

Especialmente a ti Guillermo por lo que significa este trabajo y esfuerzo de los dos.

A mis adoradas hijas Gezná y Gitzá por el tiempo que les robó mi tesis.

A mis padres Manuel y Delia porque siempre han luchado por la superación de sus hijos y sus nietas.

A mis queridísimos hermanos: Alejandra, Margarita, Juan, Flor Delia, Anjélica y José.

Hasta un lugar del Sureste Mexicano en la selva de Chiapas al Sub *Marcos* y al EZLN.

A todos y cada uno de mis compañeros del laboratorio "Lizardis-Alagones" y amigos del Instituto.

AGRADECIMIENTOS

Muy especialmente a M.C. Isabel Tussie por el asesoramiento académico, sus críticas, las discusiones, y aportaciones a mi trabajo.

A la M.C. Ma. Luisa Esteves por su gran amistad y por la caracterización de la clona D5.

A los miembros del jurado, Dra. Susana López, Dr. Mario Zurita, Dra. Hilda Lomelí, Dr. Luis M. Salgado y Dr. Paul M. Lizardi, por la revisión crítica de este trabajo.

Al Dr. Xavier Soberón, el interés y apoyo a mi trabajo.

A los Técnicos Académicos: Alejandro Olvera, Felipe Olvera por el cultivo de amibas.

Al Téc. Acad. René Hernández por su apoyo técnico.

Al Téc. Acad. Paul Gaytan, por la síntesis del oligonucleótido fluorescente.

A Laurence Colin por su colaboración y las discusiones sobre éste trabajo.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Reconocimiento Molecular y Bioestructura del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, con la asesoría del Dr. Paul M. Lizardi L.

Abreviaturas

rDNA	ribosomal DNA
PCR	Polymerase Chain Reaction
A-PCR	Assymetic-Polymerase Chain Reaction
PCR-HERA	Hybridization and Enzymatic Release Assay
ELISA	Enzyme linked Immunoassay
lsu-rRNA	Large subunit ribosomal Ribonucleic Acid
ARS	Autonomous replication sequences
RFLP	Restriction Fragment Lenght Polymorphism
DEIA	Deoxyrybonucleic Acid-Enzyme Immunoassay
FITC	Fluorescein isothiocyanate
PEG	Polyethylen glycol
UFC	Unidades de fluorescencia corregidas

RESUMEN

En este trabajo presentamos un nuevo ensayo modelo para el diagnóstico de amibiasis que hemos llamado "Ensayo de Reacción en Cadena con Polimerasa mediante Hibridación y Liberación Enzimática (PCR-HERA). Consiste en utilizar de manera combinada la Reacción en Cadena Asimétrica con *Taq* DNA Polimerasa (A-PCR) y la detección de los productos de PCR por medio de fluorescencia. Para la reacción de PCR seleccionamos secuencias de DNA ribosomal (rDNA) de *Entamoeba histolytica* que están altamente repetidas y que son especie-específicas. Los productos obtenidos de esta reacción se hibridan con una sonda marcada con fluoresceína e inmovilizada en una placa de microtitulación. Los híbridos formados contienen sitios de corte para la endonucleasa *Rsa* I, y en presencia de ésta enzima se rompen liberando la fluoresceína de la sonda. La detección de la señal se hace en un lector de fluorescencia automático. En contraste con otros ensayos, éste sistema no involucra lavados ni radioactividad, tiene la ventaja de ser muy sensible ya que con este procedimiento se detecta 0.1 de trofozoito, es un ensayo específico y puede ser automatizable.

1 INTRODUCCION.

1.1 AMIBIASIS Y EPIDEMIOLOGIA.

Entamoeba histolytica es el agente causal de amibiasis en humanos. Su proliferación en países en vías de desarrollo la coloca en el tercer lugar de morbilidad y mortalidad producida por parásitos, tanto que en 1986, se estimaron 500 millones de individuos infectados (Walsh, 1986). La mayoría de éstos individuos son portadores asintomáticos y erradican el parásito espontáneamente después de varios meses (Nanda, 1984). Sin embargo el 10% de los casos desarrollan amibiasis invasiva con síntomas que van desde una diarrea media y transitoria hasta una colitis ulcerativa crónica. En otros casos ocurre una diseminación extraintestinal, produciendo abscesos principalmente en el hígado. Mas de 40,000 muertes anuales a nivel mundial se deben a amibiasis invasiva (Martínez-Palomo, 1990).

Investigaciones recientes en México sobre esta enfermedad reportaron que de 70,000 muestras de sangre analizadas el 8.4% presentaron anticuerpos específicos contra amiba. Por otra parte, aunque el metronidazol es efectivo en casos de amibiasis aguda, la enfermedad todavía causa mas de 1200 muertes anuales debido a que no hay un buen diagnóstico para confirmar que la diarrea de los pacientes es ocasionada por amibiasis y no por otro patógeno (Cohen, 1995).

1.2 CICLO DE VIDA DE *Entamoeba histolytica*.

Estudios del ciclo de vida de este parásito muestran básicamente cuatro estadios consecutivos: el trofozoito, el prequiste, quiste y metaquiste. El trofozoito es la forma móvil de *E. histolytica*. Mide de 10 a 40 μm , es frágil y sensible a la temperatura. Se aloja en el intestino grueso en donde se multiplica por fisión binaria (Schaffer, 1961) y se enquista cuando las condiciones del medio ambiente le son adversas. En muchos casos los trofozoitos viven como comensales en el intestino sin causar daño o molestias en el huésped. Cuando el trofozoito se condensa en una masa esférica en el lumen del intestino grueso, se forma el prequiste. Los quistes se encuentran en heces de portadores como cuerpos hialinos de 8-20 μm de diámetro, de forma ligeramente oval. Tienen una pared de quitina que los protege fuera del tracto gastrointestinal humano. Los quistes tienen 4 núcleos provenientes de dos mitosis nucleares sucesivas, cada uno de los cuales es una copia del original (Cleveland, 1930). El metaquiste aparece una vez que sale por una hendidura de la pared de quitina. Una amiba metaquística produce 8 amibas uninucleadas después de la división celular (Dobell, 1928). Una vez que emergen los trofozoitos metaquísticos migran al intestino grueso en donde se

establecen y pueden proliferar en condiciones microaeróbicas. Los trofozoitos tienen una vida corta y no tienen importancia en la transmisión de la enfermedad. Los quistes son la forma infectiva del parásito, por el contrario sobreviven en las heces por varios días; cuando se ingieren en agua o alimentos contaminados, pasan por el estómago y se desenquistan en el ileon terminal, completando el ciclo de vida del parásito (Sepúlveda, 1984).

1.3 PROPIEDADES DEL NUCLEO DE LA AMIBA.

Los trofozoitos de *E. histolytica* son células eucariotas primitivas con una biología peculiar (Martínez-Palomo, 1986). Las células contienen un núcleo que carece de organelos típicos de eucariotes, tales como aparato de Golgi y mitocondria. El núcleo parece ser diferente al de otros eucariotes. En el centro del núcleo se ha encontrado un endosoma o cariosoma comprimido de material fibrinoglanular incluyendo DNA (Albach, 1980). Se ha especulado que este endosoma puede ser un sitio de condensación previa a la segregación. No hay evidencia de cromosomas y ni de huso acromático (responsable de la segregación de cromosomas durante la división celular) en *E. histolytica*. Tampoco tiene nucleolo (sitio de síntesis de rRNA). Sin embargo la periferia interna de la pared nuclear está definida por grupos de "cromatina periférica" rica en RNA incluyendo DNA (Albach, 1980). No está claro si la cromatina periférica cambia durante el ciclo celular o si el DNA condensado se mueve hacia la membrana para replicarse y transcribirse (Meza, 1992). Tampoco se han identificado organizadores nucleolares como sitios de síntesis de RNA ribosomal, que son característicos de los núcleos de los eucariotes. Se ha sugerido que la cromatina periférica puede estar involucrada en la síntesis de rRNA y funcionalmente ensamblar el nucleolo (Huber, 1989). En experimentos de hibridación "in situ", con una sonda específica del episoma ribosomal, se demostró que los genes ribosomales se localizan en la cromatina periférica (Zurita, 1991).

1.4 GENERALIDADES SOBRE LOS GENES DE RNA RIBOSOMAL de *Entamoeba histolytica*.

En 1989, dos grupos independientes de investigadores encontraron que los genes de RNA ribosomal de *E. histolytica* (rDNA) se localizan en una molécula extracromosomal circular de aproximadamente 24.6 Kb (Huber, 1989, Bhattacharya, 1989). Esta característica de rDNA en forma circular se ha encontrado en organismos tales como *Xenopus*, la pulga de agua *Ditiscus*, el grillo *Acheta*, varias especies de levaduras, recientemente para amebas de vida libre como *Naegleria gluberi* y el alga *Euglena*

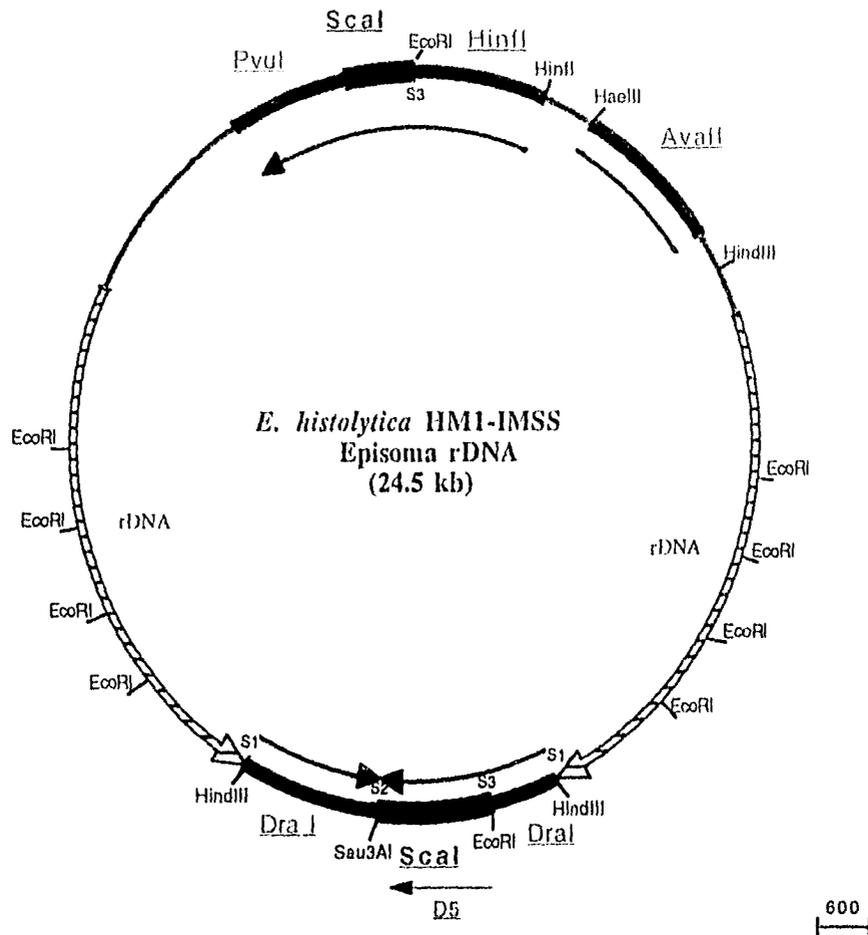


Figura I. Mapa ribosomal de *Entamoeba histolytica* (HMI-IMSS). Las secuencias repetidas forman parte de los espaciadores ribosomales. La familia tipo *Sca* I donde se localiza la secuencia D5, se encuentra en los extremos 5' y 3' del rDNA.

gracilis (Ravel, 1985, Clark, 1987). En *Naegleria* y *E. histolytica* no se ha reportado copia cromosomal de rDNA.

El rDNA circular extracromosomal de *E. histolytica* (cepa HM-1:IMSS) parece ser un replicon autónomo. El número de copias de este episoma por célula es de 200 aproximadamente (Huber, 1989, Battachayra, 1989). Las unidades de transcripción de los rRNA están organizadas como dos unidades repetidas e invertidas de 5.9 Kb por cada plásmido (Huber, 1989) y representan cerca de la mitad del DNA total del replicón. Tiene familias de secuencias de DNA repetidas como espaciadoras entre los genes ribosomales. Estos elementos repetidos no se transcriben y son comunes a otros organismos estudiados, donde se sabe, juegan un papel importante en la transcripción del rRNA. Sin embargo, cuando se compara la organización del rDNA de *E. histolytica* con los que contiene *Entamoeba moshkowskii* (amiba de vida libre) éstas, tienen sólo una unidad de transcripción del rRNA por plásmido, mientras que en amibas *Laredo* (no patógena) las secuencias repetidas están ausentes (Shegal, 1994).

1.5 ORGANIZACION DE LAS SECUENCIAS REPETIDAS DE *E. histolytica* HM1:IMSS.

En la figura 1 se muestra el mapa ribosomal de *E. histolytica*. Los cistrones ribosomales (rDNA) están indicados con dos flechas rayadas, también se señalan las secuencias espaciadoras cortas llamadas S1 (109 pb), S2 (361 pb) y S3 (312 pb) que separan las familias de secuencias repetidas. Las flechas indican la orientación relativa de las secuencias. Hacia el extremo 3' de rDNA hay una región de 3,543 pb que contiene dos familias de secuencias repetidas, las familias *Dra* I y *Sca* I. Los elementos repetidos están contenidos en un fragmento *Hind* III que inicia con 75 pb del extremo 3' de *lsu*-rRNA (large subunit ribosomal RNA), seguido de una secuencia S1. Hay después 2 secuencias *Dra* I separadas de 7 secuencias repetidas *Sca* I por la secuencia S3.

En el extremo 5' del rDNA hay una región de 9,216 pb que contiene también familias de secuencias repetidas que se denominan: *Pvu* I, *Sca* I, *Hinf* I, *Ava* II y dos secuencias repetidas de 74 pb. Las secuencias de la familia tipo *Pvu* I (también llamada P145) son muy parecidas a la familia tipo *Sca* I. Las secuencias de la familia *Hinf* I tienen trechos largos que son comunes a las *Dra* I. Las secuencias repetidas *Ava* II y las secuencias repetidas de 74 pb se han encontrado exclusivamente de ésta región. En esta región también se encuentra un segmento de DNA llamado Tr, que se transcribe bajo ciertas condiciones de crecimiento (Shegal, 1994).

1.6 FAMILIAS DE SECUENCIAS REPETIDAS.

Las secuencias repetidas *Pvu* I son de 145 pb, hibridan específicamente con aislados de *E. histolytica* patógena. Se ha reportado que están presentes en un grupo de 15 copias en el extremo 5' de los genes rRNA del episoma de *E. histolytica* HM1:IMSS clona 6 (Huber, 1989). Por análisis de secuencia, el grupo de Bhattacharya reportó un arreglo de 11 secuencias repetidas consecutivas de este tipo, hacia arriba del rDNA (Shegal, 1994). Se piensa que la localización de éstas secuencias tiene importancia funcional, ya que P145 contiene un dominio de interacción DNA-Proteína que puede tener una función específica en el episoma (Zurita, 1991).

Las secuencias repetidas *Dra* I están localizadas hacia los extremos 3' de los genes ribosomales. Tienen un tamaño de 170 pb. Son ricas en AT (85%) y contienen tres secuencias de 11 nt completamente homólogos con los 11 nt de la secuencia consenso ARS (secuencias de replicación autónoma en levadura), excepto por la presencia de un nucleótido extra (Mittal, 1991). Todos los miembros de la familia *Dra* I son exactamente idénticos en secuencia nucleotídica, incluyendo una unidad incompleta de 155 pb. Tienen regiones ricas en pirimidinas que se han asociado con una mayor frecuencia de recombinación. La unidad *Dra* I incompleta parece ser el elemento potencial de recombinación (Shegal, 1994). También se ha observado que existe relación entre las secuencias repetidas *Dra* I con el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), en algunas regiones del rDNA del episoma de *E. histolytica*. Estas diferencias se encontraron entre varias especies y entre clones HM1:IMSS. La variación en el número de estas secuencias repetidas *Dra* I puede ser por eventos de recombinación, los cuales pueden ser fisiológicamente significativos para mantener del alto número de copias del rDNA (Bhattacharya, 1992).

Las secuencias repetidas *Sca* I de 144 pb muestran aproximadamente 95% de homología con la familia *Pvu* I. Una de las diferencias entre ellas, es que en las *Sca* I se pierde el sitio para *Pvu* I. El número de estos elementos repetidos en el episoma es de 13. Seis hacia el extremo 3' y siete hacia el extremo 5' de los genes ribosomales, todas de 144 pb, excepto por la primera unidad que es de 118 pb. Estas secuencias repetidas no son exactamente idénticas una con otra. No se ha observado variación en el número de las mismas. Esto sugiere que no tienen recombinación frecuente. Tanto las unidades *Dra* I como *Sca* I muestran semejanza a regiones de espaciadores intergénicos de eucariotes superiores y son específicas de *E. histolytica* patógena (Mittal, 1992).

La clona denominada D5 que utilizamos en este trabajo, contiene secuencias repetidas tipo *Sca* I. Experimentos previos de "Southern blot" muestran que la secuencia D5 hibrida con aislados de *E. histolytica* que tienen zimodeno patógeno.

En ensayos de hibridación tipo "dot blot" ésta secuencia, da una señal positiva con cepas patógenas de *E. histolytica* (HM1, HK9 y HM38), y no muestra señal con especies no patógenas como *Entamoeba invadens* y *Entamoeba Laredo* ni con otras bacterias enteropatógenas (Esteves, 1990, Mittal, 1992).

2 UTILIZACION DE SECUENCIAS REPETIDAS EN EL DIAGNOSTICO DE PARASITOS.

El DNA de parásitos tiene secuencias nucleotídicas que existen como una sola copia o secuencias repetidas que están en múltiples copias en el genoma del parásito. De éstas últimas no se conoce bien su función, típicamente son secuencias consenso que se repiten cientos o miles de veces. Tal es el caso del genoma de los parásitos *Trypanosoma brucei* y *T. cruzi*, en los cuáles éstos elementos constituyen el 12% y 9% respectivamente del DNA total (Borst, 1980, Castro, 1981). Cuando las secuencias están presentes en múltiples copias en un organismo, la sensibilidad analítica del ensayo se incrementa (el límite de detección será menor). Dado que son especie-específicas, son muy convenientes para el diagnóstico. Estas secuencias repetidas dan buena respuesta de sensibilidad y especificidad utilizadas como sondas en ensayos de hibridación. Pueden ser utilizadas contra secuencias complementarias de DNA extraído de parásitos ó contra organismos completos.

Se ha utilizado como sonda de diagnóstico una secuencia genómica repetitiva de 195 pb de *T. cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas. Por hibridación en "dot-blot" es posible detectar una cantidad de DNA, equivalente a 30 parásitos en muestras de sangre (Gonzalez, 1984). Con procedimientos que favorecen hibridación de secuencias repetidas DNA-DNA y utilizando DNA total del parásito marcado radioactivamente, Ashall y col. detectan hasta un mínimo de 5 parásitos en 20 µl de sangre infectada (Ashall, 1988).

El diagnóstico de malaria se ha enfocado en una de las especies más virulentas *P. falciparum*. Se ha utilizado una sonda de 21 pb, que se repite cientos de veces en el genoma del parásito. La sangre de pacientes infectados se lisa y se gotea directamente en papel de nitrocelulosa y los parásitos se identifican con base a la hibridación del DNA del parásito complementario a ésta sonda marcada. La especificidad de éste ensayo es excelente ya que la sonda no hibrida con otras especies de malaria humana, ni con DNA humano. La técnica detecta 10 pg de DNA del parásito (equivalente a 100 parásitos) y en estudios de campo se pueden detectar aproximadamente 40 parásitos por µl de sangre (Franzen, 1984). Otro método simple para detectar *P. falciparum* directamente de muestras de sangre es utilizando PCR. Para la amplificación con PCR, las muestras de sangre se lisan con un detergente, luego se filtran en un

papel. Este después se seca y se añade a la mezcla de PCR. La presencia de los productos de PCR se detecta utilizando una sonda no radioactiva para las unidades repetidas de 21 pb. Este método permite la detección de 10 parásitos en 20 µl de sangre (Barker, 1992).

Otro ejemplo de enfermedades parasitarias en donde se utiliza la técnica de hibridación para el diagnóstico, es la Leishmaniasis humana. Las lesiones iniciales de esta enfermedad se localizan en la piel. La identificación rápida del parásito contribuye significativamente a evitar la propagación y un tratamiento adecuado. Para la identificación y detección de *Leishmania* se han utilizado como sonda los minicirculos de kDNA (DNA de kinetoplasto), los cuales forman parte de una estructura mitocondrial característica de éste grupo de protozoarios. Consiste de DNA concatenado las cuales son moléculas de DNA pequeño de 2,500 pb aproximadamente. El kDNA aislado de varias especies sirve también para la identificación entre especies. El kDNA marcado radioactivamente se utilizó como sonda de diagnóstico de éste parásito. Se llevo a cabo por hibridación de ácidos nucleicos utilizando la técnica de "touch-blot" de tejido. Esta técnica consiste en hacer un corte de tejido de 2-3 mm que se coloca en el filtro de nitrocelulosa durante 30 s a 1 min. Este método se utilizo para el diagnóstico de Leishmaniasis humana, directamente con tejido derivado de las lesiones cutaneas (Wirth, 1982). El número mínimo detectado con ésta técnica es de 100-1,000 parásitos (Barker, 1987).

Actualmente se conocen al menos 10 ensayos para la detección de diferentes parásitos que utilizan secuencias repetidas en ensayos con sondas DNA y PCR (Weiss, 1995). Se han desarrollado muchos sistemas y pocos han avanzado en su evaluación clínica. Ninguno de éstos ensayos es lo suficientemente simple, reproducible, formal y validado para su aplicación. La utilización de éste tipo de ensayos basados en ácidos nucleicos, requiere de metodología simplificada y robusta para que pueda aplicarse a epidemiología, prevención y tratamiento de las enfermedades parasitarias.

2.1 DIAGNOSTICO DE AMIBIASIS.

Actualmente el diagnóstico de la infección por *E. histolytica* consiste en localizar amibas en heces fecales ó detectar anticuerpos específicos en suero. Ambos métodos tienen varios problemas inherentes. El examen en fresco de heces es tedioso, consume tiempo y depende de la experiencia del microscopista. Comúnmente las pruebas resultan falsas positivas como consecuencia de la confusión de amibas, con macrófagos que ingieren células rojas ó con protozoarios no patógenos. Al menos 85%-90% de los pacientes con absceso hepático amibiano tienen anticuerpos circulantes y pueden

diagnosticarse con pruebas serológicas. Mientras que los pacientes con disentería severa que requieren de hospitalización no siempre tienen anticuerpos circulantes presentes, lo cual puede dar lugar a falsos negativos (Walsh, 1986).

Existen otras técnicas para detectar amiba, que no han sido completamente desarrolladas ni probadas, la tipo ELISA que detecta la presencia de un antígeno de *E. histolytica* y anticuerpos inmunofluorescentes para detectar quistes (Walsh, 1986). Otra dificultad para garantizar el diagnóstico correcto de infecciones intestinales, es la diversidad de sustancias que interfieren con el examen de heces, como los antibióticos, antiparasitarios, antidiarreicos, etc.

Como alternativas a éstas técnicas se han empleado metodologías de DNA recombinante y solamente dos ensayos se han probado con muestras de pacientes. El grupo de Samuelson y colaboradores utilizaron una sonda para hibridación de DNA con secuencias repetidas tipo P145. Obtienen una sensibilidad de 8 trofozoitos de *E. histolytica*. La detección del parásito se hace con muestras de heces de pacientes que fueron sujetas a varios ciclos de congelamiento-descongelamiento para liberar el DNA. El ensayo es tipo "dot-blot" y la sonda esta marcada radioactivamente, lo cual resulta poco práctico para ser aplicado en ensayos clínicos (Samuelson, 1989). El otro ensayo con PCR, se basa en el uso de oligonucleótidos específicos para patógenas (secuencia P145) y no patógenas (secuencia B133), dirigidos a secuencias altamente repetidas en *E. histolytica* con hibridación "dot blot". En un estudio epidemiológico de *E. histolytica* este ensayo se aplicó en una comunidad rural de México, la extracción de ácidos nucleicos se hizo a partir de heces fijadas con formalina seguida de tres ciclos de congelamiento-descongelamiento y sonicación. Los productos de PCR se detectaron por hibridación "dot-blot", utilizando sondas radioactivas que contienen las secuencias repetidas (Acuña, 1993). Los resultados mostraron que muchas muestras positivas (56% de los infectados) contienen ambas especies, patógenas y no patógenas.

Recientemente, se ha propuesto la separación de *E. histolytica* en dos especies, la *E. histolytica* patógena y la *E. dispar* no patógena (Diamond, 1993). Secuencias de DNA repetido que difieren entre una y otra, han sido la base para tratar de identificarlas. (Garfinkel, 1989). El uso de sondas para la diferenciación de aislados clínicos, se hizo por hibridación directa con trofozoitos en membranas de nylon y el nivel de detección es de 200 trofozoitos (Bracha, 1990). Otros grupos han utilizado hibridación "dot blot" y PCR con oligonucleótidos específicos para patógenas y no patógenas (Mirelman, 1990, Romero, 1992). Los resultados son muy controvertidos ya que no distinguen una especie de otra. Algunos autores proponen que esto se debe a la "modulación de virulencia" de *E. histolytica* patógena por tratarse de un organismo muy plástico (Mirelman, 1990).

Nosotros nos enfocamos en la diseño de primers para detectar unicamente *E. histolytica* patógena. Utilizamos como blanco secuencias repetidas específicas de esta especie (ver secuencias repetidas tipo *Sca I*, sección 1.6).

3 METODOS DE DETECCION DE PRODUCTOS DE PCR.

Una etapa importante de los métodos desarrollados para la detección de productos de PCR en clínica y en diagnóstico, es la de identificar los componentes post-PCR. La detección de DNA exige una selección cuidadosa de los oligonucleótidos para evitar una amplificación inespecífica cuando se prueba con muestras biológicas crudas (sangre, biopsia, saliva, etc.). Es entonces importante, utilizar criterios y requisitos conocidos para el diseño de los primers para la reacción de PCR (Innis, 1990).

3.1 METODOS TRADICIONALES.

Métodos basados en gel de agarosa y poliacrilamida.

Los productos de PCR se separan por electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida y se tiñen con bromuro de etidio. La falta de sensibilidad de estos métodos se debe a que se requiere de grandes cantidades de DNA, que sólo se pueden obtener con PCR altamente eficientes. En algunos casos se pierde la especificidad debido a la dificultad para determinar el tamaño de los productos amplificados por el barrido de las bandas en el gel. Por lo tanto éstos métodos son imprácticos para la implementación diagnóstica.

Métodos de "Southern blot", "dot blot" y "slot blot".

En el método "Southern blot", el DNA se extrae de la muestra, se corta con enzimas de restricción, se separa en gel de agarosa, se transfiere a una membrana de nitrocelulosa o nylon y se hibrida con una sonda marcada radioactivamente. Se obtiene el resultado por medio de una autoradiografía (Maniatis, 1989). La detección puede hacerse también con marcadores enzimáticos o quimiluminiscentes, que son de mayor sensibilidad que los radioactivos. Sin embargo éste procedimiento dada su complejidad, es de difícil aplicación al diagnóstico. Se usa en áreas tales como el consejo genético, pruebas forenses y las pruebas de paternidad (Kricka, 1992).

"Slot blot" y "dot blot", se utilizan para cuantificar DNA específico en una muestra y se puede detectar hasta menos de un picogramo de DNA. La detección también puede hacerse con sondas marcadas enzimáticamente, pero el manejo no es fácil cuando se trata de varias muestras y en grandes volúmenes.

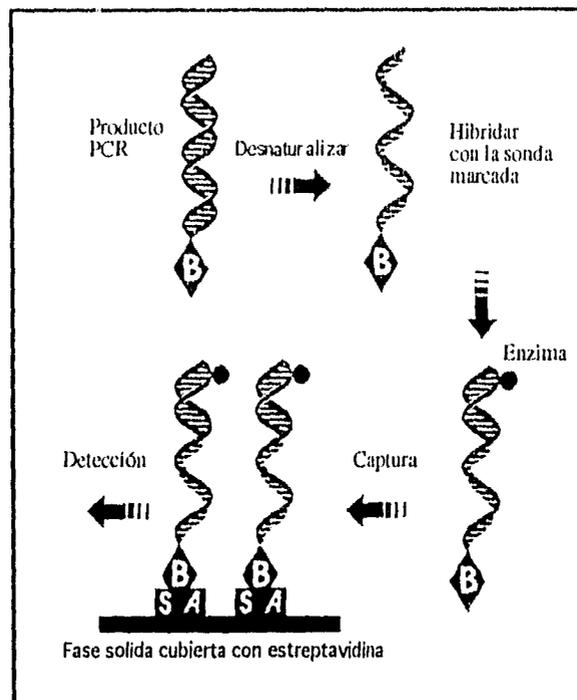


Figura 2. Formato de oligonucleótido sonda. Después de la amplificación, el producto de PCR se desnaturaliza y se hibrida a un oligonucleótido marcado. Los híbridos son capturados en una placa cubierta con estreptavidina, y la marca genera una señal detectable.

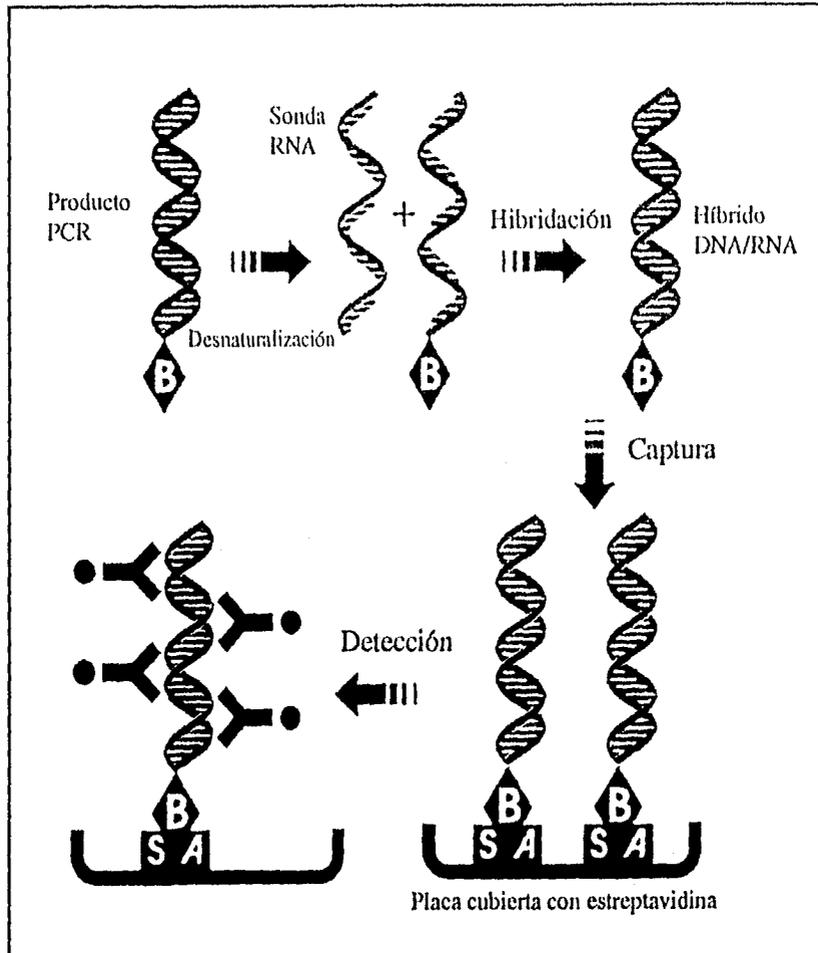


Figura 2a. Sistema de señal SHARP. Los productos de PCR son desnaturalizados e hibridados a una sonda RNA sin marca. Los híbridos DNA/RNA son capturados en una placa cubierta con estreptavidina. La detección se hace con un anticuerpo específico para híbridos DNA/RNA y conjugado con Fosfatasa alcalina.

3.2 METODOS AVANZADOS.

Métodos de detección basados en el formato ELISA.

Los métodos basados en ELISA o en placa de microtitulación, emplean una técnica alternativa y mas prometedora que los métodos basados en gel. El formato ELISA se ha estandarizado relativamente y es muy familiar al personal de muchos laboratorios en todo el mundo. El material, equipo y aditamentos son comercialmente accesibles y muchos laboratorios ya están equipados para ésta tecnología.

El formato ELISA para la detección de productos de PCR se basa en el uso de oligonucleótidos como sondas detectoras ó para la captura de amplicones (productos de PCR). En ambos casos, uno de los oligonucleótidos utilizados como primer es marcado con biotina para ser incorporado durante la reacción de PCR. En el formato sonda (figura 2) se utiliza un oligonucleótido como sonda. Al desnaturalizar el amplicón se hibrida a la sonda marcada con una enzima. La mezcla de reacción se captura en una placa cubierta con estreptavidina. Después se lava el exceso de oligo y la enzima generará un señal en presencia de un substrato adecuado (Keller, 1990). La sensibilidad esta limitada por el hecho de que solo se enlaza una enzima por amplicón y que también se pueden capturar híbridos que no estan marcados. En el formato captura, el amplicón se desnaturaliza y se hibrida, al oligo de captura secuencia-específico preenzalado a un soporte solido. Las secuencias que no son capturadas se eliminan por lavados en tanto que las capturadas, se detectan mediante pegado a biotina con una enzima marcada con estreptavidina (Bawens,1993).

Ensayo AMPLICOR-PCR. Es un ejemplo del ensayo captura en el cuál la reacción de PCR se hace con un oligonucleótido biotilado. El producto es desnaturalizado e hibridado con una sonda-captura específica, preenzalada en una placa microtitulación. Después de la captura de la cadena de DNA, marcada con biotina, se detecta con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa siguiendo el procedimiento estandar del inmunoensayo. Los resultados se tienen despues de 4-5 hr. El ensayo utiliza dUTP/UNG para el control de contaminación acarreada (Longo, 1990). Se pueden detectar un número muy pequeño de blancos, es mas flexible que otros sistemas pero debe considerarse el costo, que puede no ser accesible al laboratorio clínico (Bawen, 1993, Jaschek, 1993).

Métodos de detección inmunológicos.

Ensayo PCR-EIA. En este método el producto de PCR se hibrida en solución con una sonda de RNA biotilada. La sonda, complementaria a la secuencia de interés, se obtiene por transcripcion del DNA con nucleótidos trifosfatos biotilados. Después de

la hibridación, los híbridos DNA/RNA se capturan en una placa de microtitulación cubierta con anticuerpos antibiotina. Posteriormente son detectados con un anticuerpo monoclonal específico para híbridos DNA/RNA conjugado con β -galactosidasa. La actividad de la β -galactosidasa se detecta con un sustrato que produce una señal fluorescente (Bobo, 1990). Este sistema es altamente sensible porque involucra anticuerpos múltiples y varias enzimas pueden enlazarse al híbrido capturado. Además, la formación de híbridos RNA/DNA es más estable a altas temperaturas de hibridación. El problema es que involucra numerosos lavados antes y después de las etapas de incubación.

Sistema de señal SHARPTM. Es un ensayo de captura tipo ELISA que también utiliza un anticuerpo dirigido contra híbridos RNA/DNA. Después de la amplificación con un oligonucleótido biotinilado y uno no modificado, una parte de la mezcla de reacción se desnaturaliza y se hibrida en solución a una sonda de RNA complementaria. Los híbridos RNA/DNA formados se capturan en una placa cubierta con estreptavidina. La detección se hace con un anticuerpo específico del híbrido RNA/DNA conjugado con una enzima (figura 2a). La señal se genera con un sustrato colorimétrico específico de la enzima, y se lee en un lector de placa convencional. Este sistema es 100 veces más sensible que la tinción de productos de PCR con bromuro de etidio en geles de agarosa. Se puede adaptar a cualquier secuencia blanco, cambiando la sonda RNA. Esta se puede obtener por medio de plásmidos que contienen promotores de transcripción y con un paso de purificación antes de usarla (Lazar, 1993). El procedimiento requiere de numerosos pasos de incubaciones, transferencias y lavados. Para detectar menos de 10 moléculas, se necesita de una buena técnica de PCR y una incubación con el sustrato de toda la noche.

Inmunoensayo con una Enzima y DNA (DEIA). Es un sistema de detección también basado en un anticuerpo. Antes de la detección, la sonda de captura específica del blanco marcada con biotina, se enlaza a la placa cubierta con estreptavidina. Los productos amplificados por PCR son desnaturalizados y una parte de ésta reacción se hibrida con la sonda de captura inmovilizada. Se lava y se añade un anticuerpo monoclonal específico para el DNA doble cadena. El anticuerpo reacciona con las secuencias que han formado los híbridos DNA de doble cadena con la sonda de captura. Después de otro lavado, se añade un anticuerpo anti-gama globulina de ratón marcado con una enzima para una detección colorimétrica (Mantero, 1991). Este método, una vez pegada la sonda de captura a la placa, ofrece la posibilidad de detectar un solo componente (o analito); además la adición de los anticuerpos y los múltiples lavados hacen el procedimiento más laborioso que otros métodos.

Método homogéneo *Taq Man*TM

El kit PCR *Taq Man*TM (Perkin Elmer) emplea primers para PCR y una sonda fluorogénica que emite fluorescencia solamente si se amplifica la secuencia blanco. Es un sistema homogéneo (en una sola etapa) que se basa en la transferencia de energía entre dos compuestos fluorescentes contenidos en un oligonucleótido sonda. La sonda contiene un fluoróforo reportero fluorescente, como la fluoresceína, en el extremo 5', y un fluoróforo quencheador, como la rodamina, interna. Mientras que ambos fluoróforos están unidos a la sonda, la rodamina absorbe la energía del "estado excitado" de la fluoresceína. Pero si la sonda hibrida con la secuencia blanco, ésta es subsecuentemente cortada por la actividad de endonucleasa 5'-3' de la *Ampli Taq* DNA Polimerasa durante la PCR. Como los fluoróforos se separan, la fluoresceína emite luz en proporción directa a la cantidad inicial de templado. Este ensayo es menos sensible que los ensayos heterogéneos (en varias etapas). Cuando se utiliza para la detección de *Listeria monocytogenes* tiene una sensibilidad aproximadamente igual a la que se visualiza en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (Bassler, 1994). Esta tecnología está en desarrollo y hasta ahora no hay artículos publicados.

Otros métodos de detección.

Un ejemplo es la Electroquimiluminiscencia, la capacidad de una sustancia de emitir luz cuando es estimulada por un campo eléctrico. La reacción de PCR se lleva a cabo con un primer biotinilado. Los productos se hibridan con una sonda marcada con TBR [Tris (2,2'-bipiridina)-rutenio (II) quelato] (sonda-TBR). Después de la hibridación se mezcla con esferas magnéticas cubiertas con estreptavidina que se enlazan a los híbridos marcados con biotina. Las esferas magnéticas se colocan en una cámara de detección electroquimiluminiscente. Después se enlazan magnéticamente a un electrodo y se remueve con lavados el material no enlazado y la sonda-TBR que no hibridó. Posteriormente, la sonda-TBR que hibridó con el producto de PCR, es estimulada por un campo eléctrico para producir luz (Di Cesare, 1993). Este sistema es muy sensible y puede ser automático porque puede procesar 96 muestras en dos horas y media. Sin embargo requiere de una gran inversión de capital en el equipo, y la sonda-TBR todavía no es comercial.

Otros sistemas usan la detección "dot-blot reverso" con diferentes formatos de detección. En este caso, la sonda de captura específica del blanco se enlaza usualmente a un filtro ó membrana. La reacción de PCR se hace con un oligonucleótido biotinilado y se hibrida con la sonda de captura. Después de varios lavados, se utiliza avidina ó

estreptavidina marcada con una enzima para detectar el producto de PCR marcado con biotina. La reacción colorimétrica se produce directamente sobre la membrana ó el filtro (Saiki, 1989). Se han utilizado filtros y esferas inmovilizadas para enlazar sondas específicas para patógenos. En el caso de los filtros todos los pasos son manuales incluyendo los lavados. Para las esferas se requiere de un procesador de muestras que procesa solo 6 muestras en 38 min. Ambos métodos procesan un número muy limitado de muestras, solo son cualitativos y el de esferas inmovilizadas requiere de capital para el equipo.

Un método reciente del cuál hay poca información y que también esta en desarrollo. Es un sistema de hibridación en cromatografía de papel llamado PACHA (Paper Chromatography Hybridization Assay). Se basa en la migración capilar del DNA en tiras de papel pasando a través de una área con la sonda inmovilizada. Es una técnica sensible para la detección de DNA amplificado. Este método parece muy promisorio debido a que no es costoso, es rápido y se puede hacer un análisis múltiple (Organics Ltd.).

4 JUSTIFICACION.

La Reacción en Cadena con Polimerasa (PCR), es una de las técnicas mas utilizadas para la detección de secuencias específicas de DNA o RNA. Por su gran versatilidad la PCR se perfila como una alternativa potencial importante para ensayos en laboratorios clínicos. En el area de investigación diagnóstica ésta reacción representa un avance muy importante dada su aplicación a la detección de ácidos nucleicos de diversos agentes infecciosos, al estudio de enfermedades hereditarios, y en la tipificación de antígenos de leucocitos humanos HLA (Human Leucocytic Antigen).

La detección de productos específicos de PCR es aún un problema para los laboratorios de investigación. Debido a que los métodos de detección basados en técnicas tradicionales como la electroforesis y "dot blot" no son alternativas de técnicas mas adecuadas para los laboratorios clínicos. Los métodos avanzados que son específicos y que involucran sondas marcadas, o primers marcados para reacción de PCR, así como el uso de moléculas que actúan como ligandos específicos entre DNA con los anticuerpos marcados con enzimas, son laboriosos, requieren de muchas etapas de lavados además de no ser compatibles con aquellos que se utilizan en los laboratorios de diagnóstico de rutina.

El formato PCR-HERA que proponemos, es un ensayo que tiene basicamente dos etapas de desarrollo. Una, la amplificación de las secuencias blanco por PCR, y el formato de detección no radioactivo, basado en la hibridación específica y rapida del producto amplificado en placas de microtitulación. Al efectuar el ensayo en estas placas, con en el formato ELISA, se hace muy eficiente para el manejo de los productos de PCR, ya que se pueden procesar 96 muestras a la vez y se puede adaptar con equipo semi-automático.

Originalmente éste método se implementó para detectar *E. histolytica* un parásito de gran interés médico, ya que ahora no existe un ensayo para el diagnóstico de éste parásito, que sea específico, eficiente y con el manejo simultáneo de numerosas muestras en los laboratorios clínicos. El desarrollo de este tipo de ensayos permite explorar nuevas y mejores alternativas, ya que la tecnología de DNA recombinante dispone de herramientas que pueden dar una aplicación directa al diagnóstico de enfermedades infecciosas.

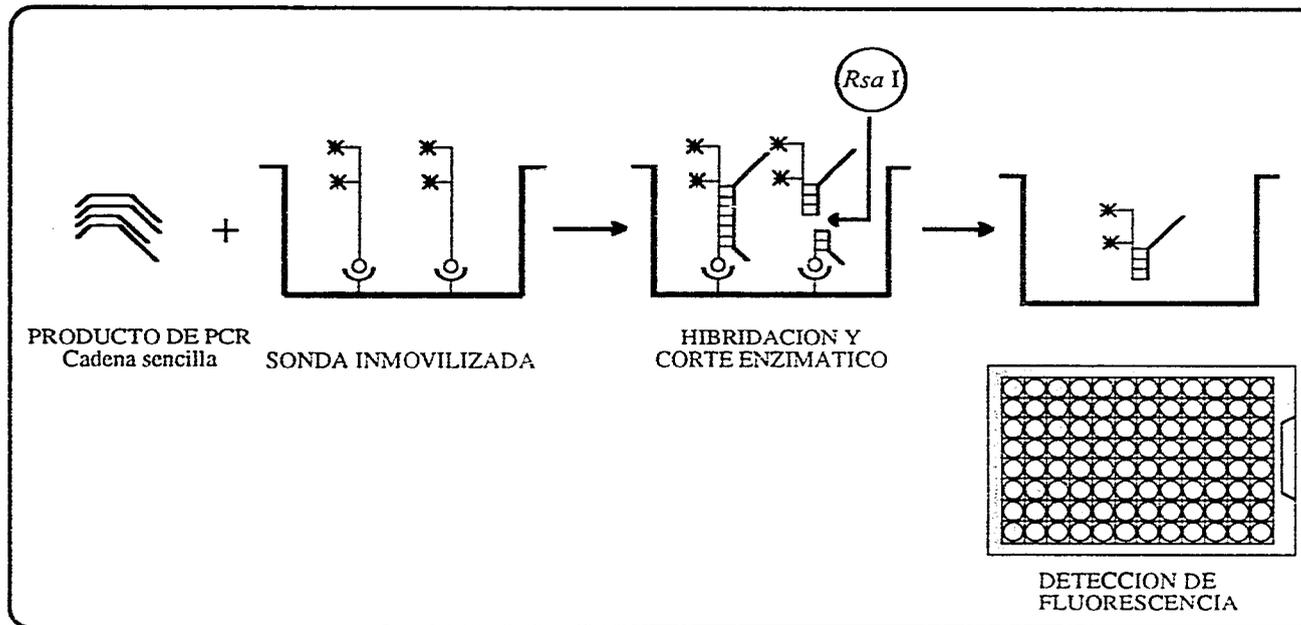
5 OBJETIVO GENERAL:

El objetivo general de este proyecto es el desarrollo de un ensayo de detección de productos de PCR no radioactivo, específico, con gran sensibilidad y sin etapas de lavados. El ensayo se dirige a la detección del parásito *E. histolytica*.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES:

Los objetivos de este trabajo son:

- a) Diseñar primers específicos para amplificar secuencias repetidas del rDNA de *Entamoeba histolytica*, por medio de la reacción de PCR.
- b) Diseñar un oligonucleótido marcado no radioactivamente, para utilizarlo como reportero y como sonda de captura de las secuencias repetidas de *E. histolytica* producidas por PCR.
- c) La detección de *E. histolytica* por medio de la reacción de PCR y la liberación de fluorescencia en formato de placa de microtitulación. Utilizando DNA purificado así como trofozoitos de éste parásito.



 Producto de PCR
  Fluoresceína
  Biotina
  Estreptavidina

Figura 3. Esquema del procedimiento PCR-HERA para la detección de *Entamoeba histolytica*.

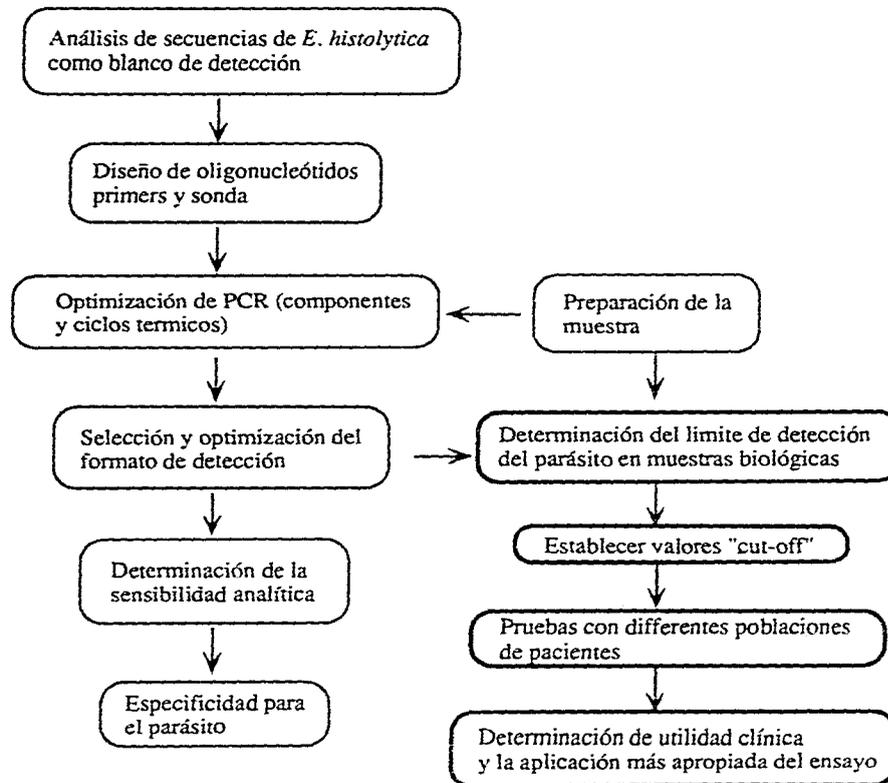


Figura 4. Esquema de las diferentes etapas para el desarrollo de PCR-HERA con *Entamoeba histolytica*. Los cuadros con línea gruesa indican el procedimiento para la validación clínica.

6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

6.1 Formato PCR-HERA.

El ensayo PCR-HERA desarrollado en este trabajo se muestra en la figura 3 y consta de tres pasos; 1) Producción de cadena sencilla con A-PCR (Assymetric-PCR), 2) hibridación y corte de híbridos con una endonucleasa de restricción y 3) transferencia a otra placa para detección de fluorescencia. La inmovilización de la sonda en la placa, se hace previo al ensayo. La sonda esta marcada con dos fluoresceínas en el extremo 5' y con una biotina en el extremo 3' que sirve para enlazarla a la placa de microtitulación cubierta con estreptavidina. El primer paso es la amplificación de secuencias repetidas de *E. histolytica* como cadena sencilla a partir de A-PCR.

La A-PCR es un tipo de PCR que utiliza una concentración desigual de los primers de amplificación. Consiste en utilizar un primer en exceso, de tal forma que en los 10 a 15 ciclos iniciales de la reacción, se produce DNA doble cadena que se acumula exponencialmente. Posteriormente cuando se agota el primer limitante, solo se amplifica DNA cadena sencilla del primer en exceso. La cadena sencilla se acumula linealmente y es la complementaria del primer limitante (Gyllensten y Erlich, 1988).

Utilizamos como templado lisado de trofozoitos y DNA genómico de *E. histolytica*. Los productos obtenidos de A-PCR, se hibridan con la sonda complementaria inmovilizada en la placa de microtitulación. Después se incuban con una endonucleasa de restricción específica de los híbridos formados, en este caso es *Rsa I*, con el propósito de liberar la fluoresceína de la sonda. La mezcla de reacción enzimática se transfiere de la placa derivatizada a otra placa de microtitulación para medir la señal fluorescente en un lector automático para placas de 96 pozos. En presencia de productos inespecíficos de PCR no hay fluorescencia porque la hibridación y el corte enzimático no ocurren. El ensayo no requiere lavados, únicamente se hacen dos transferencias y los tiempos de incubación son cortos.

El desarrollo de las diferentes etapas del formato PCR-HERA se, esquematizan en cuadros con líneas delgadas de la figura 4.

Tabla 1. Oligonucleótidos usados en las reacciones de PCR y A-PCR

Oligonucleótidos	Longitud	Secuencia	Posición	Orientación
Secuencias repetidas de rDNA de <i>Entamoeba histolytica</i>				
RER-1 (primer)	23 b	CAAAACATTTCAATTCCTTCATC	1273-1295	+
RER-D5 (primer)	21 b	GATTCATAAGCAACCTTTTGG	700-720, 844-864, 988-1004, 1132-1147,	-
GE-2Fu ^a (sonda)	44 b	Fu-TCCTCTTCACCTC-Fu-TAATTATIGTACTTTGTATTIAGTACTTTT-Biotina	7 31-758, 875-902, 1119-1146, 1163-1190	+
Gene 4 RRV de <i>Rotavirus</i>				
T7 (primer)	19 b	TAATACGACTCACTATAGG	769-787	+
nar Hpa (primer)	25 b	CATTCGGTTAACGGAGGACGTCGTG	978-1002	-
Proteína de membrana externa <i>ompf2</i> de <i>Salmonella typhi</i>				
F2a (primer)	20 b	GTCGACAGATTTTACCTGCC	1-20	+
F2b (primer)	36 b	CAGGCACAGTACTTTAACTTTCATTTTTTATCCTT	502-537	-
Gene rDNA18S de <i>Plasmodium vivax</i>				
UP523 (primer)	22 b	GAATTTAAAACCTTCCCAAAC	523-544	+
LP954 (primer)	22 b	AGAAATTCACCTCTGACATCTG	954-975	-

^aFu indica el monómero de fluoresceína. Los nucleótidos que hibridan con el DNA amplificado están subrayados.

7 MATERIALES Y METODOS.

7.1 CULTIVOS CELULARES.

Se utilizaron los siguientes aislados de amiba: *E. histolytica* HMI:IMSS y *E. histolytica* HK9. Las amibas se cultivaron axénicamente a 37°C en medio BI-S-33 de acuerdo a lo reportado por Daimond (Daimond, 1978). Los cultivos se crecieron hasta la fase logarítmica (48-72 hr) y se cosecharon. Contamos las amibas utilizando un hematocitómetro para tomar un número determinado. En tubos de microcentrífuga se hicieron diluciones seriadas en buffer Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1mM. Los tubos se hirvieron durante 5 min y se centrifugaron 1 min a 12,000 rpm; 2 µl de este sobrenadante se utilizaron para la reacción de PCR. El DNA de las amibas se obtuvo siguiendo el protocolo de Dr. Edman y col. (Edman, 1987).

7.2 DNAs UTILIZADOS.

Clona D5: Esta clona se obtuvo de a partir DNA total de *E. histolytica* digerido con *Sau* 3AI, los fragmentos obtenidos se clonaron en el sitio *Bam* HI de pUC13. Este plásmido recombinante llamado pUCD5 contiene 6 secuencias repetidas de rDNA de *E. histolytica* HMI-IMSS (Esteves, 1990). Comprende de los nucleótidos 347 al 1300 de la secuencia publicada por Bhattacharya y col. (Mittal, 1992).

DNAs heterólogos: La amplificación de la región del gen 4 *RRV* de 234 pb de *Rotavirus* se hizo con el plásmido recombinante pRRV-4 (donado por la Dra. S. López, IBt). La amplificación de 537 pb del gen de la proteína de membrana externa *omp* f2 de *S. typhi* se hizo con el DNA genómico (donado por el Dr. Calva, IBt). La amplificación de 453 pb de rDNA 18S de *P. vivax* se llevó a cabo con el plásmido recombinante pPCR3000pva obtenido a partir de PCR con DNA genómico de *P. vivax*.

7.3 OLIGONUCLEOTIDOS UTILIZADOS.

Los oligonucleótidos utilizados y la sonda Ge-2Fu, fueron sintetizados en la Unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología (Tabla 1), a excepción de los primers utilizados para *E. histolytica*, los cuales fueron sintetizados por la compañía Operon Technologies Inc. Los oligonucleótidos liofilizados se disolvieron en 300 µl de TE (Tris 10 mM pH 8, 0.1mM EDTA) y se purificaron por medio de extracciones con n-butanol (Sawadogo, 1991). Los precipitados obtenidos se resuspendieron en TE y se cuantificaron por densidad óptica a 260 nm. Se llevaron a una concentración de 5 µM y se guardaron en alícuotas a -20°C. Su pureza y el tamaño se determinó en geles de poliacrilamida al 20%, urea 7 M (Maniatis, 1989).

El oligo Ge-2Fu se sintetizó incorporando dos fluoresceínas (una en el extremo 5' y otra interna a 13 nt de ésta) por medio de fosforamiditos con FITC y una CPG-biotina en el extremo 3' (Glen Research). Después se purificó por HPLC, se guardó en alícuotas a -20°C y protegido de la luz.

7.4 REACCION EN CADENA CON *Taq* DNA POLIMERASA (PCR).

La reacción de PCR se hizo de la siguiente manera: la mezcla de 50 µl contiene como templado, 2 µl del DNA del lisado de trofozoitos, en un buffer de amplificación 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8.3, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 50 mM, gelatina 0.001%), dNTP's 200 µM final cada uno, 30 pmolas de cada oligo de amplificación, y 2.5 U de *Taq* Polimerasa (Purificada por Cromatografía de Intercambio Iónico). Los primers utilizados para *E. histolytica* y DNAs heterologos se muestran en la tabla 1. Se utilizó el sistema para PCR 9600 de Perkin Elmer con los siguientes ciclos: una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, 30 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94°C por 30 s, una temperatura de apareamiento a 42°C por 30 s y una temperatura de polimerización a 72°C por 45 s. Finalmente una incubación a 72°C durante 7 min.

7.5 REACCION EN CADENA ASIMETRICA CON *Taq* DNA POLIMERASA (A-PCR).

En la reacción de PCR-Asimétrica se tomaron 4 µl del producto de la reacción del PCR anterior como templado, utilizando los mismos componentes de la reacción de amplificación excepto que el oligo RER-D5 (ver tabla 1) se añadió en exceso (0.5 µM). De tal forma que quedó una relación molar de los oligos 1:50. El volumen final es de 100 µl y se utilizó el mismo programa de PCR con 35 ciclos de amplificación.

El control de contaminación en las reacciones de PCR, se hizo utilizando una cámara Template tamer (Coy). El material y reactivos de la reacción utilizados, como puntas, pipetas, buffers etc., excepto el templado y los primers, se expusieron previamente a la luz UV durante 30 minutos.

7.6 DERIVATIZACION DE LAS PLACAS DE MICROTITULACION.

Materiales

- A. Placas de microtitulación cubiertas con estreptavidina (Pierce Cat. No.15120X).
- B. La sonda biotilada y fluoresceinada, GE-2Fu.
- C. DNA: DNA cadena sencilla proveniente de la PCR Asimétrica (antes de añadirlo se desnaturaliza por calentamiento a 95°C por 5 min y se enfría en hielo.)
- D. DNA de esperma de salmón (Sigma cat. No. D1626). Se preparó una solución de 10 mg/ml sonicado y esterilizado en autoclave. Se guardó en alícuotas a -20 °C.
- E. Buffer SSC 20X: NaCl 3 M, Citrato de sodio 0.3 M pH 7.
- F. Buffer de enlace de la sonda biotilada: SSC 6X, DNA de esperma de salmón 100 µg/ml.
- G. Buffer de fosfatos: Buffer Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 0.1M pH 8.0, NaCl 0.15 M, Tween-20 al 0.05%.
- H. Buffer de lavados/CTAB (Bromuro de cetil-trimetilamonio): Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, CTAB 40 µM.
- I. Buffer de Pre-hibridación: Tris-HCl 50mM pH 8.0, NaCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, Polietilen glicol-8,000 5 % (Sigma Cat. No. P5413).
- J. Buffer de Hibridación: Tris-HCl 50mM pH 8.0, NaCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, Gelatina 0.1 mg/ml (Bio-Rad Cat No. 1770-6537), Polietilen glicol-8,000 5%.
- K. *Taq* Polimerasa I (2.5 U/µl). Purificada por Cromatografía de Intercambio Iónico (Engelke, 1990)
- L. Endonucleasa de restricción *Rsa* I 10 U/µl (Gibco BRL)
- M. Placas de microtitulación Nunc HRP96
- N. Cytofluor® 2300 (Millipore)

Antes de usar la placa de microtitulación cubierta con estreptavidina para el ensayo, se prepara para inmovilizar la sonda GE-2Fu en los pozos. El procedimiento es el siguiente:

1. A cada pozo de la placa micotiter se añade la sonda en 100 µl (GE-2Fu 8.3 µM final) de buffer de enlace, y se incuba a 37°C durante 1 h con agitación (150 rpm).
2. Después de la incubación, se quita el exceso de sonda lavando cada pozo tres veces seguidas con 250 µl de buffer de fosfatos.

3. Se hacen dos lavados utilizando 250 µl de buffer de lavados/CTAB a 37°C durante 15 min y con agitación.
4. Se hacen dos prehibridaciones con 250 µl el buffer de pre-hibridación, a 37°C agitando cada vez durante 15 min.

Después de estos lavados la placa esta lista para el ensayo. Este procedimiento puede hacerse en el momento del ensayo ó 12 hr antes, almacenando la placa en el buffer de pre-hibridación a 4°C. Todos los pasos se hacen protegiendo la placa de la luz.

Las placas de microtitulación cubiertas con estreptavidina se almacenaron con desecante a 4°C. (Es conveniente y económico utilizar estas placas en forma de tiras cuando solo se utilizan algunos pozos de la misma).

7.7 Método PCR-HERA.

A la placa de microtitulación con la sonda inmovilizada:

1. Añadir 88 µl de buffer de hibridación a cada pozo.
2. Añadir 10 µl del DNAs, proveniente de la A-PCR a cada pozo de la placa de microtitulación.
3. Incubar a 37°C durante una hora para llevar a cabo la hibridación.
4. Incubar con 2 µl por pozo de endonucleasa *Rsa* I (1U/µl), durante 90 min a 37°C.
5. Transferir toda la mezcla (100 µl) de cada pozo a otra placa de microtitulación Nunc HRP96.
6. Medir la fluorescencia de las muestras directamente en la placa utilizando los filtros de excitación B: 485/20 y de emisión B: 530/25 en la sensibilidad 5 en el lector Cytofluor® 2300 (Millipore).

Se utilizaron los siguientes controles en cada ensayo: controles internos, que son los transferidos de pozos que contienen únicamente oligo fluoresceinado y fueron tratados en iguales condiciones que los demas. Controles negativos con los A-PCR de los DNAs heterólogos, y los controles positivos en donde utilizamos como secuencia blanco el oligonucleótido C29 que es complementario a la sonda (Tabla 1).

Calculos de Fluorescencia.

Se reportaron Unidades de Fluorescencia Corregidas de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$UFC = UFM - UFC_{li}$$

UFC= Unidades de Fluorescencia Corregidas.

UFM= Unidades de Fluorescencia de la Muestra.

UFC_{li},= Unidades de Fluorescencia del Control interno.

8 RESULTADOS.

8.1 ANALISIS DE LA SECUENCIA D5.

La presencia de DNA repetido en la clona pUCD5 fué confirmada en experimentos previos en el laboratorio del Dr. Lizardi, por ensayos de hibridación tipo Southern. Como ya se mencionó, esta clona contiene secuencias repetidas tipo *Sca* I que se localizaron hacia los extremos de los cistrones palindrómicos ribosomales y con especificidad de cepas patógenas (ver introducción, secuencias *Sca* I). La determinación de la secuencia nucleotídica de ésta clona llamada D5, también se hizo en este laboratorio (Esteves, 1990).

Por otra parte, Bhattacharya y col. reportaron una secuencia de 1300 nt localizada hacia el extremo 3' de los cistrones ribosomales de *E. histolytica* HM1:IMSS (Mittal, 1992). Esta secuencia a la que llamamos 7-*Sca* I contiene 7 secuencias repetidas de 144 pb de tipo *Sca* I. Para saber si la clona D5 (954 nt) que contiene secuencias repetidas, tenía relación con ésta familia de secuencias repetidas, intentamos alineamientos entre ambas secuencias y no funcionaron. Así que utilizamos el programa Gene-Works (Intelligenetics) para hacer una matriz de puntos de 947 nt de la secuencia D5 contra el fragmento ribosomal 7-*Sca* I. En este análisis utilizamos las dos secuencias a partir del sitio *Eco* R I. La matriz de puntos se hizo con los parámetros de búsqueda de 100% de homología y comparando nucleótido por nucleótido. Si observamos en la figura 5 el resultado de la línea diagonal que compara toda la secuencia, es una línea casi continua. La cual indica los nucleótidos que son iguales entre las dos secuencias. Como puede observarse en la matriz de puntos, D5 comprende parte de la secuencia 7-*Sca* I desde el nucleótido 347 al 1300 de esta secuencia. Este resultado muestra que las secuencias son prácticamente iguales, excepto por unos cuantos nucleótidos y por lo tanto esta secuencia (D5) se encuentra localizada hacia los extremos de los cistrones ribosomales (figura 1)

8.2 SECUENCIAS REPETIDAS EN LA CLONA D5.

Para determinar el número de unidades de repetición en la secuencia D5, se utilizó el programa de análisis de secuencias "vu repeats" el cuál localiza secuencias repetidas (Martínez, 1987). El criterio de partición de la secuencia, es decir el inicio de cada repetición se hizo tomando como referencia la posición donde se localiza una región de unión entre el DNA con una Nucleasa tipo I (Zurita, 1991). Se consideraron los fragmentos que se repiten en un mayor número de veces y de mayor longitud de tal forma que, en total encontramos 6 secuencias que se repiten consecutivamente y son de aproximadamente 144 nt cada una. Estas secuencias se llamaron Rep D5-1, Rep D5-2,

Familias de Secuencias repetidas localizadas en la clona D5

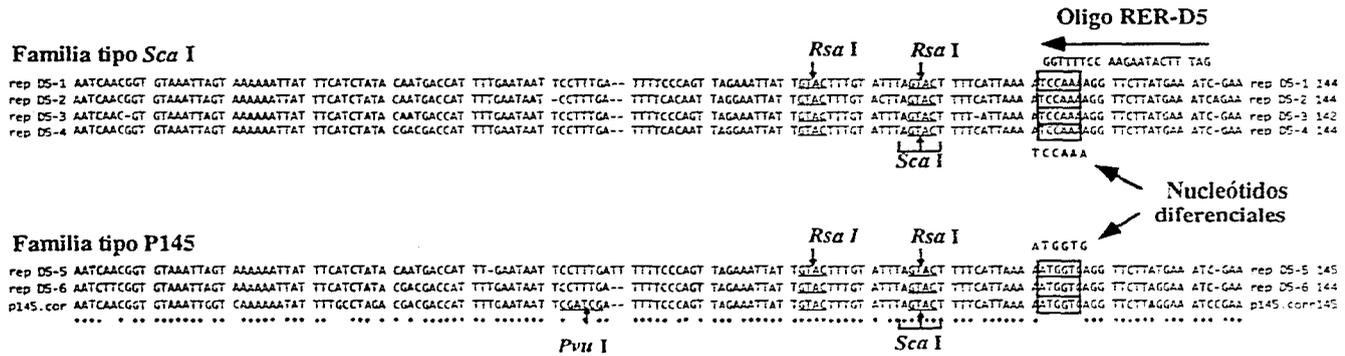


Figura 7. Las dos familias de secuencias repetidas encontradas en D5. Se muestra el tamaño de cada una, los sitios para *Rsa* I (GTIAC), *Sca* I (AGTIACT) y los 6 nucleótidos que las distinguen. El oligo RER-D5 utilizado en exceso en la A-PCR, hibrida en la zona diferencial para la familia tipo *Sca* I amplificando cuatro secuencias repetidas.

Rep D5-3, Rep D5-4, Rep D5-5 y Rep D5-6. El alineamiento de estas secuencias se observa en la figura 6 donde se muestra el tamaño de cada secuencia repetida.

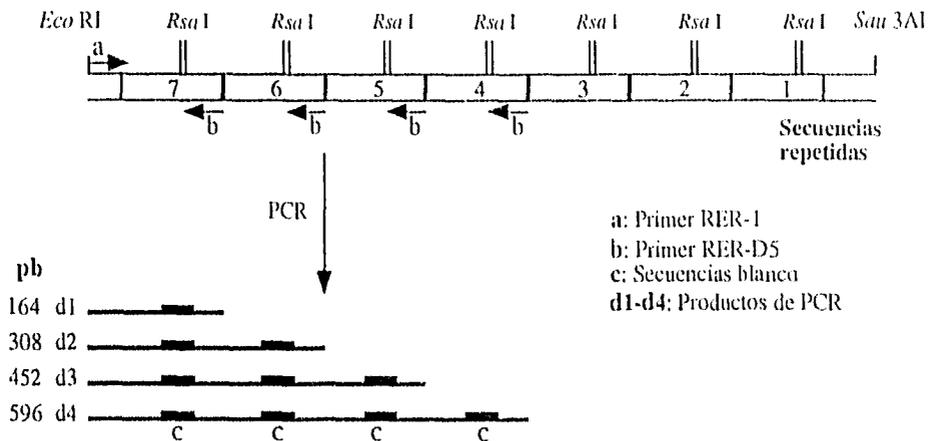
Cuando hicimos el alineamiento de las 6 secuencias repetidas entre sí, encontramos que no son idénticas y pueden subdividirse en dos tipos de familias, con la diferencia de 6 nucleótidos contiguos. La figura 7 muestra las diferencias entre las dos familias. La primer familia tiene los nucleótidos TCCAAA, es del tipo *Sca* I, contiene dos sitios para *Rsa* I y un sitio para *Sca* I. La otra familia tiene los nucleótidos ATGGTG, tiene alta homología con la secuencia P145 (~92% *Pvu* I). También contiene dos sitios de *Rsa* I un sitio para *Sca* I (Olvera, 1995).

Las secuencias repetidas del tipo *Sca* I encontradas en el análisis de D5, son las que utilizamos como blanco para el diseño de oligonucleótidos para PCR, así como para el diseño de la sonda marcada con fluorescencia para el ensayo de PCR-HERA.

8.3 AMPLIFICACION DE SECUENCIAS REPETIDAS DE *E. histolytica*.

Para amplificar las secuencias repetidas de arriba, se diseñaron dos oligonucleótidos para la PCR. El oligo RER-1, el cuál se localiza fuera de las secuencias repetidas justo al final del sitio *Eco* RI, exactamente antes del inicio de las secuencias repetidas y por lo tanto hibrida en un solo sitio. El oligo RER-D5, que hibrida perfectamente con 4 secuencias repetidas tipo *Sca* I. El extremo 5' de éste oligo tiene 5 nucleótidos que hibridan en el sitio donde se localizan los hexanucleótidos diferenciales de los dos tipos de familias encontradas en D5. En la figura 8 panel A se muestran los lugares de alineamiento de este par de oligos sintéticos (flechas a y b) con la secuencias repetidas 4, 5, 6 y 7 para generar 4 productos de PCR de diferentes tamaños (d1, d2, d3 y d4). También se muestra el lugar de hibridación de la sonda GE-2Fu (letra c) con los productos amplificados. Los sitios de restricción para la endonucleasa *Rsa* I se indican con dos líneas paralelas. Los experimentos iniciales de PCR los hicimos utilizando como templado DNA genómico de *Entamoeba histolytica*. En el panel B están los fragmentos obtenidos de la reacción de PCR, que corresponden a los 4 productos del tamaño esperado, 164, 308, 452 y 596 nt respectivamente. En los carriles 5, 6 y 7 observamos una banda de amplificación de un tamaño menor de 1,107 pb con respecto al marcador de peso molecular. Esta banda puede ser el producto de amplificación de otra secuencia repetida. El oligo RER-D5 alinea con dos repetidas consecutivas más, excepto por 5 nucleótidos diferentes en el extremo 5'. Si alinearan los 16 nt complementarios del primer, está la posibilidad de obtener un fragmento de 1,028 pb correspondiente a la repetida No. 2. Entonces, es posible, que la banda que observamos en ésta altura corresponda a otra secuencia amplificada.

A



B

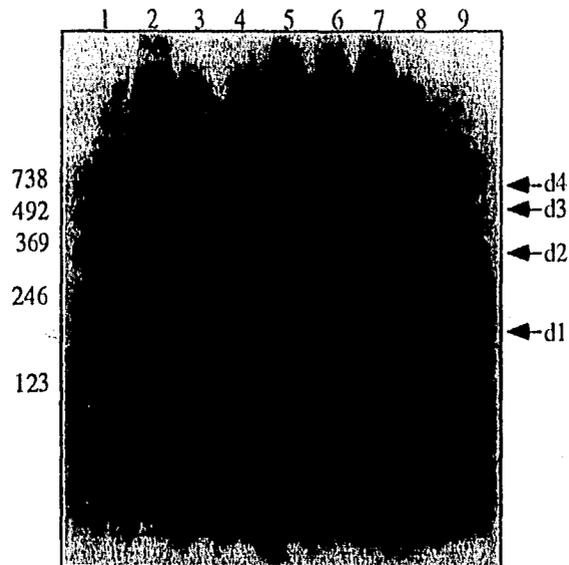


Figura 8. Amplificación de secuencias repetidas *Sca* I del rDNA de *Entamoeba histolytica*. Análisis de los productos de PCR en un gel nativo de poliácridamida al 8%. Carriles 3-7: Productos de PCR de DNA equivalente a 1, 10, 100, 1000 y 1000 amibas, respectivamente. Los carriles 1 y 8: pBR322 *Msp* I; carril 2: ladder 123 y carril 9: PCR sin templado.

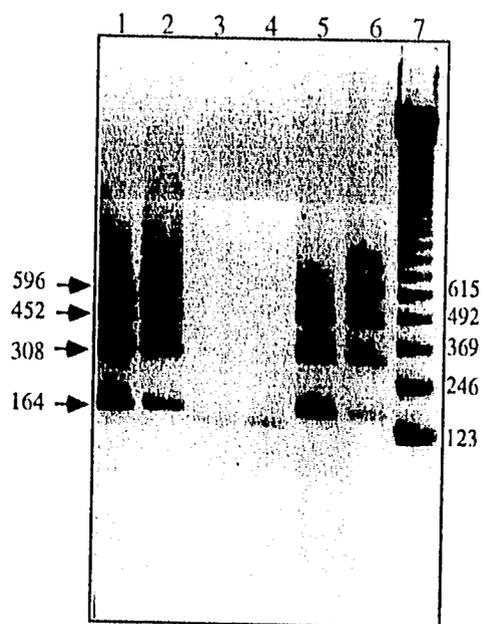


Figura 9. Productos de PCR en gel de agarosa al 2% con buffer TAE 1X. En el carril 1 y 2: PCR de la clona D5, carriles 3 y 4: PCR del fragmento P145, carril 5: PCR de DNA de *E. histolytica* HMI, carril 6: PCR de DNA de *E. histolytica* HK9 y carril 7: ladder 123 (marcador de peso molecular). Gel teñido con bromuro de etidio.

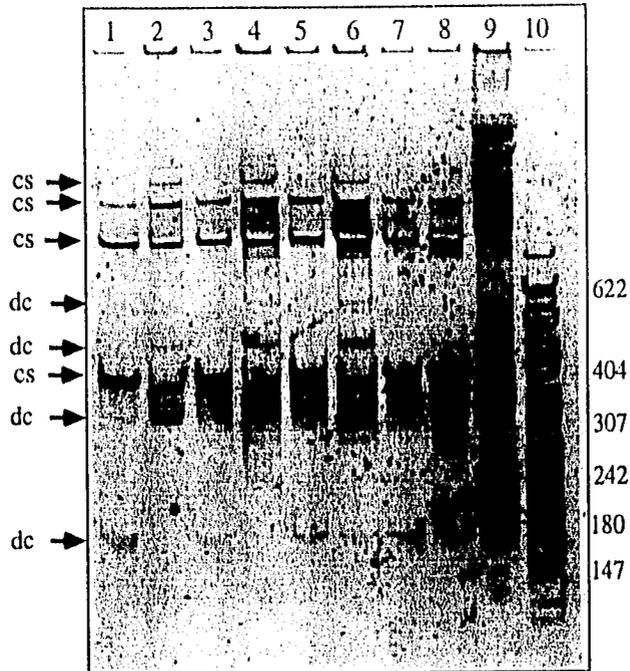


Figura 10. Producción de cadena sencilla con A-PCR utilizando como templado lisado de trofozoitos. Los oligonucleótidos RER-1 y RER-D5 están en diferente relación molar. Gel de poliácridamida al 8%, teñido con nitrato de plata. Carriles 1 y 2 oligonucleótidos en relación 10:1 y 1:10; carriles 3 y 4, 25:1 y 1:25; carriles 5 y 6, 50:1 y 1:50, carriles 7 y 8 100:1 y 1:100 respectivamente; carril 9 PCR en relación 1:1 y carril 10, pBR322 *Msp* I como marcador de peso molecular. Las flechas señalan la cadena sencilla (cs) amplificadas a partir de las secuencias doble cadena (dc).

Cuando hicimos la reacción de PCR utilizando como templado la clona D5, así como con DNA de *E. histolytica* HM1:IMSS y HK9, observamos el mismo patrón típico en escalera de las bandas amplificadas y del tamaño esperado. El análisis de los fragmentos se muestra en la figura 9.

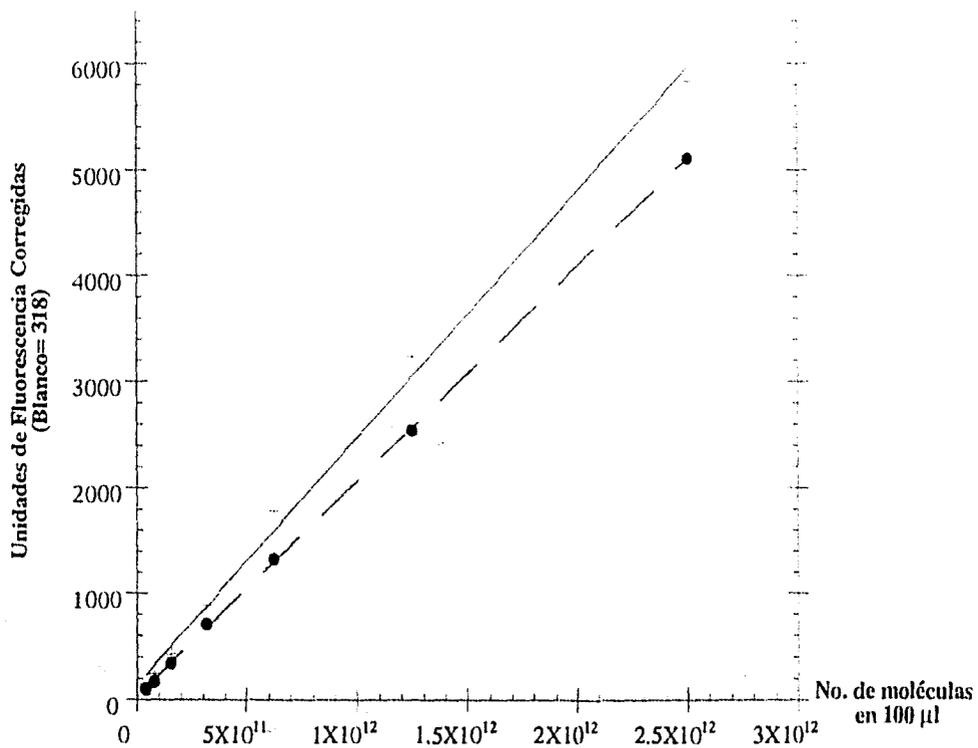
8.4 PCR ASIMETRICA DE TROFOZOITOS.

Para obtener las secuencias repetidas como cadena sencilla efectuamos primero una PCR y después una PCR-Asimétrica (A-PCR). Los oligonucleótidos que se utilizan en ambas reacciones son los mismos, solo que en la segunda reacción uno de los oligos se encuentra en exceso molar respecto al otro, y uno de ellos es limitante. Probamos diferentes relaciones molares de los oligonucleótidos para ver el efecto en la producción de cadena sencilla y analizamos los productos en un gel de poliacrilamida. En el gel de la figura 10 observamos que conforme aumenta la relación molar de oligo en exceso con respecto al oligo limitante, hay un aumento en la producción de cadena sencilla. Con este resultado decidimos utilizar la relación 1:50 (carril 6) en donde observamos la mayor cantidad de producto obtenida con cantidades desde 8×10^{11} hasta 2×10^{12} moléculas de los productos de PCR en una reacción de 100 μ l. Esta cuantificación la hicimos por densitometría (densitómetro 3cx) de los geles teñidos con nitrato de plata.

8.5 DISEÑO DE LA Sonda FLUORESCENTEINADA.

Este oligonucleótido se diseñó buscando en D5 secuencias repetidas cortas de aproximadamente 20 a 35 nt. Además, buscamos en cada secuencia sitios de corte para endonucleasas de restricción con el propósito de utilizar una enzima que cortara el híbrido formado entre la sonda y el producto de A-PCR. Seleccionamos una secuencia de 28 nt que se repite cuatro veces en D5. Contiene tres sitios de restricción, dos sitios para *Rsa* I y uno para *Sca* I. En la Tabla 1 vemos que el tamaño de la sonda (GE-2Fu) es de 44 nt de los cuáles sólo 28 nt hibridan con el producto de A-PCR. También tiene dos fluoresceínas, una fluoresceína en el extremo 5' y otra interna a una distancia de 13 nucleótidos de ésta. En el extremo 3' tiene una biotina para poderla inmovilizar en la placa de microtitulación cubierta con estreptavidina. Además, tiene dos timinas como espaciadores entre la biotina y la sonda. La incorporación de las fluoresceínas y de la biotina se hizo por síntesis química (Material y Métodos).

Esta sonda se diseñó con dos fluoresceínas con el propósito de aumentar la intensidad de fluorescencia. Debido que la sensibilidad que habíamos obtenido con FITC (Isotiocianato de fluoresceína) fué de aproximadamente 3×10^{10} moléculas en 100 μ l y queríamos mejorarla. Para saber si la sonda GE-2Fu tenía mayor fluorescencia que



Gráfica 1. Curvas de Fluorescencia del oligo fluoresceinado GE-2Fu (+) y de Isotiocianato de fluoresceína FITC (•)

Las diluciones se hicieron en placas Nunc HRP96 y las lecturas en el Citofluor 2300 con los Filtros B/B, en sensibilidad 5.

con una sola fluoresceína, hicimos una serie de diluciones en buffer de hibridación de la sonda y de FITC en número de moléculas equivalentes desde 3.9×10^{10} a 2.5×10^{12} . Lo que observamos en la grafica 1 es que las UFC (Unidades de Fluorescencia Corregidas) para la sonda y la FITC, son practicamente iguales en cada punto. No hubo un incremento considerable de la fluorescencia para el caso de la sonda como se esperaba. Es posible que alguna de las dos fluoresceínas de la sonda está anulada por quencheo, ya que la fluorescencia obtenida es como si la sonda solamente tuviera una fluoresceína.

8.6 ELIMINACION DE LA SONDA PEGADA INESPECIFICAMENTE.

Además de la sonda que queda inmovilizada por la gran afinidad entre la biotina y la estreptavidina de placa de microtitulación, encontramos que hay una fracción de sonda que se pega inespecíficamente en los pozos. Es decir que se pega de otra manera que no es la unión biotina-estreptavidina (ej. pegado directo de la sonda al poliestireno). Tratamos de evitar el pegado inespecífico y además lavar lo que se pegó inespecíficamente. Para evitar el pegado inespecífico utilizamos DNA de esperma de salmón como competidor en el buffer de enlace de la sonda. La adición de éste DNA disminuyó aproximadamente 4 veces la cantidad de sonda que se pega inespecíficamente. Para eliminar la sonda pegada inespecíficamente, quitamos el exceso de sonda con buffer de fosfatos. Después de probar varios buffers de lavado para los pozos, encontramos que los buffers que nos dieron mejores resultados fueron un buffer con un detergente no iónico (Tween-20 0.05%) y un buffer con un detergente catiónico a baja concentración (CTAB 40 μ M). Después hicimos dos prehibridaciones en el buffer de pre-hibridación para dejar la placa de microtitulación con la sonda inmovilizada lista para el ensayo (ó para almacenarla a 4°C).

8.7 INMOVILIZACION DE LA SONDA EN LA PLACA DE MICROTITULACION.

Para estimar la cantidad de sonda fluoresceínada que podíamos inmovilizar específicamente en la placa cubierta con estreptavidina, probamos el enlace de 5×10^{12} moléculas de la sonda por cada pozo, sabiendo que la capacidad de enlace es $\sim 6 \times 10^{12}$ moléculas/pozo. Utilizamos las condiciones de enlace y lavados descritas en Material y Métodos. La cantidad de sonda inmovilizada fue determinada de varias maneras. Una fué midiendo la fluorescencia de los pozos antes y después de enlazar la sonda. Después del enlace lavamos el exceso 3 veces con el buffer de fosfatos. Añadimos 100 μ l del buffer de enlace para leer la fluorescencia. Interpolamos los valores en una curva de la sonda GE-2Fu. Otra forma que utilizamos para conocer la cantidad de sonda inmovilizada fué con un oligo biotinilado marcado radioactivamente. En ambos casos encontramos

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

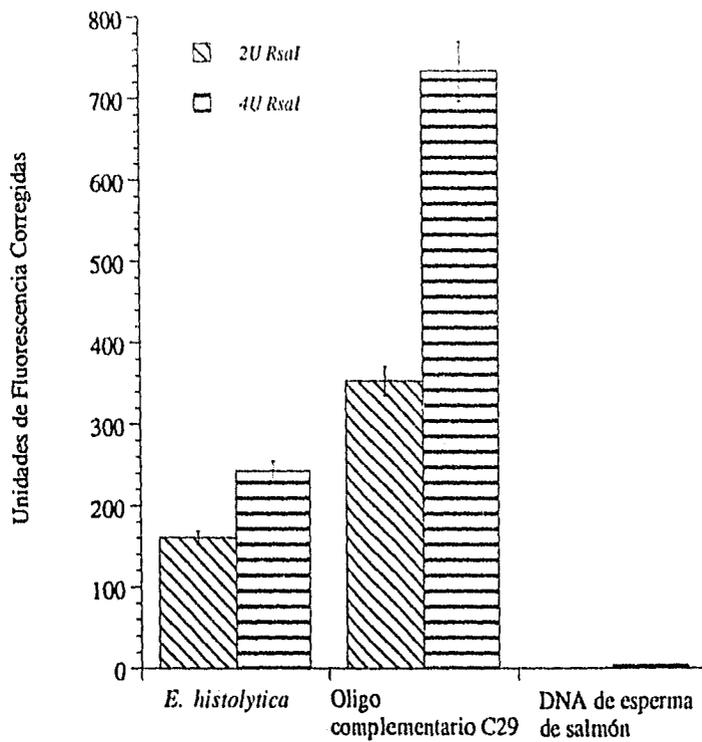
que la cantidad de sonda pegada específicamente, es de aproximadamente 2×10^{14} moléculas por pozo. Este resultado también lo encontramos despegando la sonda enlazada con una incubación de 15 min a 52°C con tiocianato de guanidinio 6M pH 8.

8.8 HIBRIDACION DE LOS PRODUCTOS DE PCR CON LA SONDA INMOVILIZADA.

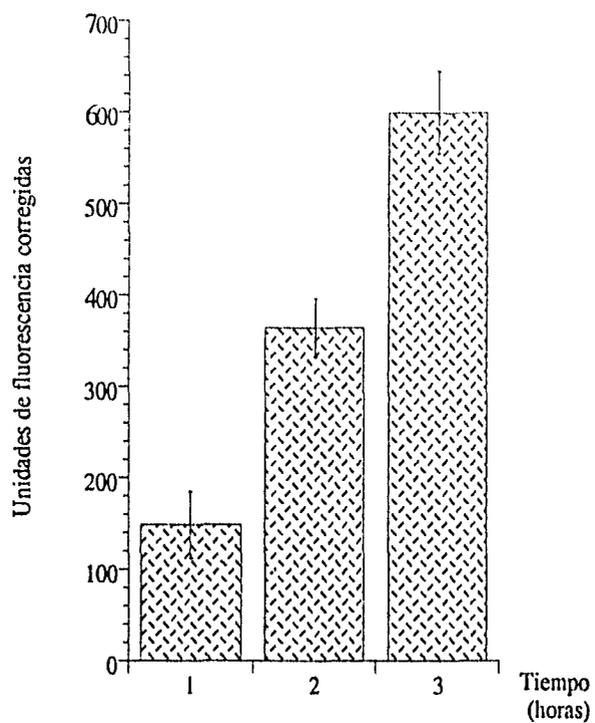
Para asegurar el máximo de híbridos entre la sonda inmovilizada en la placa de microtitulación y los productos de A-PCR de amiba, se añadió como acelerador de reacción PEG al 5 % al buffer de hibridación. La T_m de la sonda es de 43.7°C . La hibridación se realizó a 37°C ($T_m - 6.7^{\circ}\text{C}$). Para determinar el tiempo de hibridación hicimos experimentos hibridando la sonda inmovilizada con el oligo complementario C29 marcado radioactivamente. Encontramos 3×10^{11} moléculas hibridadas en 60 minutos. En tiempos de incubación mas largos no encontramos gran aumento en la cantidad de híbridos formados. Considerando también que teóricamente podíamos tener 100 % de híbridos en 45 minutos (con la sonda en exceso), decidimos hibridar 60 minutos como máximo.

8.9 CORTE DE LOS HIBRIDOS CON LA ENDONUCLEASA *Rsa* I.

Después de hibridar el producto de A-PCR con la sonda inmovilizada se forma un híbrido con los dos sitios para *Rsa* I y uno para *Sca* I. Así que teníamos la posibilidad de usar una u otra ó ambas enzimas en el ensayo. Determinamos la endonucleasa mas conveniente para nuestro ensayo de la siguiente forma. Después de la incubación de hibridación añadimos la endonucleasa y determinamos las UFC de los híbridos liberados despues de transferir la mezcla de digestión enzimática a otra placa. Cuando utilizamos *Rsa* I en los ensayos de corte, siempre fué mayor la liberación de fluorescencia con esta enzima que cuando usamos las dos enzimas juntas. En la figura 11 se muestra la reacción de corte con *Rsa* I y la liberación del producto fluorescente. Decidimos utilizar *Rsa* I y determinar el tiempo de incubación y las unidades de enzima necesarias para obtener un máximo de señal fluorescente en un tiempo corto. Utilizando 2 y 4 unidades, encontramos que a mayor concentración de la enzima, aumentan las unidades de fluorescencia liberadas despues de 45 minutos de incubación. En la gráfica 2 vemos las UFC obtenidas cuando hibridamos productos de A-PCR de amiba, el oligo complementario C29 y DNA de esperma de salmón. Para determinar el tiempo de incubación con la enzima, hibridamos los productos de A-PCR de trofozoitos y medimos las UFC liberadas con 2 unidades de *Rsa* I a diferentes tiempos. En la gráfica 3 observamos un aumento en la fluorescencia conforme aumenta el tiempo de incubación

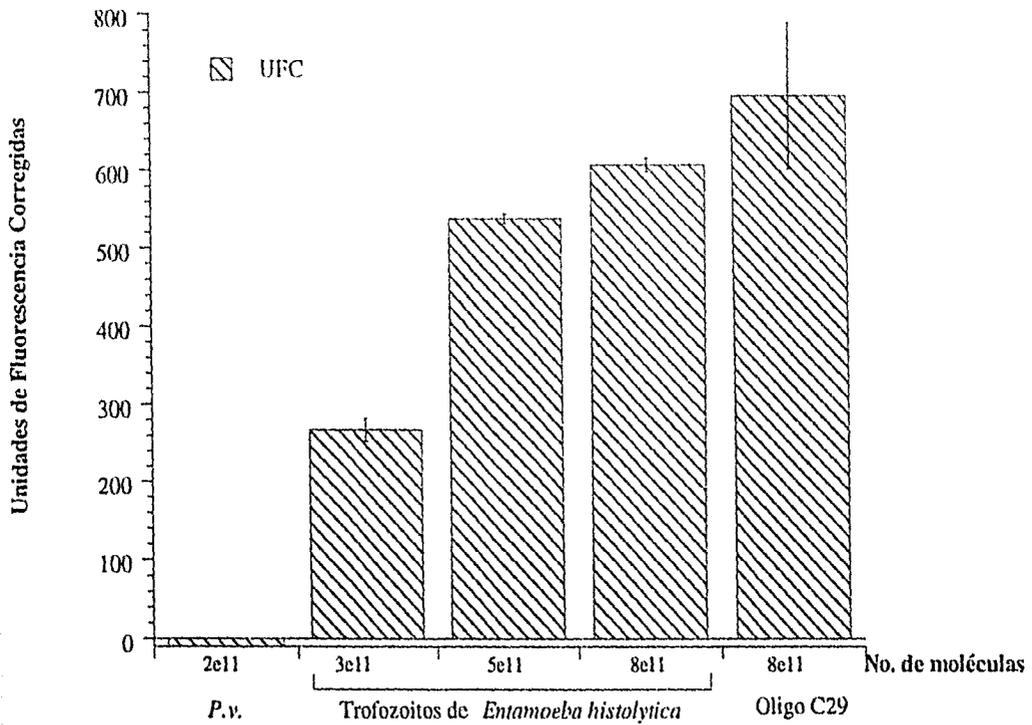


Gráfica 2. Liberación de fluorescencia con 2U y 4 U de RsaI.
 Las unidades de fluorescencia se incrementan conforme aumenta la cantidad de enzima.
 Este es el caso de A-PCR de trofozoitos de *E. histolytica* y del oligo C29 (utilizado como control positivo), lo que no ocurre con el DNA de espermatozoos de salmón.



Gráfica 3. Liberación de fluorescencia con 2 U de Rsa I a diferentes tiempos de incubación. Se utilizaron alícuotas de 10 μ l de A-PCR provenientes de 5 trofozoitos de *E. histolytica* iniciales.

Las barras en las columnas muestran la desviación estandar de duplicados.



Gráfica 4. Ensayo PCR-HERA utilizando diferente número de moléculas de A-PCR. Columna 1: 8 µl de A-PCR de *Plasmodium vivax*; columna 2, 3 y 4: 1, 2 y 3 µl de A-PCR de *E. histolytica* y columna 5: Oligo Complementario C29. Se utilizaron 2 U de *RsaI*.

a 37°C. Las unidades de fluorescencia aumentan hasta 4 veces en 3 hr de incubación con ésta enzima. Estos resultados indican que la fluorescencia liberada se debe a la actividad de la endonucleasa sobre los híbridos formados. Necesitábamos también determinar la relación señal/ruido en función del tiempo de incubación con *Rsa* I a esta concentración (2U). Hicimos la reacción en presencia y en ausencia de productos de A-PCR a diferentes tiempos y encontramos que la fluorescencia aumenta con el tiempo de incubación con la enzima. En presencia de los productos amplificados en 90 minutos la relación señal/ruido fue de 18 veces, mientras que en ausencia de los productos hay variaciones en las UFC. Los valores no son significativos, el ruido de fondo es alto hasta 600 minutos de incubación (datos no mostrados).

8.10 DETECCIÓN DE TROFOZOITOS CON PCR-HERA.

Con los productos de A-PCR provenientes de trofozoitos de *E. histolytica*, *P. vivax* y con el oligo C29 se llevó a cabo el PCR-HERA. En la gráfica 4 vemos que los valores de UFC (unidades de fluorescencia corregidas) para amiba fueron 270, 540 y 620 que corresponden a 3×10^{11} , 5×10^{11} y 8×10^{11} moléculas respectivamente. Para el oligo C29 fué de 700 UFC que corresponden a 8×10^{11} moléculas, mientras que para *P. vivax* no encontramos señal fluorescente para 2×10^{11} moléculas. Aunque el ensayo no se hizo con cantidades equivalentes entre *E. histolytica* y *P. vivax*, las alícuotas utilizadas representan a lo más, la décima parte de la reacción de A-PCR en 100 µl.

8.11 SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE PCR-HERA.

Para conocer la sensibilidad y la especificidad de PCR-HERA, utilizamos alícuotas de 9 µl de A-PCR equivalentes a 0.1, 0.5, 1 y 5 trofozoitos de *E. histolytica* y 9 µl de A-PCR de tres DNAs heterologos. Los productos obtenidos, después de las reacciones de PCR y A-PCR con los DNAs heterologos y con los trofozoitos, fueron analizados en geles de poliacrilamida. En la figura 12 se indica con flechas los productos de doble cadena de la PCR de trofozoitos; mientras que los productos cadena sencilla se retardan en los carriles de A-PCR y son abundantes. El tamaño y número de fragmentos fueron correctos para todos los casos. Para el caso de los productos de PCR y A-PCR de los DNAs heterologos (*P. vivax*, *Rotavirus* y *S. typhi*) se muestran en la figura 12a, en donde observamos también el retardamiento de la cadena sencilla. Los resultados del ensayo utilizando éstos productos amplificados los encontramos en la gráfica 5. Ahí se aprecia la especificidad y sensibilidad del formato. No hay señal fluorescente significativa para los DNAs heterologos, y logramos detectar hasta un décimo de trofozoito.

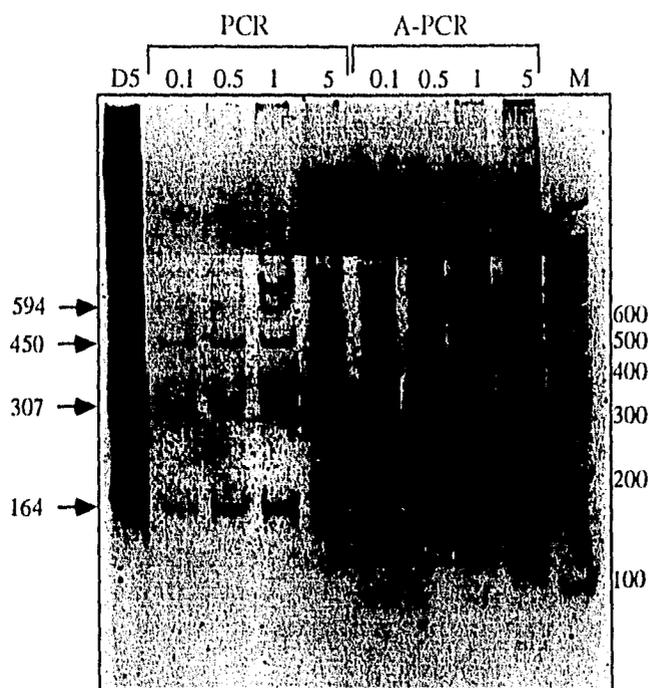


Figura 12. Gel nativo de Poliacrilamida al 8% teñido con nitrato de plata. Productos de PCR y A-PCR provenientes de 0.1, 0.5, 1 y 5 trofozoitos. Carril D5: productos de PCR de la clona D5; carriles PCR: los fragmentos de doble cadena de las secuencias amplificadas se indican con flechas; carriles A-PCR: los productos amplificados como cadena sencilla; carril M: ladder 100 como marcador de peso molecular.

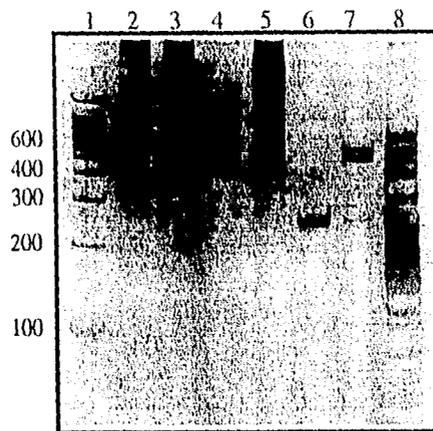
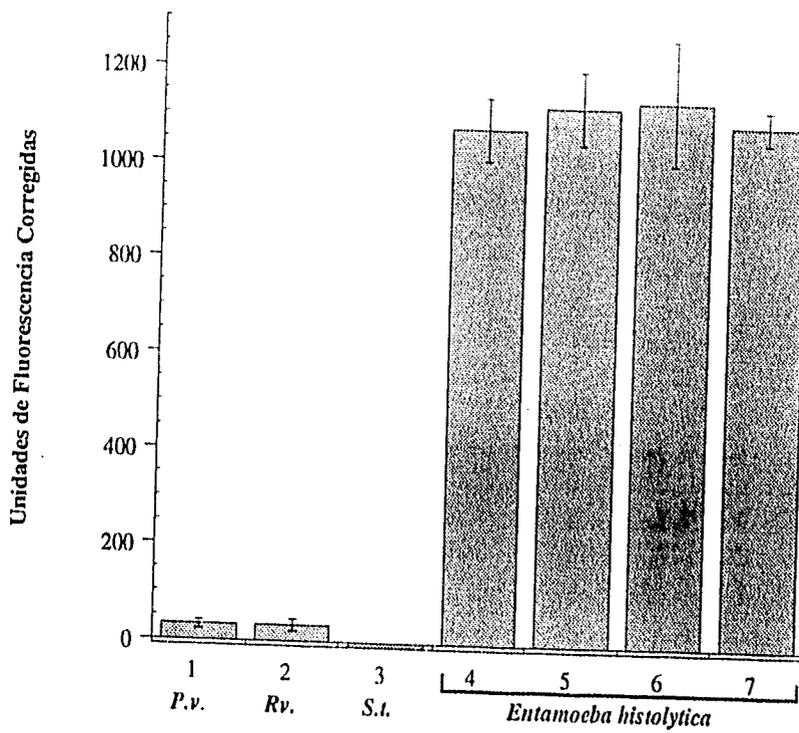


Figura 12a. Productos de PCR y A-PCR de DNAs heterologos en gel de poliacrilamida al 8 %. Carril 2: Amplificación por PCR de un fragmento de 453 pb. del gene de DNA ribosomal 18S de *P. vivax*; carril 3: A-PCR de *P. vivax*; carril 4: Amplificación por PCR de un fragmento de 537 pb. del gene *omp S2* de *S. typhi*; carril 5: A-PCR de *S. typhi*; carril 6: Amplificación por PCR de un fragmento de 234 pb. del gene 4RRV de *Rotavirus*; carril 7: A-PCR de *Rotavirus*. Se aplicaron al gel alscuotas de 3 μ l de una reacción de 100 μ l de PCR. Carril 1: Ladder 100 y carril 8: pBR322, *Msp I* (como marcadores de peso molecular).



Gráfica 5. Especificidad y sensibilidad de PCR-HERA.

Columnas: 1, 2 y 3: Alcuotas de 9 μ l de A-PCR de *Plasmodium vivax*, Rotavirus, y *Salmonella typhi*, respectivamente. Columnas: 4, 5, 6 y 7: Alcuotas de 9 μ l de A-PCR de 0.1, 0.5, 1 y 5 trofozoitos de *Entamoeba histolytica*.

Tabla 2. Detección de *Entamoeba histolytica* utilizando PCR-HERA.

Ensayo	DNA de <i>E. histolytica</i>		DNAs heterologos (control)		relación °Señal-ruido
	No. de Trofozoitos	UFC±ds ^a	Muestra ^b	UFC±ds ^a	
1	0.1	285±29	SS	4.5±15	72
	0.5	253±7	Pv	-60±38	
	1	363±44	Rv	no det.	
	5	399±102	St	no det.	
2	0.1	368±91	SS	-14.5±39	26
	0.5	288±4	Pv	14.5±25	
	1	393±6	Rv	no det.	
	5	448±78	St	no det.	
3	0.1	1074±65	SS	no det.	35
	0.5	1124±75	Pv	31.7±10	
	1	1137±129	Rv	32±12	
	5	1090±33	St	-35±13	

^aUnidades de fluorescencia corregidas ± desviación estandar

^bSS: DNA de espermatozoos de salmón; Pv: *Plasmodium vivax*; Rv: rotavirus; St: *Salmonella typhi*

^cPromedio de UFC para *E. histolytica* en cada set del ensayo dividido entre las UFC mas altas obtenidas en el mismo ensayo con DNAs heterologos.

8.12 EXPERIMENTOS CON PCR-HERA PARA EVALUAR REPRODUCTIBILIDAD.

Se llevaron a cabo tres experimentos utilizando PCR-HERA y se resumen en la tabla 2. Se indica el número de trofozoitos utilizados para la PCR, las unidades de fluorescencia obtenidas para cada caso y las obtenidas para diferentes DNAs heterólogos. Los valores de fluorescencia se incrementan conforme aumenta el número de trofozoitos para cada ensayo (ej. ensayo 1 desde 285 ± 29 hasta 399 ± 102). Para las muestras heterólogas la señal no es significativa, el valor más alto es de 32 ± 12 . Si comparamos las UFC para 0.1 trofozoitos entre el experimento 1 y 3 es de 285 ± 29 y 1070 ± 65 respectivamente. La intensidad de fluorescencia en el experimento 3 es 3.7 veces mayor que en el 1. Esta diferencia se debe a que utilizamos un lote diferente de la enzima *Rsa I*. En los experimentos 1 y 2 las UFC son similares, utilizamos la misma enzima incubando 90 y 120 minutos respectivamente, la desviación estandar es de cuadruplicados de la reacción. La relación señal/ruido para los 3 ensayos es de 72, 26 y 35 veces respectivamente.

9 DISCUSION Y CONCLUSIONES.

El ensayo PCR-HERA funciona por medio de una señal fluorescente. La señal positiva, para este caso, está determinada por la presencia de secuencias blanco amplificadas como productos de cadena sencilla específicos de *Entamoeba histolytica*. Ya que son las únicas que pueden hibridar con la sonda fluoresceinada inmovilizada en la placa de microtitulación. La señal fluorescente se obtiene incubando con la endonucleasa *Rsa I* para cortar el híbrido formado y liberar la fluoresceína de la sonda. La señal es negativa aun cuando están presentes otros productos derivados de amplificación inespecífica de la PCR.

Para amplificar las secuencias repetidas a partir de trofozoitos de *E. histolytica* no fue necesario hacer una purificación previa del DNA. El procedimiento que utilizamos para la lisis de trofozoitos es muy sencillo (ver Material y Métodos). Actualmente se utilizan técnicas como la extracción con fenol cloroformo y precipitación con etanol para extracción de DNA. Se puede extraer suficiente DNA de quistes de *E. histolytica* a partir de 50 mg de heces fecales provenientes de pacientes con sintomatología (comunicación personal, Dra Enedina Jimenez del Hospital Infantil D.F.). Si el ensayo se aplicara a muestras biológicas con quistes, se podrán probar técnicas muy simples (ej. congelamiento-descongelamiento) como la que se han reportado recientemente para quistes de *Acanthamoeba* (Lai, 1994).

Sistema PCR-SHARP

- 1- En un tubo mezclar el producto de PCR con el buffer de dilucion y el reactivo desnaturizante.
Agitar a 1200 rpm 30 s.
Incubar a temperatura ambiente 10 min.
Añadir la sonda y agitar a temperatura ambiente 30 s.
- 2- Incubar a 65 °C durante 30 min.
- 3- Transferir a la placa de microtitulación.
Agitar la placa a 25 °C durante 30 min y decantar.
- 4- Añadir 100 µl de buffer de reacción/pozo, agitar a 25 °C durante 30 min y decantar.
- 5- Lavar 5 veces con buffer de lavado.
Lavar una vez con agua desionizada.
- 6- Añadir 100 µl de substrato/pozo
- 7- Incubar a 37 °C 1 h.
- 8- Leer la absorbancia.

Sistema PCR-HERA

- 1- Transferir el producto de PCR a la placa de microtitulación para hibridar con la sonda inmovilizada durante 1 h a 37 °C
- 2- Incubar con la enzima *Rsa* I a 37 °C durante 90 min.
- 3- Transferir a otra placa de microtitulación para leer la fluorescencia.

Figura 13. Comparación del número de pasos entre el sistema de detección PCR-SHARP y el sistema PCR-HERA

La utilización de productos a partir de una A-PCR se hizo para aumentar la eficiencia de hibridación de las secuencias blanco con la sonda inmovilizada. Debido a que productos doble cadena tienden a reasociarse y desplazar a la sonda. Las dos reacciones de PCR que se hacen en este ensayo se puede simplificar en una sola reacción. Si después de la PCR utilizamos una exonucleasa específica que actúe sobre una de las cadenas para obtener cadena sencilla. La exonucleasa gen 6 del fago T7 se ha utilizado para digerir selectivamente una de las dos cadenas del productos de PCR (Strauss, 1991, Nikiforov, 1994).

Con éste trabajo nosotros desarrollamos un ensayo de detección de productos de PCR, sensible, específico, rápido y no isotópico en formato de placas de microtitulación. La sensibilidad del ensayo, debida al uso de secuencias repetidas de *E. histolytica*, permitió detectar hasta un décimo del genoma del trofozoito, debido al número de secuencias blanco que hay por cada parásito. La especificidad de PCR-HERA se demostró con diferentes productos de PCR. Obtenemos una señal fuerte de fluorescencia cuando utilizamos productos de PCR de trofozoitos, mientras que con DNAs heterólogos esto no ocurre. Los ensayos en placas de microtitulación que se utilizan en los laboratorios clínicos, generalmente son laboriosos y requieren de numerosas etapas de lavados. El formato que proponemos es semi-homogéneo, ya que consiste solamente de dos transferencias. La primera, del tubo de PCR a la placa de microtitulación en donde se lleva a cabo el ensayo PCR-HERA. Y la segunda transferencia de ésta placa a otra placa de microtitulación para la detección fluorescente. La implementación de este formato con propósitos de diagnóstico es atractiva. Se pueden analizar un gran número de muestras en un tiempo corto si se considera el uso de equipo semi-automático para las transferencias de una placa a otra.

Cuando utilizamos 0.1, 0.5, 1 y 5 de trofozoito, de *E. histolytica* las unidades de fluorescencia se incrementan gradualmente. No encontramos una respuesta proporcional para hacer el ensayo cuantitativo. Esto debido a la reamplificación de las secuencias con A-PCR. Sin embargo, si se implementa una sola reacción de PCR, con el uso de una exonucleasa específica, la cuantificación sería posible.

En los ensayos de captura de amplicones, como en la hibridación tipo sandwich en formato de placa de microtitulación, generalmente se utilizan un par de oligonucleótidos (Boni, 1993). Uno inmovilizado en la placa que sirve para capturar las cadenas de la PCR y otro como sonda detectora de señal. Una de las ventajas de PCR-HERA es que la sonda tiene ambas funciones. Como sonda de captura y sonda reportera de señal sin la necesidad de otra molécula intermediaria. Este ensayo se puede aplicar a cualquier patógeno modificando solamente los primers y la sonda.

Existen varias compañías que desarrollan productos de diagnóstico basados en sondas DNA. Algunas venden "kits" de pruebas basadas en PCR (como los descritos en la sección de métodos de detección). Si comparamos el número de pasos que se requieren para PCR-HERA con el "kit" comercial de SHARP, vemos en la figura 13 que se necesitan ocho pasos (considerando incubaciones, transferencias, etc.) y solamente tres pasos para PCR-HERA. La simplificación de los procedimientos del ensayo, es uno de los objetivos más importantes para los laboratorios clínicos.

Con el uso de nucleótidos marcados con fluoróforos, es posible la obtención directa de sondas fluorescentes. A futuro, el uso de PCR-HERA podría implementarse para ensayos de discriminación alelica, utilizando varias sondas marcadas con un fluoróforo diferente en un mismo pozo. La señal se puede detectar con diferentes pares de filtros específicos para cada fluoróforo.

Los ensayos de PCR para la detección de *E. histolytica* no distinguen cepas patógenas de no patógenas (Acuña, 1993, Mirelman, 1990) debido a problemas de especificidad y los resultados son controvertidos. PCR-HERA se puede utilizar para detectar amibas patógenas (utilizando los primers y la sonda de éste trabajo) y no patógenas, diseñando un par de primers para genes ribosomales o para secuencias repetidas de *E. dispar*. De esta manera se podría aplicar en epidemiología, prevención y tratamiento de la enfermedad.

La factibilidad del diagnóstico basado en métodos de ingeniería genética se analiza con la implementación de nuevas tecnologías. Es importante considerar varios aspectos como son el método de detección, costo, flexibilidad del ensayo, soporte técnico etc. En el caso de la implementación de PCR-HERA para el diagnóstico de *E. histolytica*, pensamos que si se trabajara en aspectos puntuales como son el procesamiento simple de muestras biológicas, la PCR de un solo paso, la validación clínica (reconocimiento de la SSA) y de campo, este modelo representa una alternativa viable para el diagnóstico de amibiasis.

10 BIBLIOGRAFIA

- Acuña-Soto, R., Samuelson, J., Girolami, P., Zarate, L., Milla-Velazco, F., Schoolnik, G. and Wirth, D.(1993) Application of the Polymerase Chain Reaction to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **48** (1) p58-70.
- Albach, R. A., Booden, T., Bonlayangoor, P. and Downing, S. (1980) Concepts of junction of peripheral non-chromatin and endosome in *E. histolytica*. *Arch. Invest. Med. (México)*, **11** Suppl 1 p63-74.
- Arroyo-Begovich, A., Cárabez-trejo, A. and Ruiz-Herrera, J.(1980) Identification of the structural components in the cyst wall of *Entamoeba invades*. *J. Parasit.* **66** p735.
- Ashall, F., Yip-Chuck, D. A. M., Luquetti, A. A. and Miles, M. A.(1988) Radiolabeled total parasite DNA probe specifically detects *Trypanosoma cruzi* in mammalian blood. *J. Clin. Microb.* **26** p576.
- Barker, P., Suehsang, L., Rooney W., Alecrim, G., Dourado, H. and Whirt, D.(1986) Specific DNA probe for the diagnosis of *Plasmodium falciparum*. *Science* **231** p1434-1436.
- Barker, R. H., Banchongaksorn, T., Courval J. et al. (1992) A simple method to detect *Plasmodium falciparum* directly from blood samples using the Polymerase Chain Reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **46** (4) p416-426.
- Bassler, HA., Withman, P. and Batt, C. (1994). A *Taq Man* PCR-based assay for *Listeria monocytogenes*. The San Diego Conference .The Genetic Revolution.
- Bauwens, J.E., Clark, A. M. and Stamm, W. E. (1993). Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* endocervical infections by a commercial polymerase chain reaction assay. *J. Clin. Microb.* **31**, p3023-7.
- Bhattacharya, S., Bhattacharya, A., Diamond, L. and Soldo, A.(1989) Circular DNA of *E. histolytica* encodes ribosomal RNA. *J. Protozool.* **36** (5) p455-458.
- Bhattacharya, S., Bhattacharya, A. and Diamond, L.(1992) *Entamoeba histolytica* extrachromosomal circular ribosomal DNA: Analysis of clonal variation in a hypervariable region. *Exp. Parasit.* **74** p200-204.
- Boletín de Morbilidad y Mortalidad(1994) Vol I No.
- Bobo, L., Coudee, F., Yolken, R. H., Quinn, T. and Viscidi, R. P.(1990). Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* cervical infection by detection of amplified DNA with an enzyme immunoassay. *J. Clin. Microb.* **28** p1968-73.
- Böni, J. and Schlupbach, J. (1993). Sensitive and quantitative detection of PCR-amplified HIV-1 DNA products by an enzyme linked immunoassay following solution hybridization with two differently labelled oligonucleotide probes. *Mol. and Cell. Prob.* **7** p361-371.
- Borst, P., Fase-Fowler, F., Frasch, A., Hoeljmackers, J. and Weijers, P(1980). Characterization of DNA from *Trypanosoma brucei* and related trypanosomes by restriction and endonuclease digestion. *Mol. Biochem. Parasit.* **1** p221-246.
- Bracha, R., Diamond, L. S., Ackers, J.P. Burchard, G.D. and Mirelman, D.(1990) Differentiation of clinical isolates of *Entamoeba histolytica* by using specific DNA probes. *J. Clin. Microb.* **V 28** No. 4 p680-684.
- Calderón, J., Muñoz, M.L. and Acosta, H.M.(1980) Surface redistribution and release of antibody-induced caps in *Entamoeba*. *J. Exp. Med.* **151** p184.
- Carullo, R., Agrawal, S. Flores, C., Zamecnik, P. and Wolf, D(1988). Detection of nucleic acid hybridization by nonradioactive fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **V.85** p8790-8794 .

- Castro, C. and Castañeda, M.(1981). Genome organization and ploidy number in *Trypanosoma cruzi*. Molec. Biochem. Parasit. 4 p273-282.
- Clark, C.G. and Cross, G. A. M.(1987) rRNA genes of *Naegleria gruberi* are carried exclusively on a 14 Kb plasmid. Mol.Cel.Biol. 7 p3027-3031.
- Cleveland, L. R., and Sanders, E. P.(1930) The virulence of pure line and several strains of *Entamoeba histolytica* for the liver of cats and the relation of bacterial cultivation and liver passage to virulence. Am. J. Hyg. 1.
- Cohen, J. (1995) A stubborn amoeba takes center stage. Science 267 p822.
- Cruz, J.(1988) Aislamiento y caracterización de DNA repetitivo de *Entamoeba histolytica*. Tesis de Maestría en Investigación Biomedica Basica.
- Di Cesare, J., Grassman, B., Picozza, E. and Woudenberg, T.(1993) A high-sensitivity electrochemiluminescence-based detection system for automated PCR product quantitation. Biotec. V 15 No1 p152-156.
- Diamond, L. S., Harlow, D. R. and Cunnick, C. C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. Tras. Roy. Soc. of Trop. Med. and Hyg. 72 p431-32.
- Dobell C.(1919) The amoebae living in man. A zoological monograph. John Ball, Sons & Danielson, London.
- Edman, U., Meza, I. and Agabian, N.(1987) Genomic and cDNA actin sequences from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 p3020-28
- Engelke, D., Krikos, A., Bruck, M. and Ginsburg, D. (1990) Purification of *Thermus aquaticus* DNA Polymerase expressed in *Escherichia coli*. Anal. Biochem. 191 p396-400.
- Esteves, M. L.(1990) Clonación y caracterización de genes ribosomales de *E. histolytica*. Tesis de Maestría en Biotecnología.
- Franzen, L., Shabo, R., Perlman, H., Wigzell, H., Westing, G., Aslund, L. and Petterson, U.(1984) Analysis of clinical specimens by hybridization with probe containing repetitive DNA from *Plasmodium falciparum*. Lancet 1 p525-527.
- Garfinkel, L., Giladi, M., Huber, M., Gitler, C., Mirelman, D., Revel, M. and Rozenblatt, S. (1989) DNA probes specific for *Entamoeba histolytica* possessing pathogenic and nonpathogenic zymodemes. In. and Imm. V 57 No. 3 p926-931.
- Gonzalez, A., Prediger, A., Huecas, M., Nogueira, N., and Lizardi, P.(1984) Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: its use in a high-sensitivity parasite detection assay. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 p3356-3360.
- Gonzalez Robles, A. and Martínez-Palomo, A.(1983) Scanning electron microscopy of attached trophozoites of *Entamoeba histolytica*. J. Protozool. 30 p692.
- Gyllensten, U. and Erlich H. (1988) Generation of single-stranded DNA by polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85 p 7652-56.
- Holloway, B., Erdman, D. D., Durigon, E. L., and Murtagh J. J. Jr.(1993) An exonuclease-amplification coupled capture technique improves detection of PCR product. Nucl. Ac. Res. 21 p3905-06.
- Holmberg, M. and Wigzell, H.(1987) DNA hybridization assay for detection of malaria sporozoites in mosquitoes. Parasit. To. 3 p380-83.

- Huber, M., Koller, B., Gitler, C., Mirelman, D., Revel, M., Rozenblatt, S. and Garfinkel, L.(1989) *Entamoeba histolytica* ribosomal RNA genes are carried on palindromic circular DNA molecules. *Mol. and Bioch. Parasit.* **32** p285-296.
- Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J. and White T.(1990) PCR Protocols. Academic Press.
- Jaschek, G., Gaydous, C.A., Welsh, L.E. and Quinn, T.C.(1993) Direct detection of *Chlamydia trachomatis* from symptomatic and asymptomatic men by using a rapid polymerase chain reaction. *J. Clin. Microb.* **31** p1209-1212.
- Keller, G. H., Huang, D. P. and Manak, M. M. (1989). A sensitive nonisotopic hybridization assay for HIV-1 DNA. *Anal. Biochem.* **177** p27-32.
- Kemp, J.D., Smith, D., Foote, S., Samaras, N. and Peterson, G.(1989) Colorimetric detection of specific DNA segments amplified by polymerase chain reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** p2423-2427.
- Kettis, A.A. and Sundquist, M (1978) Capping in *Entamoeba histolytica* :acceleration and inhibition by experimental procedures p324
- Kricka, L. J. (1992) Noisotopic DNA probe techniques. Academic Press, Inc.
- Lai, S., Asgari, M. and Henney, H. R. Jr.(1994) Nonradioactive DNA probe and polymerase chain reaction procedures for the specific detection of *Acanthamoeba*. *Mol. and Cell. Prob.* **8** p81-89
- Lazar, J.G. Advanced Methods in PCR Product detection(1994). PCR Meth. and applic. pS1-14
- Lazar, J. G., Tumulty, J. A., Salim, H. and Challberg, S. S.(1993). Sensitive and specific detection of PCR products: Application of the Digene Sharp Signal™ System. Presented at the 93rd Annual Meeting of the American Society for Microbiology, May, Atlanta, GA.
- Longo, M., Beringler, M and Hartley, J.(1990) Use of uracil DNA glycosylase to control carryover contamination in PCR. *Gene* **93** p125.
- Martinez, M. H.(1987) Sequence analysis programs manual. Biomathematics Computation Laboratory, University of California at San Francisco.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J.(1989). Molecular cloning a Laboratory Manual. 2nd. edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mantero, G., Zonaro, A., Albertini, A., Bertolo, P. and Primi, D.(1991). DNA enzyme immunoassay: general method for detecting products of polymerase chain reaction. *Clin. Chem.* **37** p422-29.
- Martinez-Palomo A.(1982) Cell biology. En: The biology of *Entamoeba histolytica*. Research Studies Press Chichister.
- Martinez-Palomo A., and Rufz Palacios, G.(1990) Amebiasis in tropical ang Geographical Medicine Mc Graww Hill N.Y. (Warren K.S. and Mahmoud A.A.F. Eds.) p327-344.
- Meza, I., Torres-Guerrero, H.K. and Meraz, M.A. (1990) Molecular organization of *Entamoeba histolytica*. In: Amebiasis infection and disease by *E. histolytica* p 9-42.
- Meza, I., Sahanero, M., Cazares, I., and Brian, J. (1983) Isolation and characterization of actin from *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* **258** p3936-41.
- Mirelman, D., Bracha, R., Rozenblatt, S. and Garfinkel, L.(1990). Repetitive DNA elements characteristic of pathogenic *Entamoeba histolytica* strains can also be detected after polymerase chain reaction in a cloned nonpathogenic strain. *In. and Imm.* **58** p1660-63.

- Mittal, V., Ramachandran, S., Sehgal, D., Bhattacharya, A. and Bhattacharya, S.(1991) Sequence analysis of a DNA fragment with yeast autonomously replicating sequence activity from the extrachromosomal rDNA circle of *E. histolytica*. Nucl. Ac. Res. **19** p2777.
- Mittal, V., Bhattacharya, A. and Bhattacharya, S.(1992). Organization of repeated sequences in the region downstream of rRNA genes in the rDNA episome of *Entamoeba histolytica*. Arch. of Med. Res. (Mexico) **23** p17-18.
- Mittal, V., Sehgal, D., Bhattacharya, A. and Bhattacharya, S.(1992) A second short repeat sequence detected downstream of rRNA genes in the *Entamoeba histolytica* rDNA episome. Mol. and Biochem. Parasit. **54** p97-100.
- Nanda, R., Bareja, U. and Anand B. S. (1984) *Entamoeba histolytica* cyst passers: clinical features and outcome in untreated subjects. Lancet **2**: p301-303
- Nikiforov, T. T., Rendle, R. B., Kotewicz, M.L., and Rogers, Y-H. (1994). The Use of Phosphorothioate Primers and Exonuclease Hydrolysis for the Preparation of Single-stranded PCR Products and their Detection by Solid-phase Hybridization. PCR Methods and Applications **3**, p285-291.
- Olvera, A. (1995) Cuantificación de la frecuencia de elementos repetidos en el episoma ribosomal de diferentes cepas patógenas de *E. histolytica*. Tesis de licenciatura en Biología, 1995.
- Ravel-Chapuis, P., Nicolas, P., Nigon, V., Neyret, O., and Guerrant, R. L. (1985). Extrachromosomal circular nuclear rDNA in *Euglena gracilis*. Nuc. Ac. Res. **13** p7529-7537.
- Romero, J.L., Descoutaux, S., Reed, S., Orozco, E., Santos, J., and Samuelson, J.(1992). Use of Polymerase Chain Reaction and Nonradiative DNA Probes to diagnose *Entamoeba histolytica* in clinical samples. Arch. of Med. Res. **23** No. 2 p277-279.
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K. and Erlich, H.(1988) Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science **239** p487-91.
- Samuelson, J., Acuña, R., Reed, S., Biagi, F. and Wirth, D.(1989) DNA hybridization probe for clinical diagnosis of *Entamoeba histolytica*. J. of Clin. Microb. **27** p671-676.
- Sawadogo, M and Van Dyke, M.W.(1991) A rapid method for the purification of deprotected oligodeoxynucleotides. Nucl. Ac. Res. **19** No.3 p674.
- Schaffer, J.G., Scantlan, T.M. and Iralu, B.(1961) Observations on cell divisions of *Entamoeba histolytica* in culture. Am. J. Trop. Med. Hyg. **10** p167.
- Sehgal, D., Mittal, V., Ramachandran, S., Dhar, S.K., Battacharya, A., Battacharya, S.(1994). Nucleotide sequence organisation and analysis of the nuclear ribosomal DNA circle of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. Mol. and Biochem. Parasit. **67** p205-214.
- Sepulveda, B and Martinez-Palomo, A.(1984) Amebiasis. In K.S. Warren and A.A.F. Mahmoud (eds): Trop. and Geograph. med. N. Y. Mc Graw Hill p305-318 Schaudin F. (1903) Untersuchungen über die Fortpflanzung eininger rhizopodem arbeiten aus dem kaiserlichen gesundheitsmate **19** p547-576.
- Sloof, P., Bos, J., Konings, F., Borst, P., Gutteridge, W. and Leon, W.(1983) Characterization of satellite DNA in *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. J. Molec. Biol. **167** p1-21.
- Solner-Web and Tower J.(1986) Transcription of clones eucariotic ribosomal RNA genes. Ann. Rev. Biochem. **55** p801-830.
- Strauss, N. A., Zagursky, R. J.(1991). In vitro production of large single-stranded templates for DNA sequencing. Biotechniques. **10** p376- 84.

-Walsh, J. (1986) Problems in recognition and diagnosis of amebiasis-estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev. Infect. Dis.* **8** p228-238.

-Weiss, J.B. (1995). DNA Probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **8** No. 1 p113-130.

Wirth, D. and Pratt, D. (1982) Rapid identification of *Leishmania* species by specific hybridization of kinetoplast DNA in cutaneous lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79** p 6999-7003.

-Zurita, M., Alagón, A., Vargas-Villarreal, J. and Lizardi, P.M. (1991). The *Entamoeba histolytica* rDNA episome: nuclear localization, DNAase I sensitive map, and specific DNA-protein interactions. *Molec. Microbiol.* **5** (8) p1843-1851

Sequence-specific detection of PCR-amplified DNA by restriction enzyme release of hybrids.

Georgina Estrada, Laurence Colin, Paul Gaytan, Alejandro Alagón and Paul M. Lizardi[†].

Department of Molecular Recognition and Structural Biology. Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271, México.

[†] To whom correspondence should be addressed: Apdo. 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271, México.
Fax: (52) (73) 17 23 88. Internet: lizardi@pbr322.ceingebi.unam.mx

Aceptado para su publicación en *Molecular and Cellular Probes*.

The Location, Diagnosis and Monitoring of Disease by Nucleic Acid Techniques.
13 de Diciembre de 1995, Academic Press Ltd.

SUMMARY

We have developed a method to detect PCR amplicons that contain a restriction enzyme site. The method is called Polymerase Chain Reaction-Hybridization and Enzymatic Release Assay (PCR-HERA). The PCR product is hybridized to a synthetic oligonucleotide immobilized on a streptavidin coated plate. Specific cleavage of the resulting hybrid by a restriction endonuclease liberates a fluorescein labeled arm of the immobilized DNA. We demonstrate the use of PCR-HERA to detect species-specific sequences of extra-chromosomal, ribosomal DNA, of *Entamoeba histolytica*. This highly specific assay does not require any washing steps and can be easily automated.

KEYWORDS

PCR, microtiter, fluorescence, *Entamoeba histolytica*, rDNA, repetitive sequences.

INTRODUCTION

Non-isotopic nucleic acid detection techniques have gained widespread acceptance¹. However, most of the published microtiter-based formats for the detection of PCR products are laborious because they require a considerable number of washing steps². We have developed a novel strategy for the detection of PCR products, based on the use of probes that are immobilized on the surface of a microtiter well. The probes contain a sequence complementary to the PCR product, and additionally contain fluorescent groups at the 5' end. When PCR products hybridize with the probe, correctly paired hybrids are cleaved by a restriction enzyme, releasing fluorescein into solution. This assay format involves only two liquid transfer steps, and no washing steps whatever.

This method, called PCR-HERA, can be adapted to the detection of any PCR amplicon that contains a restriction enzyme site. To test the utility, sensitivity and specificity of the PCR-HERA method, we have implemented its use in the detection of the medically important enteric parasite *Entamoeba histolytica*. This parasite causes significant mortality and morbidity in developing countries³. Here we describe a PCR-HERA assay, designed to detect DNA sequences from the ribosomal episome of *E. histolytica* at single-cell sensitivity.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Entamoeba histolytica (strain HM1:IMSS) was grown axenically to logarithmic phase in BI-S-33 medium, as described by Diamond⁴. Trophozoites were harvested after 48-72 hours. After counting in a hemacytometer, the cells were suspended in TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA).

DNA materials

The oligonucleotides used in the PCR, A-PCR and PCR-HERA reactions are as follows: The primers used for amplification of the repetitive sequences of *E. histolytica* trophozoites were; the 23 b primer RER-1: 5'-CAAAACAATTTCAATCTTTCATC-3', position 1273-1295; the 21 b primer RER-D5: 5'-GATTCATAAGAACCCTTTGG-3', position 700-720, 844-864, 988-1004, 1132-1147 (all primer positions are given according to the rDNA episome sequence by Bhattacharya et al.⁵). The primer SRER-D5 with same sequence to RER-D5 contained four phosphorothioate groups at the 5' end, was synthesized by Genosys Inc. Primers designated RER-1 and RER-D5 were synthesized by Operon Technologies, Inc. and purified by precipitation with n-butanol⁶. The 44 b probe oligonucleotide GE-2Fu, contains one internal and one 5'-terminal fluorescein (Fu), as well as a 3'-terminal biotin: 5'-Fu-TCCCTCTCACCTC-Fu-TAATTATGTACTTTGTATTAGTACTTTTT-biotin-3', position 731-758, 875-902, 1146-1119, 1163-1190. The nucleotides that hybridize to the PCR-amplified DNA are underlined. Synthesis was carried out using a fluorescein phosphoramidite (catalog no. 10-1963-95) and CPG-biotin (catalog no. 20-2951-01) Glen Research Co. Sterling, VA. After HPLC purification, this oligonucleotide was stored at -20 °C in the dark. The amplification of DNA sequences used as negative controls was carried out with the following primers: 4RRV gene of *Rotavirus*: the 19 b primer T7: 5'-TAATACGACTACTATAGG-3', position 769-787; the 25 b primer nar 11p: 5'-CATCCGTTAACGGAGGACGTCGTG-3', position 978-1002. *onpS2* gene of *Salmonella typhi* 20 b primer F2a: 5'-GTCCACAGATTTTACCTGCC-3', position 1-20; 36 b primer F2b: 5'-GAGGGACAGTACTTTAACTTTCATTTTATCCCT-3', position 502-537.

The template and primers used for amplification of *Rotavirus* and *Salmonella typhi* DNA were kindly provided by Drs. S. López and E. Calva, respectively (at this institution). Amplification of 18S ribosomal DNA of *P. vivax*: primer UP523: 5'-GAATTTAAAACCTTCCAAAAC-3', position 523-544; primer LP954: 5'-AGAAATTCACCTCTGACATCTG-3', position 954-975. Clone pUCD5 is a recombinant plasmid that contains six ribosomal repetitive sequences of the *Entamoeba histolytica* strain HM1:IMSS, encompassing nucleotides 347 to 1300 in the sequence of the rDNA episome published by Bhattacharya et al.⁵

Conditions for PCR, gene 6 exonuclease digestion, asymmetric PCR

Trophozoites suspended in TE buffer were boiled 5 minutes and centrifuged for 1 minute at 14,000g. An aliquot of 2 µl of the supernatant was added to a 50 µl PCR reaction mixture containing 1X amplification buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mg/ml gelatin, 200 µM each dNTP, 50 pmoles of each primer, and 2.5 U *Taq* polymerase (purified according to Engelke⁷). Amplification was performed in a GeneAmp System 9600 (Perkin-Elmer), by initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 30 or 35 cycles with the following program: 94° for 30 s, 42°C for 30 s, 72°C for 45 s. The final extension reaction proceeded for 7 min at 72°C.

For generation of single-stranded DNA by exonuclease treatment, PCR reactions were carried out using the primer SRER-D5. The PCR product generated using this special primer (SPCR) was incubated with 0.4 Units/µl of the gene 6 exonuclease^{8,9} of phage T7 (USB-Amersham) for 1 hour at 25°C.

Conditions for A-PCR were the same as for standard PCR, except that the final ratio of primers RER-D5 and RER-1 was 50:1 (0.5 µM and 0.01µM). The DNA template consisted of 4 µl of a standard 50 µl PCR reaction. After

an initial denaturation step at 94°C for 5 min, the reaction was subjected to 35 cycles using our standard program. The same A-PCR conditions were used for the controls.

Probe immobilization in microtiter wells

The probe GE-2Fu was dissolved in binding buffer (6X SSC, 100 µg/ml salmon sperm DNA) and 100 µl of this solution was added to each well of a streptavidin-coated plate (Pierce, catalog no. 15120X) at a concentration of 8.3 µM. Binding was carried out for 1 hour at 37°C, with gentle shaking (150 rpm). Each well was rinsed 3 times with 250 µl of washing buffer A (Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄, 0.1M pH 8.0, 0.15M NaCl, 0.05% Tween-20). The wells were washed twice at 37°C for 15 min, with 250 µl washing buffer B [50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 40 µM CTAB (hexadecyl trimethylammonium bromide, Sigma)]. Finally, the microwells were incubated twice at 37°C, for 15 min, with 250 µl prehybridization buffer C [50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 5% PEG 8000 (Sigma, catalog no. P5413)]. Fluorescent probe immobilization was routinely performed the day before the PCR-HERA reaction. The plate was stored wet, at 4°C, after performing the last washing step with buffer C.

Release of the bound fluorescent probes from microtiter plates using 6M guanidino thiocyanate (Fluka catalog no. 50990) pH 8, at 52 °C, demonstrated that each well contained 2x10¹² probe molecules. Fluorescence was measured in a Cyto Fluor³ 2300 system (Millipore) using filters B/B (excitation: 485 nm/20; emission: 530 nm/25), sensitivity 5.

Hybridization, enzyme digestion, and fluorescence detection

A 10 µl aliquot of the A-PCR reaction was mixed with 88 µl of hybridization buffer D (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.1 mg/ml gelatin, 5% PEG 8000). Hybridization was performed for 1 hour at 37 °C. Two microliters containing two units of restriction endonuclease *Rsa* I (Gibco BRL) were added and the mixture was incubated for 90 minutes at 37 °C. After enzyme digestion, the contents of each well was transferred to a 96-well polypropylene plate (Nunc HRP, catalog no. 442587). Fluorescence was measured in the Cyto Fluor³ 2300 system. The relative fluorescence units (RFU) were calculated, by subtracting the value of fluorescence released from an internal control to which no PCR product was added. The plate was protected from light at all steps.

RESULTS

Description of the PCR-HERA format

The format of the PCR-HERA assay is shown diagrammatically in Figure 1. An amplicon that contains a restriction enzyme site is generated by PCR, and the DNA is made single-stranded by treatment with the gene 6 exonuclease of phage T7. Alternatively, single-stranded DNA may be generated by asymmetric PCR (A-PCR). The single-stranded DNA is then introduced in a microtiter plate that contains immobilized probes. The probes contain biotin at the 3' end, and two fluoresceins at the opposite end. After hybridization, a restriction enzyme (*Rsa* I in this case) cleaves the hybrids, liberating fluoresceinated DNA in solution. After enzyme digestion is complete, the liquid is transferred to a second microtiter plate, and fluorescence is measured.

The oligonucleotide GE-2Fu is designed to fulfill the dual role of capture probe and signal generator. The probe sequence is 44 nucleotides long, but only 28 nucleotides constitute the hybridizing domain. This hybridization segment is separated from the biotin by a spacer of 2 thymidines and a seven-carbon linker. Hybridization/capture kinetic experiments showed that at least 35 % of the PCR amplicons hybridize in 60 minutes (in this reaction, the immobilized probe is in excess and drives the kinetics). The efficiency of the *Rsa* I cleavage reaction was measured by digestion of the hybrids with the enzyme for different times. Typically, 15% to 30 % of the hybridized amplicons that were bound to fluorescent probes were cleaved in a 90 minute reaction (data not shown). Although the efficiency of release is relatively low, it is quite reproducible. Signal is not generated in the presence of nonspecific PCR products, since neither hybridization nor enzymatic cleavage occurs.

Amplification of ribosomal DNA repeats by PCR

The ribosomal episome (rDNA) of *Entamoeba histolytica* is known to contain repeated DNA sequences; various families of short tandem repeats have been identified^{5,10,11}. The so called *Sca* I element encompasses 13 repeat units. Six of these repeats are located upstream and seven are downstream of the ribosomal cistrons¹². We designed primers that amplify 4 of the 7 downstream *Sca* I repeat units. Panel A of Figure 2 shows the location of the primers and the immobilized probe. The lower primer, RER-D5, anneals with repeats number 4, 5, 6 and 7. The upper primer RER-1, located at the level of the *Eco* RI site, hybridizes in such a way that its 3' end corresponds exactly to the first nucleotide downstream of the repeats. Each repeat contains two restriction sites for *Rsa* I and one site for *Sca* I. The probe GE-2Fu was designed to encompass the cleavage sites for both endonucleases. Panel B shows an analysis of amplified DNA generated by SPCR, using DNA samples obtained

from different numbers of trophozoites. The sizes of the PCR products are 164, 308, 452 and 596 bp, as expected for 1, 2, 3 or 4 amplified repeats, respectively.

Detection of *E. histolytica* DNA by PCR-HERA

Aliquots of DNA extracted from trophozoites, containing 0.1, 0.5, 1 and 5 cell equivalents (see Methods) were amplified by asymmetric PCR, followed by hybridization and enzymatic release of hybrids (A-PCR-HERA). Control reactions were carried out using irrelevant DNA from *Plasmodium vivax*, *Rotavirus* and *Salmonella typhi*. The results show a strong positive fluorescent signal only with the amplified DNA from amoeba trophozoite extracts. Amplification products generated from heterologous DNA do not give a significant signal. The signal/noise ratio is about 34; for this calculation, we considered the signal of *P. vivax* (31.7 ± 10), and the lowest *Entamoeba* signal (1074 ± 65).

In a second set of experiments, trophozoite DNA was amplified by PCR using a special primer containing four phosphorothioate residues. Single-stranded DNA was generated by treatment of the PCR products with T7 gene 6 endonuclease. Figure 4A shows the results obtained using PCR-HERA with 30 thermal cycles. Figure 4B shows the results obtained using 35 cycles. PCR-HERA with 35 cycles permits the detection of one trophozoite cell-equivalent, while the 30-cycle PCR-HERA shows reduced sensitivity but improved proportionality of signal to DNA input.

DISCUSSION

We have demonstrated the sensitivity and specificity of the PCR-HERA format using a model assay for the detection of *Entamoeba histolytica* trophozoites. The assay detected DNA corresponding to 0.1 trophozoite cell-equivalents using A-PCR, or 1 trophozoite cell-equivalents using PCR followed by exonuclease digestion. No significant signals were generated with PCR-amplified DNA from other pathogens.

The PCR-HERA format enhances the specificity of a PCR assay by incorporating two additional sequence recognition steps. Sequence recognition occurs in the capture step, which involves specific hybridization with a sequence of 25 to 30 nucleotides in the PCR product. A subsequent sequence recognition step occurs upon restriction enzyme cleavage, which requires the presence of a specific DNA palindrome, and may additionally be exploited for allelic discrimination in future PCR-HERA assays. Other published assay formats make use of an immobilized probe to capture the amplicons, and a second probe to produce the specific signal¹¹. The PCR-HERA format uses only one probe, which serves the dual function of capture probe and signal generator. For increased sensitivity, the fluorescent moiety could be substituted for a covalently bound enzyme such as alkaline phosphatase, without any other modification in the PCR-HERA design.

The use of a single-stranded DNA product generated by gene 6 exonuclease, or by A-PCR, permits rapid and efficient capture of amplicons by the immobilized probe, and avoids competition by strand reassociation^{12,13}. The signals obtained by enzymatically generated ssDNA are roughly proportional to the number of DNA targets (Figure 4A), while the signals generated by A-PCR are not (Figure 3). These results underscore a disadvantage of A-PCR, which tends to obliterate any differences in the yield of the first (symmetric) PCR reaction.

Perhaps the most notable feature of PCR-HERA is the ease with which the method can be adapted to automation. PCR products, generated in of a 96 well microtiter format thermal cycler, require only two multipipettor transfers, and no other manipulation, for completion of an assay. The first transfer deposits the amplified material in a microtiter plate, containing the immobilized probe and the restriction enzyme, and the second transfer deposits the supernatant of the enzymatic digestion on a second microtiter plate, used for fluorescence detection. Finally, multi-color fluorescent probes would permit the design of multiplex PCR-HERA assays. Advanced assays could detect as many as six different specific PCR products per microtiter well, using immobilized probes of six different colors.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledged the skilful technical help of A. Olvera and F. Olvera (amoeba culture). We thank Drs. Patricia Brag-Ward, Edmundo Calva, David Ward, and Fernando Valle for critical reading of the manuscript. This work was supported by an International Research Scholar Award from the Howard Hughes Medical Institute (No. 75191-527103, awarded to P.M.L.).

LEGENDS FOR FIGURES.

Fig. 1. Principle of PCR-HERA. The scheme consists of 3 steps: a) production of single-stranded PCR amplicons; b) hybridization on a solid phase of the labeled probe with the amplified DNA, followed by enzymatic cleavage; and c) transfer of the supernatant and measurement of fluorescence.

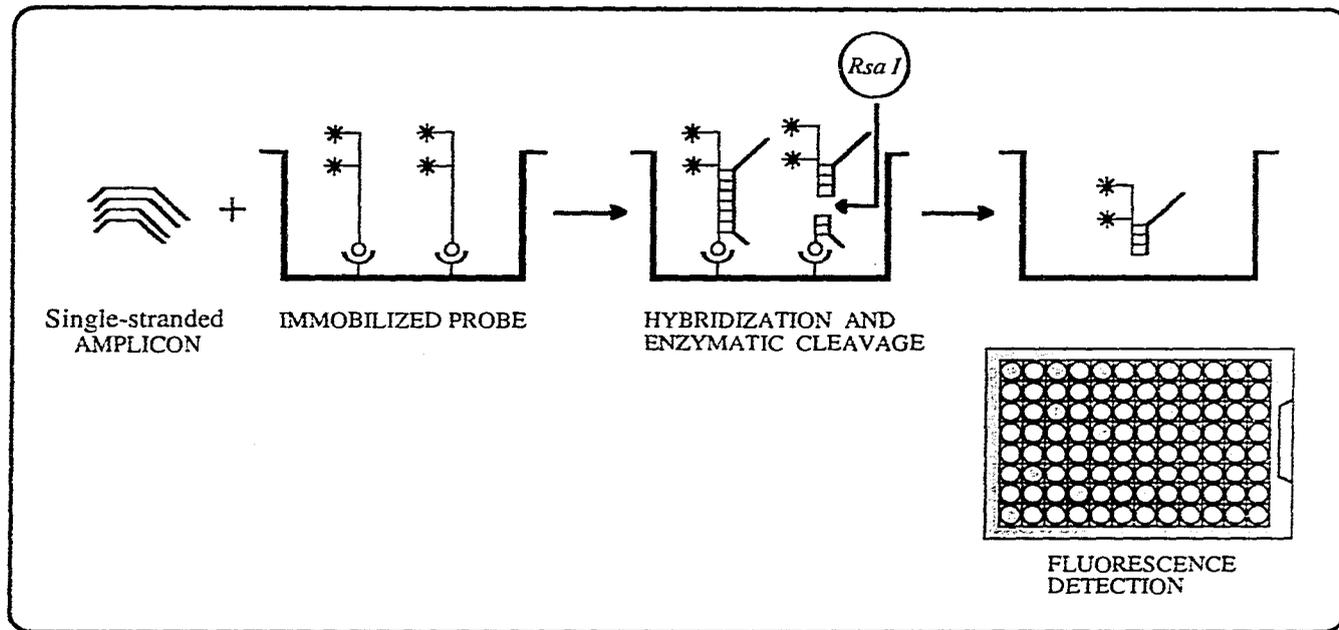
Fig. 2. Amplification of *Sca* I repeat sequences of *Entamoeba histolytica* DNA. A: Arrows a and b correspond to the PCR primers RER-1 and RER-D5 respectively; the size of the PCR products (d1-d4) is indicated at the bottom. The bold horizontal line c corresponds to the sequence complementary to GE-2F_u probe, while the *Rsa* I restriction sites are indicated by two vertical parallel lines. B: PCR-amplified DNA of trophozoite DNA. Aliquots of 8 µl of phosphorothioate-PCR reaction products were separated by electrophoresis in a non-denaturing 8 % polyacrylamide gel and stained with silver nitrate. Lanes, left to right: M: pBR322 *Msp*I digest; Lanes 1, 5, 10, 50 and 100 correspond to increasing inputs of trophozoite DNA; Lane M: DNA ladder of 100 base-pair increments (Gibco-BRL); Lane D5: Aliquot of 4 µl of phosphorothioate-PCR, performed with pUC D5 episomal rDNA clone as template (positive control); Lane N: phosphorothioate-PCR reaction without template. The arrows indicate the bands corresponding to amplified repeat sequences. Numbers on the left indicate the sizes in the plasmid DNA markers.

Fig. 3. PCR-HERA using A-PCR. Bars: 1-3: A-PCR products, respectively from *Plasmodium vivax*, *Rotavirus*, and *Salmonella typhi*. Bars: 4-7: A-PCR products from 0.1, 0.5, 1 and 5 trophozoites of *Entamoeba histolytica*. Amplification of a 234 bp fragment of the 4 RRV gene of *Rotavirus* was carried out with DNA from the plasmid pGEM3ZRV. Amplification of a 537 bp fragment of the *ompS2* gene of *Salmonella typhi* was performed using total bacterial DNA. Amplification of a 453 bp region of the 18S ribosomal DNA of *P. vivax* was carried out with the recombinant plasmid pPCR3000pva which harbors the entire 18S RNA sequence. All values represent the mean of quadruplicate reactions; spread bars indicate the standard deviation.

Fig. 4. PCR-HERA using T7 gene 6 exonuclease for the generation of single-stranded *E. histolytica* DNA. phosphorothioate-PCR products were generated with one standard and one phosphorothioate oligonucleotide, using 30 (A) or 35 thermal cycles (B). Single-stranded DNA was generated by digestion with T7 gene 6 exonuclease. Bars 1, 5, 10, 50, and 100 indicate the input trophozoites in the DNA used for the phosphorothioate-PCR reaction. Bars: *Rv*, and *St*, correspond single-stranded DNA products of *Rotavirus* and *Salmonella typhi*, respectively, generated by A-PCR. The PCR-HERA assay was carried out with 10 µl of phosphorothioate-PCR treated with exonuclease, and 6 µl of A-PCR of heterologous amplified DNA. The RFU represent the average of three determinations.

REFERENCES

1. Mansfield, E. S., Wortley, J. M., McKenzie S. E., Surrey, S., Rappaport, E., & Forthia P. (1995). Nucleic acid detection using non-radioactive labelling methods. *Molecular and Cellular Probes* 9, 145-156.
2. Lazar, J. G. (1994). Advanced methods in PCR product detection. *PCR Methods and Applications* 4, S1-14.
3. Walsh, J. A. (1986). Problems in recognition and diagnosis of amoebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Reviews of Infectious Diseases* 8, 228-38.
4. Diamond, L. S., Hartow, D. R. & Cunnick, C. C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 72, 431-32.
5. Mittal, V., Sehgal, D., Bhattacharya, A. & Bhattacharya, S. (1992). A second short repeat sequence detected downstream of rRNA genes in the *Entamoeba histolytica* rDNA episome. *Molecular and Biochemical Parasitology* 54, 97-100.
6. Sawadogo, M. & Van Dyke, M. W. (1991). A rapid method for the purification of deprotected oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acid Research* 19, 674.
7. Engelke, D. R., Krikos, A., Bruck, M. E. & Ginsburg, D. (1990). Purification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *Analytical Biochemistry* 191, 396-400.
8. Holloway, B., Erdman, D. D., Durigon, E. L., & Murtagh, J. J. Jr. (1993). An exonuclease-amplification coupled capture technique improves detection of PCR product. *Nucleic Acids Research* 21, 3905-06
9. Nikiforov, T.T., Rendle, R.B., Kotewicz, M.L. & Rogers, Y-H. (1994). The use of Phosphorothioate Primers and Exonuclease Hydrolysis for the Preparation of Single-stranded PCR Products and their Detection by Solid-phase Hybridization. *PCR Methods and Applications* 3, 285-291.
10. Mittal, V., Bhattacharya, A. & Bhattacharya, S. (1992). Organization of repeated sequences in the region downstream to rRNA genes in the rDNA episome of *Entamoeba histolytica*. *Archives of Medical Research (Mexico)* 23, 17-18.
11. Garfinkel, L. I., Giladi, M., Huber, M., et al. (1989). DNA probes specific for *Entamoeba histolytica* possessing pathogenic and non-pathogenic zymodemes. *Infection and Immunity* 57, 926-31.
12. Sehgal, D., Mittal, V., Ramachandran, S., Dhar, S. K., Bhattacharya, A. & Bhattacharya, S. (1994). Nucleotide sequence organization and analysis of the nuclear ribosomal DNA circle of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 67, 205-214.
13. Böni, J. & Schüpbach, J. (1993). Sensitive and quantitative detection of PCR-amplified HIV-1 DNA products by an enzyme linked immunosay following solution hybridization with two differently labelled oligonucleotide probes. *Molecular and Cellular Probes* 7, 361-71.



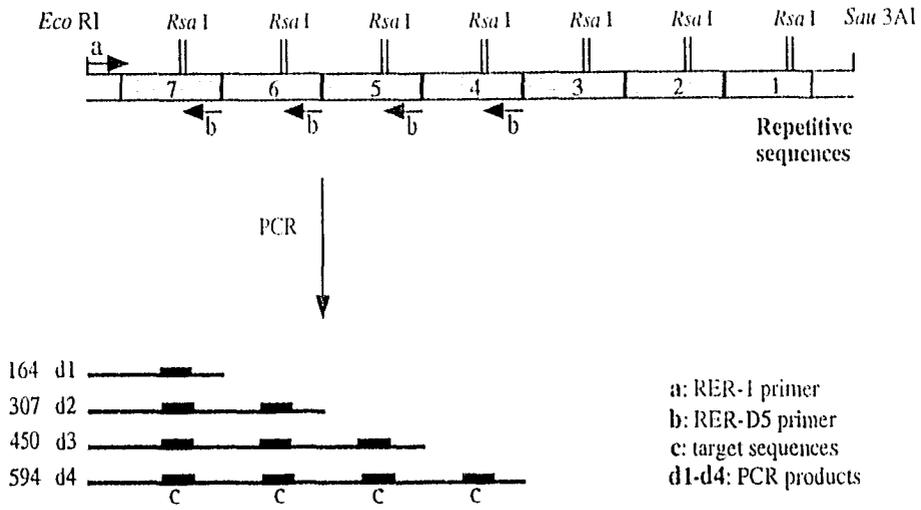
 PCR products

* Fluorescein

○ Biotin

 Streptavidin

A



B

