



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**

Técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para la  
identificación de Amebas sp.

**Trabajo de Titulación para optar al título de Licenciado en  
Laboratorio Clínico**

**Autor:**

Vizuite Parra, Oliver Daniel

**Tutor:**

Mgs. Félix Atair Falconí Ontaneda

Riobamba, Ecuador. 2025

## DECLARATORIA DE AUTORÍA

Yo, Oliver Daniel Vizuite Parra, con cédula de ciudadanía 0605523091, autor del trabajo de investigación titulado: **Técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para la identificación de Amebas sp.**, certifico que la producción, ideas, opiniones, criterios, contenidos y conclusiones expuestas son de mí exclusiva responsabilidad.

Asimismo, cedo a la Universidad Nacional de Chimborazo, en forma no exclusiva, los derechos para su uso, comunicación pública, distribución, divulgación y/o reproducción total o parcial, por medio físico o digital; en esta cesión se entiende que el cesionario no podrá obtener beneficios económicos. La posible reclamación de terceros respecto de los derechos de autor (a) de la obra referida, será de mi entera responsabilidad; librando a la Universidad Nacional de Chimborazo de posibles obligaciones.

En Riobamba, 18 de julio de 2025.



---

Oliver Daniel Vizuite Parra

C.I: 0605523091

## DICTAMEN FAVORABLE DEL PROFESOR TUTOR

Quien suscribe, Félix Atair Falconí Ontaneda catedrático adscrito a la Facultad de Ciencias de la Salud, por medio del presente documento certifico haber asesorado y revisado el desarrollo del trabajo de investigación titulado: **Técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para la identificación de Amebas sp.**, bajo la autoría de Oliver Daniel Vizúete Parra; por lo que se autoriza ejecutar los trámites legales para su sustentación.

Es todo cuanto informar en honor a la verdad; en Riobamba, a los 18 días del mes de julio de 2025.

---

Mgs. Félix Atair Falconí Ontaneda

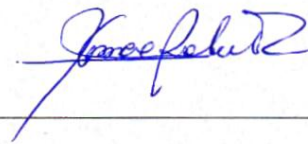
C.I: 0702782020

## **CERTIFICADO DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL**

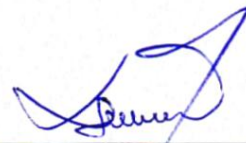
Quienes suscribimos, catedráticos designados Miembros del Tribunal de Grado para la evaluación del trabajo de investigación Técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para la identificación de Amebas sp., presentado por Vizuite Parra Oliver Daniel, con cédula de identidad número 0605523091, bajo la tutoría de Mgs. Félix Atair Falconí Ontaneda; certificamos que recomendamos la APROBACIÓN de este con fines de titulación. Previamente se ha evaluado el trabajo de investigación y escuchada la sustentación por parte de su autor; no teniendo más nada que observar.

De conformidad a la normativa aplicable firmamos, en Riobamba 23 de octubre de 2025.

Mgs. Ximena del Rocío Robalino Flores  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE GRADO**



MsC. Yisela Carolina Ramos Campi  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO**



Mgs. Gisnella María Cedeño Cajas  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO**





# CERTIFICACIÓN

Que, **VIZUETE PARRA OLIVER DANIEL** con CC: **0605523091**, estudiante de la Carrera **LABORATORIO CLÍNICO**, Facultad de **CIENCIAS DE LA SALUD**; ha trabajado bajo mi tutoría el trabajo de investigación titulado "**TÉCNICA DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE AMEBAS SP**", cumple con el 5 %, de acuerdo al reporte del sistema Anti plagio **COMPILATIO**, porcentaje aceptado de acuerdo a la reglamentación institucional, por consiguiente autorizo continuar con el proceso.

Riobamba, 25 de septiembre de 2025



Mgs. Félix Atair Falconí Ontaneda  
**TUTOR**

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mi familia, en especial a mis padres, por su apoyo constante, incluso cuando los aquellos peores días.

A quienes me enseñaron a cuestionar, a observar con atención y no conformarme con respuestas fáciles.

A las personas que creyeron en mi capacidad incluso cuando yo no estaba seguro

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Nacional de Chimborazo, por ofrecerme el espacio y las herramientas para crecer académica y personalmente.

A mis docentes, por enseñarme conocimiento teórico, experiencias de vida y que me impulsaron con una palabra de apoyo y una crítica justa.

A mis amigos, por estar, incluso en la distancia, cuando el cansancio se volvió rutina.

Y también, por qué no decirlo, a mis mascotas, que con su indiferencia elegante y sus siestas interminables me recordaron que la vida no siempre tiene que ir a toda velocidad.

## ÍNDICE GENERAL

|                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------|----|
| RESUMEN .....                                               | 11 |
| CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....                               | 13 |
| CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....                             | 17 |
| Clasificación de las amebas.....                            | 17 |
| Amebas intestinales.....                                    | 17 |
| Amebas de vida libre .....                                  | 21 |
| Naegleria sp. ....                                          | 21 |
| Balamuthia sp. ....                                         | 24 |
| Acanthamoeba sp.....                                        | 26 |
| Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....             | 27 |
| Fases de la PCR .....                                       | 28 |
| Componentes de la PCR.....                                  | 29 |
| Tipos de PCR.....                                           | 31 |
| Análisis de productos.....                                  | 33 |
| Aplicaciones de la PCR .....                                | 33 |
| Aplicación de la PCR para la identificación de amebas ..... | 34 |
| CAPÍTULO III. METODOLOGÍA.....                              | 36 |
| CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....                   | 40 |
| CAPITULO V. CONCLUSIONES .....                              | 60 |
| BIBLIOGRAFÍA .....                                          | 62 |
| ANEXOS .....                                                | 72 |

## ÍNDICE DE TABLAS.

|                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 1.</b> Análisis del uso de reactivos en la preparación del Máster mix reportados en la literatura..... | 41 |
| <b>Tabla 2.</b> Condiciones del termociclador para la amplificación de diferentes especies de amebas .....      | 48 |
| <b>Tabla 3.</b> Resultados obtenidos en la amplificación por PCR en la literatura .....                         | 53 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Anexo 1</b> Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i> . ....                                     | 72 |
| <b>Anexo 2.</b> Ciclo de vida de <i>N. fowleri</i> . ....                                        | 73 |
| <b>Anexo 3.</b> Ciclo de vida de <i>Acanthamoeba</i> sp. ....                                    | 74 |
| <b>Anexo 4.</b> Ciclo de vida de <i>B. mandrillaris</i> .....                                    | 74 |
| <b>Anexo 5.</b> Ciclos de la PCR. ....                                                           | 75 |
| <b>Anexo 6.</b> Primers utilizados para la identificación de amebas de importancia clínica. .... | 76 |

## RESUMEN

La detección de amebas patógenas mediante la reacción en cadena de la polimerasa se ha consolidado como una herramienta fundamental para el diagnóstico clínico y la vigilancia epidemiológica, el objetivo general de esta revisión bibliográfica fue analizar los aspectos técnicos y metodológicos de esta técnica de identificación molecular, con el fin de evaluar su eficacia diagnóstica y su relevancia en el contexto clínico. Este estudio de tipo descriptivo, con enfoque cualitativo y corte transversal, se realizó una revisión sistemática de 30 artículos científicos, centrándose en el análisis crítico de los parámetros fundamentales, la investigación se estructuró en tres componentes metodológicos clave: la composición del Máster Mix, las condiciones del termociclador y la evaluación de los resultados obtenidos mediante electroforesis en gel de agarosa. Los hallazgos revelaron una variabilidad significativa en los protocolos, particularmente en las concentraciones de reactivos, parámetros de temperatura y ciclos, aunque mantuvieron los principios básicos de una reacción en cadena de la polimerasa convencional, la electroforesis demostró patrones consistentes de bandas específicas bajo protocolos estandarizados, corroborando los altos niveles de sensibilidad y especificidad. Se concluyó que el éxito de la detección molecular de amebas patógenas depende de la correcta selección y combinación de estos componentes metodológicos, proporcionando una guía de referencia valiosa para laboratorios clínicos y estudios epidemiológicos, los resultados enfatizan la necesidad de una documentación precisa de estos parámetros para garantizar la reproducibilidad de los resultados y se deben considerar las particularidades técnicas de cada especie amebiana y la etapa del proceso de amplificación.

**Palabras claves:** PCR, amebas patógenas, amebas intestinales, amebas de vida libre, diagnóstico molecular, Máster mix, condiciones de amplificación.

## ABSTRACT

The detection of pathogenic amoebae using the polymerase chain reaction has become a fundamental tool for clinical diagnosis and epidemiological surveillance. The main objective of this literature review was to analyze the technical and methodological aspects of this molecular identification technique to evaluate its diagnostic efficacy and clinical relevance. This descriptive, qualitative, and cross-sectional study conducted a systematic review of 30 scientific articles, focusing on a critical analysis of fundamental parameters. The research was structured around three key methodological components: the composition of the Master Mix, the thermocycler conditions, and the evaluation of agarose gel electrophoresis results. The findings revealed significant variability in the protocols analyzed, particularly in reagent concentrations, temperature parameters, and cycling conditions across different species, although all maintained the basic principles of a conventional polymerase chain reaction. Electrophoresis demonstrated consistent patterns of specific bands under standardized protocols, corroborating the reported high levels of sensitivity and specificity. It was concluded that the success of molecular detection of pathogenic amoebae depends on the correct selection and combination of these methodological components, providing a valuable reference guide for clinical laboratories and epidemiological studies. The results emphasize the need for accurate documentation of these parameters to ensure reproducibility and highlight that the technical specifics of each amoeba species and the amplification stage must be considered.

**Keywords:** PCR, pathogenic amoebae, intestinal amoebae, free-living amoebae, molecular diagnostics, master mix, amplification conditions.



Assinado eletronicamente por:  
SOFIA FERNANDA  
FREIRE CARRILLO

Validez Unicamente com FlamaEC

Reviewed by:

Mgs. Sofia Freire Carrillo

**ENGLISH PROFESSOR**

C.C. 0604257881

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.

Las enfermedades producidas por amebas representan un problema de salud pública debido a su amplio espectro clínico, afectando a miles de personas cada año, como lo es el caso de la amebiasis puede presentarse disentería y en casos más graves, colitis y abscesos hepáticos. Otras enfermedades son producidas por amebas de vida libre (AVL), que son menos frecuentes, pero con un alto índice de mortalidad, como es el caso de meningoencefalitis amebiana primaria (MAP) y la encefalitis amebiana granulomatosa (EGA). Su importancia radica en desafíos diagnósticos, opciones terapéuticas limitadas y su distribución mundial, que las convierte en una amenaza latente para la población general<sup>1</sup>.

La principal ameba patógena en el ser humano es *Entamoeba histolytica*, causante de la amebiasis, que puede invadir la mucosa intestinal causando ulceraciones y llegar a otros órganos por la irrigación sanguínea, causando lesiones extraintestinales, como el absceso hepático. Otras amebas pertenecientes a los géneros *Entamoeba*, *Iodamoeba* y *Endolimax* son descritas como amebas comensales, no causan enfermedad y su identificación se relaciona con la ingestión de agua y alimentos contaminados con heces fecales<sup>2</sup>.

Por otro lado, las AVL llevan su ciclo biológico en el medio ambiente, sin embargo, infectan al ser humano de manera accidental y oportunista, entre las más comunes se encuentran: *Naegleria fowleri*, responsable de la meningitis amebiana primaria; *Balamuthia sp.*, responsable de infecciones en la piel y lesiones cerebrales; y *Acanthamoeba sp.*, causante de queratitis amebiana e infecciones cutáneas<sup>2</sup>.

Según la OMS, a nivel mundial 500 millones de personas son diagnosticadas con infección producida por amebas, de las cuales, el 10% se encuentran afectados por *E. histolytica* y el 90% por amebas comensales<sup>3</sup>. Los países más afectados se encuentran en África, América del Sur, Centroamérica y Asia, sobre todo en regiones húmedas y cálidas, zonas con acceso al agua potable limitado, poco saneamiento ambiental y un sistema de salud deficiente<sup>1</sup>.

La amebiasis es causante de 100,000 muertes y pérdida de 2.2 millones de años de vida ajustados por discapacidad (AVAD)<sup>3</sup>. En África, existen altos porcentajes de prevalencia de

amebiasis, en Sur África la prevalencia es del 12,4%, 58,3% en Kenia durante el 2012, 54,5% en Ruanda durante el 2020 y del 19,93% en Uganda en el 2012<sup>3</sup>. Otros datos señalan que la amebiasis extraintestinal más común fue el absceso hepático, con 183 pacientes afectados de 187 en un estudio realizado en Camerún<sup>3</sup>.

Por otro lado, en América se determinó, mediante un estudio sistemático de 227 artículos, que la prevalencia del complejo *Entamoeba* era mayor en México, Colombia, Venezuela, Ecuador, Bolivia y Brasil<sup>4</sup>. La prevalencia de *E. histolytica* en un rango de 0,08% a 82,6%, fue más frecuente en Venezuela, Colombia y México, además, *E. dispar* fue más prevalente, en un rango de 0.44% a 88%, en Ecuador y México<sup>4</sup>.

En población rural indígena de la provincia de Cañar en Ecuador, los autores Aguaiza et al. en el año 2022, evidenciaron la prevalencia de parásitos patógenos, con la presencia de *E. histolytica* en un 65%, seguida de *Giardia duodenalis* 32% e *Hymenolepis nana* en 2%<sup>5</sup>.

En la provincia de Chimborazo un estudio realizado en el 2023 a 264 niños de comunidades rurales mostró que 117 (44,32 %) correspondían a parasitosis intestinal. Identificando a: Quiste de *E. coli* (58,86 %), Quistes de *E. histolytica* (17,72 %), Quistes de *Giardia lamblia* (10,13 %), Quistes de *Chilomaxtix mesnili*, Huevos de *Hymenolepis nana* y Quistes de *Iodamoeba bütschlii* (3,16 %), Huevos de *Trichuris trichiura* (1,90 %)<sup>6</sup>.

Las amebas de vida libre se encuentran distribuidas por todo el mundo, aisladas de charcas, lagunas, piscinas, aguas de desecho, etc., *Acanthamoeba* puede sobrevivir en condiciones de pH y temperatura extrema, como salares y en la Antártida<sup>2</sup>. Se clasifican como infecciones raras, con un reporte inferior a 200 casos por año, la mayoría de los casos reportados son por *N. fowleri*, con alrededor de 440 casos de meningoencefalitis a nivel mundial, en países como Estado Unidos, Australia, Pakistán, India, México, Perú, Venezuela, Argentina y Chile<sup>7</sup>.

Aquellos casos de meningoencefalitis amebiana reportados en América Latina fueron todos mortales, en Ecuador no existe evidencia de reportes de casos aislados de estas infecciones parasitarias o cifras oficiales que se relacionen con la infección por amebas de vida libre, aunque, esto puede deberse a las limitaciones diagnósticas que existen para este grupo de protozoos.

El trabajo de investigación se sustenta en promover y asegurar el cumplimiento del derecho a la salud, tal como se muestra en la Constitución de la República del Ecuador, en su artículo 32, dictamina que “la salud es un derecho que garantiza el Estado, cuya realización se vincula al ejercicio de otros derechos, entre ellos el derecho al agua, la alimentación, la educación, la cultura física, el trabajo, la seguridad social, los ambientes sanos y otros que sustentan el buen vivir”<sup>8</sup>, por ello, la investigación aporta conocimiento teórico para el cumplimiento del derecho a la salud al garantizar un diagnóstico rápido y específico.

Un aspecto importante dentro del manejo clínico de estas infecciones es el diagnóstico molecular, que se ha desarrollado con tecnologías como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando la desnaturalización e hibridación de ácidos nucleicos, permitiendo la identificación genotípica entre las diferentes especies de amebas con solo una cadena diana amplificada<sup>9</sup>. La investigación realizada se basó en describir y analizar la técnica de la PCR en la identificación de amebas que afectan a los seres humanos, centrándose en las técnicas de preparación de reactivos, programación del termociclador y la interpretación de los resultados.

Es importante destacar la importancia de la PCR como herramienta esencial en el diagnóstico de infecciones por amebas, según la Ley Orgánica de Salud (LOS), en los Artículos 180 y 181, los servicios de salud deben ser regulados y autorizados, asegurando el cumplimiento de normas de calidad con estándares internacionales<sup>10</sup>. Sustentado una parte esencial para la aplicación de técnicas como la PCR de forma regulada y estandarizada.

A pesar de sus ventajas, el uso de PCR en la identificación de amebas enfrenta desafíos técnicos, como la contaminación cruzada, falta de protocolos estandarizados y de desarrollo de primers específicos, ya que la presencia de secuencias similares en otros organismos puede llevar a resultados falsos positivos, por ello nos formulamos la siguiente interrogante:

¿Cuáles son las principales variaciones en los parámetros técnicos de la PCR utilizados en la detección de especies de amebas de importancia clínica, según la literatura científica?

La investigación es importante debido a que la detección temprana mediante PCR puede mejorar el pronóstico, y la estandarización de protocolos específicos permite un diagnóstico

más preciso, reduciendo errores y aumentando la confiabilidad de los resultados. Contribuirá al campo de la biología molecular aplicada a la microbiología clínica, analizando los aspectos técnicos de la PCR para identificar amebas, beneficiando al personal de laboratorio a elegir técnicas que ofrezcan mejores resultados, apoyando al desarrollo de métodos más sensibles y específicos, de esta forma, contribuye a que los pacientes obtengan un diagnóstico rápido y preciso, acelerando la toma de decisiones de tratamiento.

Esta revisión bibliográfica tuvo como objetivo investigar los aspectos técnicos y metodológicos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) aplicados a la identificación de amebas patógenas, con énfasis en la sensibilidad, especificidad y su relevancia en el diagnóstico clínico. Para lograr este objetivo se recopiló información basando la búsqueda en los siguientes objetivos específicos:

Comparar datos del uso de reactivos de PCR para la identificación de los diferentes tipos de amebas mediante la revisión de la literatura.

Realizar un análisis de los parámetros de amplificación del termociclador, mediante el análisis de la bibliografía, para distinguir los protocolos que muestran mejores resultados.

Destacar los resultados obtenidos que evidencian mayor sensibilidad y especificidad en el reporte, a través de la comparación con los hallazgos descritos en diversas fuentes.

Esta investigación presentó capítulos fundamentales estructurados en: el Capítulo I con la introducción que plantea el problema de investigación, objetivos y justificación; Capítulo II, marco teórico que fundamenta conceptualmente la investigación; Capítulo III, marco metodológico detalló el tipo, diseño, nivel y alcance, así como materiales y los procedimientos de análisis; Capítulo IV, resultados y discusión presentan e interpretan los hallazgos. Finalmente, el Capítulo V con conclusiones sintetiza las contribuciones principales y responde a los objetivos planteados.

## CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.

Las amebas son protozoos unicelulares encontradas en el intestino de los seres humanos y animales, también en fuentes hídricas y el suelo, donde existen como formas de vida libre. Las amebas en los seres humanos pueden causar enfermedades gastrointestinales, abscesos hepáticos, afecciones al sistema nervioso central (SNC), piel y córnea<sup>1</sup>.

La identificación de amebas mediante el laboratorio principalmente se realiza la observación directa, ya que son técnicas sencillas, rápidas y de fácil acceso. Sin embargo, estas muestran poca sensibilidad y es imposible determinar la especie patógena, por ello es importante implementar el diagnóstico molecular, ya que, se identifica el material genético del agente causal, incluso en muestras con concentraciones bajas del parásito.

### Clasificación de las amebas

La clasificación tradicional las amebas pertenecen al grupo Sarcodina, en la actualidad, aunque aún existe controversia, basados en la morfología, vías bioquímicas y filogenética molecular, han clasificado a las amebas en los seis "Super Grupos": Amoebozoa; Opisthokonta; Rhizaria; Archaeplastida; Chromalveolata y Excavata<sup>11</sup>.

El grupo Amoebozoa es el único compuesto exclusivamente de amebas, incluyen las amebas intestinales de importancia clínica del género *Entamoeba*, y a las especies *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba coli*, etc. También se incluyen las amebas de vida libre de los géneros *Acanthamoeba* y *Balamuthia*<sup>11</sup>. Por otro lado, *Naegleria fowleri* pertenece al super grupo Excavata, familia Vahlkampfiidae, pertenece al grupo de amebas que pueden cambiar su morfología entre formas flageladas a formas ameboides<sup>11</sup>.

### Amebas intestinales

Las especies *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii* y *E. bangladeshi* forman parte de un complejo, son morfológicamente similares, sin embargo, la única especie patógena para el

ser humano es *E. histolytica*<sup>1</sup>. Existen otras especies comensales, como *E. coli* y *E. nana*, todas presentan dos estadios morfológicos, quistes y trofozoítos.

Los quistes de *E. histolytica* miden de 10 a 20  $\mu\text{m}$  con cuatro núcleos con endosoma fino y central. *E. coli* presenta mayor tamaño 10 a 30  $\mu\text{m}$  de diámetro, con doble pared refráctil, no presenta vacuolas, presenta ocho núcleos en promedio, una masa de glucógeno y barras cromatoidales en forma de astilla. *E. nana* es más pequeña, mide de 6 a 12  $\mu\text{m}$  de diámetro<sup>1,2</sup>.

Los trofozoítos de *E. histolytica* se distinguen en dos capas, el ectoplasma hialino y el endoplasma que contiene los organelos, el movimiento se da por la proyección del citoplasma en forma de pseudópodos, mide de 20 a 40  $\mu\text{m}$  de diámetro<sup>1,2</sup>. *E. coli* mide entre 15 y 50  $\mu\text{m}$ , con un citoplasma viscoso y vacuolado, núcleo, endosoma irregular y excéntrico. *E. nana* mide de 6 a 15  $\mu\text{m}$  de diámetro, se considera como una ameba enana debido a su tamaño<sup>1,2</sup>.

Tanto las especies patógenas como no patógenas comparten el mismo ciclo de vida, que inicia con los quistes que se encuentran en el ambiente, siendo capaces de contaminar las fuentes de agua y alimentos que se ingieren por el ser humano. Los quistes se dirigen al estómago, donde se ponen en contacto con el ácido digestivo e inicia el proceso de desenquistamiento, dando como resultado a cuatro trofozoítos en el intestino delgado, que migran hacia el intestino grueso, en el caso de *E. histolytica*, se encarga de colonizar el epitelio intestinal<sup>1,12,13</sup>.

La formación de quistes ocurre después de una disminución del metabolismo celular y la reducción del consumo de nutrientes en un medioambiente desfavorable para la reproducción, los trofozoítos retraen los pseudópodos y se agregan en cúmulos intracelulares. Cuando el quiste madura la célula se reduce en un 80% por la deshidratación, la pared celular aumenta de grosor por la acumulación de glucógeno y microfibrillas<sup>1,12,14</sup> (ver **Anexo 1**).

La capacidad de *E. histolytica* para producir enfermedad se debe en gran parte por su estructura genómica, formada por 20,800,560 de pares de bases de ADN, con un contenido de aproximadamente 75% de A-T y 8333 genes. Dentro del genoma existen alrededor de 68

genes, que muestran la transmisión horizontal de material genético bacteriano, suponiendo una adaptación al ambiente de la microbiota intestinal y sus mecanismos de patogenicidad<sup>15</sup>.

La estructura genética de *E. histolytica* no está completamente definida, no se ha demostrado si es haploide o diploide. Aunque se reproduce asexualmente, su genoma experimenta comunes reordenamientos que originan cepas diversas con adaptaciones y virulencia variables, esta diversidad fenotípica se refleja en una complejidad genotípica, que incluye diferencias en el tamaño cromosómico y la presencia de ADN lineal y circular<sup>15</sup>.

Entre los genes más estudiados tenemos al gen rico en serina (SREHP), que codifica a una de las proteínas con mayor inmunogenicidad de *E. histolytica*, es extracelular con un antígeno de superficie expuesto al sistema inmunológico del hospedador, activando la vía de señalización, modificación de proteínas, actúa como quimioatrayente para trofozoítos, participa en la fagocitosis y evasión de la respuesta inmune<sup>15</sup>.

### **Mecanismos de virulencia**

La mayoría de las infecciones por *E. histolytica* son asintomáticas, aquellos que muestran síntomas pueden llegar a desarrollar disentería y en casos más raros abscesos hepáticos. Se produce un cambio en la microbiota normal del ser humano, junto a la respuesta del hospedador y las moléculas de virulencia conllevan al apareamiento de enfermedad<sup>13,14</sup>.

Los cambios fisiológicos que produce este parásito incluyen la colonización de la mucosa del intestino, adherencia de los trofozoítos al epitelio intestinal, interacción con las uniones estrechas del epitelio, citólisis, fagocitosis y activación de la respuesta inmune<sup>14</sup>.

### **Características clínicas**

La amebiasis se define como la infección asintomática o sintomática por *E. histolytica*, los síntomas más comunes son diarrea después de días o 4 a 5 semanas de la infección, también produce cólicos por irritación del intestino, por ello también es común la presencia de disentería o heces sanguinolentas<sup>12,16</sup>.

En casos más raros, los trofozoítos migran por circulación sanguínea a diferentes órganos, produciendo abscesos hepáticos, pericarditis purulenta, abscesos pulmonares, neumonía, peritonitis, lesiones en la piel y abscesos cerebrales<sup>12,16</sup>. El absceso hepático puede afectar a individuos de todas las edades, los síntomas más comunes son fiebre, escalofríos, anorexia, dolor abdominal, hepatomegalia, náuseas y diarrea en menor proporción<sup>12</sup>.

## **Diagnóstico**

La identificación microscópica del parásito es la prueba estándar para su diagnóstico, la identificación diferencial de *E. histolytica* se realiza mediante tinciones especiales, análisis molecular o inmunológico, sin embargo, estos métodos pueden no ser asequibles en zonas endémicas o rurales<sup>1,16</sup>.

La endoscopia se utiliza para identificar los cambios que produce en el intestino una invasión por *E. histolytica*. En el caso de los abscesos hepáticos, los estudios de imagen van a permitir visualizar la afectación a este órgano, relacionados con los exámenes de laboratorio que muestran una leucocitosis con neutrofilia y aumento de enzimas hepáticas<sup>16</sup>.

El diagnóstico inmunológico incluye técnicas como pruebas inmunoenzimáticas que detectan anticuerpos anti-amebianos en el suero y antígenos amebianos en las heces. El diagnóstico molecular identifica las secuencias moleculares asociadas a la ameba causante de la infección, utilizando muestras como heces, biopsias de tejidos y secreciones<sup>16</sup>.

## **Epidemiología**

Las infecciones en el ser humano se dan por transmisión fecal oral, por el inadecuado control de hábitos higiénicos, bajos índices de educación y la alta contaminación del agua y alimentos con heces fecales, siendo más comunes en zonas con menores recursos económicos y presentan gran incidencia en zonas rurales<sup>1</sup>. La OMS estima que existen 500 millones de personas infectadas con el parásito y el 10 % presenta amebiasis invasiva<sup>16</sup>.

En Latinoamérica, existe prevalencia del 30 a 53% de parásitos, en Ecuador, la parasitosis tiene una incidencia del 56,5% y se considera a *E. histolytica* el parásito con más incidencia, asociado también a factores socioeconómicos de las poblaciones más afectadas<sup>17</sup>.

Un estudio realizado por Escobar, et al., en la parroquia San Luis en Chimborazo demostró que en una población pediátrica el 60% presentaban infección por un solo parásito y 40% presentaban una infección mixta, la mayor prevalencia de parásitos fueron quistes de *E. coli* con 38.36%, 22.30% de múltiples parásitos, 17,72% de quistes de *E. histolytica* 5.08% quistes de *Giardia lamblia*, 3.93% de quistes de *Chilomastix mesnili*, 2.79% quistes de *Iodamoeba butschlii* y un 8.52% sin parásitos, demostrando la alta prevalencia del complejo *Entamoeba* en las zonas rurales de nuestra provincia<sup>6</sup>.

### **Amebas de vida libre**

#### ***Naegleria sp.***

Tiene tres estadios morfológicos, trofozoíto, forma flagelada y quiste. El trofozoíto mide de 15 a 25  $\mu\text{m}$  y se mueve por la emisión de pseudópodos llamados lobópodos, su citoplasma es granular, su núcleo es central con cromatina en gránulos finos y nucleolo esférico<sup>1,2</sup>. La forma flagelada es piriforme y presenta de dos a diez flagelos, no se alimenta y puede regresar a formar un trofozoíto.

Los quistes miden de 8 a 15  $\mu\text{m}$  de diámetro, poseen una doble pared con poros, un componente interno grueso y un externo delgado<sup>1,2</sup>. Se forma cuando las condiciones ambientales, como temperatura, pH y deshidratación afectan al parásito, pudiendo durar hasta 20 años en este estado<sup>18</sup>.

Su ciclo de vida se desarrolla en el medioambiente, en fuentes de agua como lagunas, no necesita la presencia de hospedadores para completar su ciclo de vida, siendo la infección a seres humanos de forma accidental. Una vez en contacto, *Naegleria sp.* entra por vía nasal, los trofozoítos se mueven a través del nervio olfatorio hacia la placa cribiforme, causa necrosis del tejido y la ingestión del tejido cerebral<sup>19</sup> (ver **Anexo 2**).

La estructura genómica de *Naegleria sp.* es amplia debido a su gran diversidad, el análisis molecular se basa comúnmente en la subunidad pequeña ribosomal, con genes como 5.8S y 18S ARNr y espaciadores transcritos internos (ITS). El genoma de *N. fowleri*, analizado por

usando secuenciación en plataformas HiSeq Illumina y PacBio, con un resultado de un total de 37 cromosomas y una longitud de 27,9 Mb (27,994,426 bp), incluyendo genoma nuclear, genoma mitocondrial circular y plásmido extra cromosómico codificador de ARN ribosómicos<sup>20</sup>.

Por otra parte, un estudio realizado por Aurongzeb, et al. de *N. fowleri* AY27 aislado de líquido cefalorraquídeo de un paciente con PAM, mostró que tenía perfil de ADNmt (genoma mitocondrial) compuesto por 49,541 bp, un contenido de AT del 74,7% y GC del 25,3%, con 69 genes (46 codificantes de proteínas, 2 ARNr y 1 ARNt), también, proteínas ribosomales, 17 en total, 6 para la subunidad grande y 11 para la subunidad pequeña<sup>21</sup>.

### **Mecanismos de virulencia**

*Naegleria* tiene la habilidad de entrar en el ser humano vía nasal, los trofozoítos se mueven través del nervio olfatorio hacia la placa cribiforme, inicia la respuesta quimiotáctica por parte del SNC, la ameba causa necrosis del tejido y la ingestión del tejido cerebral por acción de moléculas citolíticas y la respuesta inmune del hospedador, causando inflamación<sup>19</sup>.

La adherencia se da por adhesinas en la superficie de *N. fowleri* e induce a la citotoxicidad con la acción de integrinas. Las enzimas citopáticas son cruciales en el desarrollo de meningoencefalitis amebiana, en estados iniciales contribuyen a la progresión del parásito y a la evasión de la respuesta inmune, y las fosfolipasas contribuyen a la desmielinización de la materia blanca del cerebro<sup>19</sup>.

### **Características clínicas**

Los síntomas de la meningoencefalitis amebiana primaria (MAP) se presentan como hemorragia aguda fulminante, generalmente de 5 a 7 días, en algunos casos hasta 24 horas, de la infección inicial. Otros síntomas incluyen dolores de cabeza frontales o bitemporales, rigidez de la nuca, escalofríos, fiebre, náuseas, vomito, debilidad, fatiga y alteración del comportamiento, como irritabilidad<sup>19</sup>.

A medida que progresa la enfermedad aparece fotofobia, anormalidades neurológicas como letargia, confusión, coma y comportamiento extraño. Finalmente, el paciente muere después de una semana de evolución<sup>19</sup>.

## **Diagnóstico**

El diagnóstico de AVL que causan afección al sistema nervioso se ha realizado mediante microscopía en búsqueda el agente causal, sin embargo, es una técnica con una baja sensibilidad y especificidad<sup>22</sup>. El análisis de LCR suele mostrar un aspecto turbio, con pleocitosis de predominio neutrofílico, glucosa baja y proteínas elevadas y la presencia de trofozoítos móviles en fresco. El cultivo puede realizarse en medios no nutritivos con una capa de bacterias, pero no es útil para el diagnóstico rápido.

Además, el diagnóstico puede confirmarse mediante tinciones como Wright o Giemsa, sin embargo, en la actualidad, las técnicas moleculares son consideradas Gold estándar para la identificación de AVL. Otras técnicas utilizadas son la inmunohistoquímica y la inmunofluorescencia indirecta<sup>23</sup>.

## **Epidemiología**

En la naturaleza existe una gran dispersión de este parásito en fuentes de agua dulce como piscinas, lagos o reservorios, siendo la mayoría de los casos reportados en Estados Unidos, con un 41%, Pakistán 11% y México 9%, afectado comúnmente a personas jóvenes entre 14 a 29 años<sup>1</sup>.

A nivel mundial se han reportado 440 casos a nivel mundial comuna tasa de mortalidad del 95 al 99%, en Sur América se han reportado 7 casos en Perú, 5 casos en Venezuela y alrededor de 26 casos en Centro América, todos fatales, sin embargo, es una enfermedad subestimada, ya que, no existe una tipificación molecular y en casos de muerte por meningoencefalitis no se realizan estudios post mortem para dilucidar el agente causal<sup>7</sup>.

### ***Balamuthia sp.***

El trofozoíto mide entre 12 a 60  $\mu\text{m}$ , llegando hasta 120  $\mu\text{m}$  en ocasiones, es irregular y emite pseudópodos sin ramificaciones, presenta un solo núcleo vesicular, mitocondria y retículo endoplasmático, se reproduce por fisión binaria<sup>1,2</sup>. El quiste mide entre 13 a 30  $\mu\text{m}$  con una fina capa externa o ectoquiste, una capa interna o endoquiste y una capa fibrilar o mesoquiste<sup>1</sup>.

Al igual que *Naegleria sp.*, no necesita de un hospedador para cumplir con su ciclo reproductivo, su infección es accidental, afecta a personas de todas las edades y personas sanas<sup>22</sup>, ingresa por vía nasal o se introduce en la mucosa de los ojos (ver **Anexo 3**), produce encefalitis granulomatosa amebiana (EGA) y es altamente fatal, con menos del 10% de los casos reportados como sobrevivientes.

La estructura molecular se constituye de un genoma de 44,3 Mb, sin embargo, existen reportes de 67,6 Mb, un estudio realizado por Yui et al. en el tejido cerebral de un paciente con EGA, se realizó la secuenciación del ADN identificado para *B. mandrillaris*, obteniendo un genoma de 7.66 Gb (Nanopore) y 23 Gb (Illumina NovaSeq). El genoma mitocondrial circular ensamblado midió 42,630 pb (35.34% GC), con 33 genes proteicos, 2 ARNr y 13 ARNt en la cadena positiva, agrupados en proteínas ribosomales, NADH deshidrogenasa, ATP sintasa, citocromo c oxidasa y citocromo b<sup>24</sup>.

### **Mecanismos de virulencia**

Los mecanismos de virulencia de *Balamuthia sp.* son menos entendidos debido la poca ocurrencia de casos, usa mecanismos similares a *Naegleria sp.* para unirse a las células endoteliales y cruzar la barrera hematoencefálica, otras enzimas facilitan la invasión tisular, promueven la necrosis y la apoptosis celular<sup>1</sup>.

## **Características clínicas**

*Balamuthia* comúnmente causa úlceras en la piel<sup>19</sup>. Los síntomas inician con cefalea, irritabilidad, náusea, mareos, confusión, afasia, letargia, alucinaciones, signos neurológicos, parálisis de los nervios craneales, ataxia, hemiparesia, rigidez del cuello y cambios de personalidad, la progresión de la enfermedad ocurre de 1 a 2 meses de la infección<sup>19</sup>.

## **Diagnóstico**

El diagnóstico se basa en una combinación de hallazgos clínicos y estudios de imagen, aunque estos hallazgos no son específicos. En el laboratorio, el análisis de LCR puede revelar pleocitosis con predominio de linfocitos, aumento de proteínas y glucosa normal o ligeramente disminuida, no se suele encontrar el parásito en el fluido<sup>25</sup>.

El método más confiable para el diagnóstico definitivo es la biopsia de tejido cerebral o cutáneo, técnicas en inmunohistoquímica, inmunología y PCR, esta última ha demostrado ser altamente sensible y específica para la detección de ADN de *Balamuthia sp.* en muestras de tejido y LCR. El cultivo del parásito es muy difícil de realizar, ya que requiere líneas celulares específicas, por lo que no se utiliza de forma rutinaria<sup>25</sup>.

## **Epidemiología**

La infección afecta a personas de todas las edades y a personas sanas, a diferencia de otras AVL que solo afectan a personas inmunocomprometidas<sup>22</sup>. En Sudamérica se han publicado algunos casos provenientes de Argentina, Venezuela, Brasil, y unos pocos casos en Perú.

Las cifras en Estado Unidos durante el periodo de 1974 al 2016, mostraron un total de 109 casos por *Balamuthia mandrillaris*, con una media de 36 años de los afectados, siendo un 68% hombres. De todos los casos, 41 documentaron de exposición al suelo, 35 exposiciones relacionadas con el suelo como jardinería y agricultura. En el 66% de los casos se reportó la interacción con fuentes de agua<sup>23</sup>.

### ***Acanthamoeba sp.***

Presenta dos estadios, el trofozoíto mide entre 20 y 56  $\mu\text{m}$  con seudópodos o acantópodos, citoplasma, su núcleo contiene nucléolo esférico central, se dividen por fisión binaria. Y el quiste que mide entre 11 y 25  $\mu\text{m}$  de diámetro con una pared doble, el ectoquiste es ondulada y el endoquiste estrellada o esférica, presenta poros y un opérculo<sup>1,2</sup>.

La infección inicia por la aspiración o inhalación de agua contaminada, *Acanthamoeba* penetra el epitelio del tracto respiratorio superior, también afecta a la córnea ocular, mucosa oral y mucosa intestinal<sup>19</sup> (ver **Anexo 4**).

El análisis molecular de *Acanthamoeba* ha permitido establecer 22 genotipos diferentes, basados en el gen 18S rDNA, nombrados de la T1 a T22, siendo el genotipo T4 el más común causante de infecciones a humanos, no hay una razón exacta, sin embargo podría ser su alta virulencia y capacidad de transmisión, la especie más común es *Acanthamoeba castellanii*, para la cual se ha determinado una longitud del genoma de 42,02 Mb y 15,455 genes compactos y ricos en intrones<sup>26</sup>.

### **Mecanismos de virulencia**

Sus mecanismos de virulencia están relacionados con su capacidad para adherirse a las células epiteliales mediante proteínas de adhesión específicas, como la proteína de membrana de adhesión (MBP), permitiendo la invasión y daño celular, también posee enzimas hidrolíticas que degradan la matriz extracelular y las membranas celulares, libera factores que inducen apoptosis y genera una respuesta inflamatoria<sup>1</sup>.

### **Características clínicas**

En las primeras dos semanas de desarrollar queratitis amebiana se presentan lesiones epiteliales con erosiones multifocales e infiltrados, causan dolor en la zona ocular, fiebre y cefalea, en el primer mes de evolución se produce la activación del complemento e

infiltrados peri neurales, después de varios meses de infección, desarrollan afecciones no específicas, como uveítis estéril, glaucoma, cataratas, coriorretinitis y vasculitis retiniana<sup>27</sup>.

## **Diagnóstico**

Ante la sospecha de queratitis amebiana se realizan análisis de laboratorio, cultivo de amebas, estudio citológico, microscopia y PCR se deben realizar en búsqueda del agente causal<sup>22,27</sup>. Se basa inicialmente en la sospecha clínica, examen con lámpara de hendidura y para confirmar el diagnóstico, se realizan raspados corneales, cultivos en medios no nutritivos con una capa de bacterias y técnicas moleculares como la PCR<sup>25</sup>.

En de encefalitis amebiana granulomatosa, el análisis de LCR puede mostrar pleocitosis, aumento de proteínas y glucosa baja o normal, en la biopsia cerebral, pueden observarse trofozoítos y quistes, la PCR es también es una herramienta fundamental. Las pruebas serológicas son de uso limitado<sup>25</sup>.

## **Epidemiología**

La enfermedad más común producida por *Acanthamoeba sp.* es la queratitis amebiana, alrededor del mundo existen reportes de 3,3 casos por cada 1000 usuarios de lentes de contacto, en los Estados Unidos se detectan 0,1 casos por cada 1000 lentes de contacto<sup>22</sup>. Otras cifras muestran una incidencia de 2,9 casos por cada millón de personas a nivel mundial, el número de casos va en aumento por el aumento del uso de lentes de contacto<sup>27</sup>. En el Ecuador no existen cifras oficiales sobre este parásito.

## **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

### **Técnica**

La PCR permite obtener múltiples copias de un fragmento de ADN a partir de una muestra, puede ser ADN genómico o complementario obtenido por RT-PCR. La amplificación de

secuencia específica de ADN permite aumentar la presencia del material genético incluso en casos donde es escaso. La amplificación se basa en la replicación de una plantilla de ADN de doble cadena y se divide en tres fases: desnaturalización, hibridación con cebadores y elongación<sup>9,28</sup>.

Los productos de cada de replicación sirven como plantilla para los pasos siguientes, logrando así una amplificación exponencial, se lleva a cabo en una mezcla de reacción que incluye la ADN molde, la enzima Taq polimerasa, cebadores o primers, y los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfatos (dNTPs) en exceso, en una solución tampón<sup>9,28</sup>.

Los tubos que contienen esta mezcla son sometidos a ciclos repetitivos de temperatura, múltiples veces en un equipo denominado termociclador, este dispositivo permite programar la duración y sucesión de los ciclos de temperatura, adecuados para el tipo de muestra y el rendimiento esperado<sup>9,28</sup>.

### ***Fases de la PCR***

La reacción en cadena de la polimerasa consta de tres fases principales que se repiten en ciclos para amplificar fragmentos específicos de ADN (ver **Anexo 5**). A continuación, se describen las fases:

- **Desnaturalización:** Es la separación de la doble cadena de ADN en dos, se obtiene al aumentar la temperatura hasta los 94°C, las cadenas separadas servirán como molde para la síntesis de nuevas cadenas<sup>9</sup>.
- **Hibridación:** Aquí se unen los oligonucleótidos de 20 a 25 pares de bases a las cadenas molde, formando puentes de hidrogeno a temperaturas de 40 a 70°C, actúan los cebadores uniéndose a las regiones de ADN que van a ser amplificadas, mientras más alta es la temperatura es más selectivo este proceso, por lo cual resulta más específico<sup>9,28</sup>.
- **Elongación:** Se forma la cadena complementaria, ocurre a 72°C, la enzima Taq polimerasa es la encargada unir los nucleótidos complementarios a las cadenas, se une a los ADN monocatenarios cebados y cataliza la replicación utilizando los

dNTPs presentes. En el siguiente ciclo, los fragmentos sintetizados en el ciclo anterior actúan como molde para una nueva amplificación, son necesarios de 20 a 40 ciclos para sintetizar una cantidad analizable de ADN, todo el proceso dura de 2 a 3 horas para una media de 30 ciclos<sup>9,28</sup>.

### ***Componentes de la PCR***

- **Máster mix:** Los volúmenes del medio de reacción varían entre 10 y 100 µl, aunque existen diversas fórmulas, se puede estandarizar según el tipo de reacción y muestra, de manera comercial se ha definido el llamado máster mix, que además contiene una solución tampón lista para usar con la Taq polimerasa, con una concentración de 10X, el máster mix contiene: 100 mM Tris-HCl, pH 9.0; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 500 mM KCl<sup>9</sup>, sin embargo, la concentración más utilizada es de 1X.

Los iones de magnesio son esenciales para la acción de la polimerasa y la estabilidad del ADN, los iones de potasio mejoran la reacción de fragmentos grandes, se puede aumentar la concentración de MgCl<sub>2</sub> si los dNTPs se encuentran en mayor proporción, el exceso de magnesio, sin embargo, reducen la acción de la polimerasa y genera productos inespecíficos<sup>29</sup>. Los dNTPs proporcionan energía y nucleótidos necesarios para la síntesis de ADN durante la polimerización de la cadena, se incorporan en exceso en el medio de reacción, aproximadamente 200 µM en concentración final<sup>9</sup>.

El ADN molde puede proceder de cualquier organismo y materiales biológicos complejos, para asegurar un buen resultado el ADN no debe estar degradado, contaminado con inhibidores de la reacción y la cantidad en el medio de reacción debe ser suficiente para iniciar la amplificación, pero no debe superar los 2 µg<sup>9</sup>. Un exceso de ADN puede generar productos inespecíficos, así mismo, se debe tener cuidado con la contaminación de la muestra y presencia de inhibidores, como fenoles, proteinasa K o EDTA<sup>29</sup>.

- **Cebadores o primers:** aunque son parte del máster mix, los cebadores deben ser específicamente seleccionados para lograr una amplificación selectiva de secuencias

de nucleótidos a partir de una muestra de ADN, se sintetizan químicamente y deben tener la mejor complementación posible con ambos extremos de la secuencia de interés a amplificar<sup>9,28</sup>.

Los cebadores son fragmentos de ADN de una sola cadena cuya hibridación en las secuencias que flanquean la secuencia de interés permitirá su replicación selectiva. El tamaño de los cebadores suele estar entre 10 y 30 nucleótidos, para garantizar una hibridación suficientemente específica en las secuencias de interés del ADN molde<sup>9,28</sup>.

Uno de los cebadores está diseñado para reconocer de manera complementaria una secuencia ubicada aguas arriba de la cadena 5'–3' del fragmento de ADN de interés, mientras que el otro debe reconocer una secuencia ubicada aguas arriba de la cadena complementaria 3'–5' del mismo fragmento<sup>9,28</sup>.

Dependiendo del volumen de la reacción, la concentración de cebadores puede variar entre 0,1-0,5  $\mu\text{M}$  por muestra, deben ser elegidos según criterios como alta especificidad, preferiblemente estos deben tener entre 18 - 24 pares de bases, una temperatura de fusión ( $T_m$ ) igual o parecida para hibridar a la secuencia diana, utilizando la fórmula  $T_m = 2(AT) + 4(GC)$ . La temperatura óptima de hibridación es de 50°C a 65°C, siendo igual o hasta 5°C inferior a la  $T_m$  de los cebadores, además, deben tener un contenido de GC de alrededor del 50%, no ser complementarios entre sí, no poseer regiones ricas en purinas y pirimidinas<sup>30</sup>.

- **Taq polimerasa:** permite la replicación del ADN, se obtiene a partir de una bacteria extremófila, *Thermus aquaticus*, resistente a temperaturas superiores a 100°C y su temperatura de confort es de 72°C, óptima para la actividad de su polimerasa<sup>9</sup>, con una concentración de 1U/ 50  $\mu\text{L}$  por reacción. Un exceso de enzima en la reacción puede generar productos inespecíficos o “smear”, que son sombras en las bandas en el gel de agarosa, y en caso de que la muestra contenga inhibidores, es necesario utilizar una concentración entre 2,5 – 3,0 U<sup>29</sup>.

- **Termociclador:** es un dispositivo que automatiza los cambios de temperatura requeridos durante la PCR, permitiendo la amplificación eficiente de fragmentos específicos de ADN. La duración de los ciclos de temperatura y el número de ciclos dependen del tamaño de la secuencia de interés y la complementación de los cebadores, se necesitan 30 segundos para la desnaturalización y la hibridación; y para la elongación, se necesita 1 minuto por kilobase de ADN y 2 minutos por kilobase para el ciclo final de elongación. El número de ciclos es inversamente proporcional a la abundancia de ADN molde<sup>9,28</sup>.

### *Tipos de PCR*

- **PCR convencional o punto final:** es la técnica estándar que involucra la amplificación de ADN en las tres fases de desnaturalización, hibridación y elongación. El resultado de la amplificación se debe visualizar en geles de electroforesis<sup>28</sup>.
- **PCR anidada:** se utilizan dos amplificaciones, la primera tiene como objetivo una región más extensa de ADN, reduciendo las regiones no específicas de ADN con la utilización de outer primers (cebadores externos). La segunda amplificación se dirige a regiones específicas, que se encuentran dentro del primer fragmento amplificado, utilizando inner primers (cebadores internos). El objetivo es reducir la posibilidad de que los cebadores se unan a regiones no específicas, por ende, se aumenta la especificidad del ensayo, cuyos resultados se visualizan en geles de electroforesis<sup>31</sup>.
- **PCR multiplex:** permite amplificar varios fragmentos de ADN a la vez, se logra al utilizar varios pares de iniciadores en la mezcla de reacción, es potencialmente útil en ensayos de investigación donde se requieren distinguir especies de un mismo género. Se puede usar una sola muestra de ADN con varios pares de iniciadores o pueden usarse varias muestras de ADN e iniciadores en un solo tubo de reacción<sup>31</sup>.
- **PCR en tiempo real (qPCR):** permite cuantificar la cantidad de ADN presente en una muestra, ya sea utilizando colorantes fluorescentes no específicos o sondas fluorescentes específicos a una secuencia de oligonucleótidos. Este tipo de ensayo

no utiliza un gel de electroforesis, para los resultados se pueden utilizar curvas de amplificación y gráficos que expongan la cantidad de ADN amplificado por ciclos<sup>28</sup>.

- **PCR transcripción inversa (RT-PCR):** la amplificación es precedida por la conversión de ARN a ADN complementarios, mediante el uso de la enzima viral transcriptasa inversa. Este ADN obtenido es utilizado en los ciclos de amplificación, es utilizado para la detección de virus y estudiar la expresión genética<sup>28</sup>.
- **Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP):** es el análisis de polimorfismos que permiten diferenciar las especies de un género, mostrar la diversidad genética y las cepas. El método se basa en utilizar enzimas de restricción para producir fragmentos de diferente tamaño en los productos de la PCR, así se distinguen las especies según los patrones de tamaño y número de fragmentos producidos por cada una mediante un gel de agarosa<sup>15</sup>.
- **PCR Digital:** es una técnica de PCR de última generación con mayor sensibilidad y específica para detectar cargas de ADN, también permite cuantificar su presencia en la muestra<sup>32</sup>.
- **PCR in situ:** la hibridación in situ es un método que se basa en utilizar una sonda, que es una cadena sencilla de ARN o ADN marcada, para que se una a su secuencia complementaria en el ARN o ADN de una muestra de tejido o cromosomas<sup>32</sup>.
- **PCR específica de alelo:** se usa para identificar polimorfismos de una sola base (SNPs), utiliza cebadores para la secuencia normal y la mutada<sup>32</sup>.
- **PCR asimétrica:** se usa en técnicas de hibridación in situ o en secuenciación, mediante la amplificación de una hebra de ADN preferentemente de la otra, utilizando cebadores en exceso, produciendo un ADN monocatenario<sup>32</sup>.
- **PCR touchdown:** se compone de dos fases de hibridación, utilizando una temperatura elevada y una temperatura óptima, utilizado cuando no se conoce la

secuencia exacta del fragmento a amplificar, con cebadores degenerados, reduciendo la amplificación no específica bajando la temperatura<sup>32</sup>.

- **PCR de rango largo:** está técnica emplea más de 4kb, para optimizar fragmentos grandes<sup>32</sup>.
- **PCR de fidelidad alta:** utilizan enzimas diferentes de polimerasa, para remover bases incorporadas incorrectamente<sup>32</sup>.

### ***Análisis de productos***

Una PCR produce más copias del ADN de una muestra de interés, este material genético puede ser visualizado por medio de la electroforesis en gel, pudiendo ser agarosa o acrilamida. Para esto, se utiliza una tinción con bromuro de etidio, visibles por luz ultravioleta a 280 – 320 nm<sup>9</sup>.

En el gel se forman bandas por la migración del ADN frente a una corriente eléctrica, dependiendo de las condiciones técnicas, estas bandas pueden presentar formas poco definidas o con la presencia de “smear”, que corresponde a patrones difusos o sombras en las bandas<sup>9</sup>.

### ***Aplicaciones de la PCR***

En el campo del diagnóstico clínico, la PCR se ha vuelto una herramienta útil para la detección de enfermedades en sus estadios más tempranos, así mismo, en otros campos de investigación, supone una técnica sensible y específica, entre estas aplicaciones se encuentran<sup>28</sup>:

- Diagnóstico de infecciones: identificación de patógenos bacterianos, virales, protozoarios y fúngicos.
- Diagnóstico de defectos genéticos: detección y confirmación de mutaciones o enfermedades genéticas.

- Diagnóstico y pronóstico de cánceres: identificación de genes relacionados con cáncer y su expresión para determinar predisposición, tipo de cáncer, pronóstico y tratamiento.
- Filogenética: amplificación de marcadores para identificar y clasificar organismos.
- Arqueología: recuperar y amplificar ADN antiguo (aDNA) de restos arqueológicos.
- Tecnología de ADN recombinante: generar ADN híbrido, clona fragmentos en vectores y permite la expresión de proteínas.
- Metagenómica: identificar genes raros y miembros poco abundantes de comunidades microbianas.
- Mutagénesis dirigida: introducir mutaciones específicas en genes para estudiar función de proteínas.
- Medicina personalizada: analizar marcadores genéticos para adaptar tratamientos y diseñar terapias individualizadas.
- Ciencias forenses: amplificar ADN de baja cantidad o calidad en escenas del crimen.
- Perfilado de ADN (DNA profiling): estudia polimorfismos (SNPs, repeticiones en tándem, etc.) para genética poblacional, diversidad y ecología.

### **Aplicación de la PCR para la identificación de amebas**

La aplicación de métodos basados en la amplificación de fragmentos de ADN para diagnosticar la amebiasis resolvió el problema de diferenciar las amebas patógenas y no patógenas, la PCR tiene mayor sensibilidad y especificidad que la microscopía y la detección de antígenos, permite la detección temprana de la amebiasis para un tratamiento oportuno. La diferenciación de especies se logra mediante la amplificación de regiones del ADN correspondientes a genes de copia única o múltiple<sup>33</sup>.

Para el diagnóstico de amebiasis se han utilizado varios genes para reconocer y diferenciar entre tres especies de *Entamoeba*, como el gen ARN ribosomal de subunidad pequeña (18S rRNA), proteínas específicas de 30 kDa, secuencias de ADN altamente repetitivas, el gen de la hemolisina (HLY6), proteinasas como la cisteína proteinasa, el gen SREHP (rico en serina de *E. histolytica*), el gen de actina y repeticiones en ADN extracromosómico<sup>34</sup>.

El gen HLY6 se ha usado con éxito en pruebas PCR para detectar *E. histolytica* en muestras de heces, con una sensibilidad y especificidad diagnósticas del 100%. Aunque, el gen más usado en PCR es el 18S rRNA y permite diferenciar entre *E. histolytica* y *E. dispar*<sup>34</sup>.

La PCR también ha demostrado ser una herramienta fundamental para el diagnóstico de infecciones causadas por AVL. Al igual que en la amebiasis, para las técnicas de PCR en *Acanthamoeba sp.* se utilizan genes específicos de ARNr o ADN mitocondrial, con una sensibilidad del 94%, permitiendo diferenciar a esta especie de otras<sup>22</sup>. Para *Balamuthia sp.* el gen más utilizado es el gen de la subunidad 16S ARNr, permitiendo detectar a la especie *B. mandrillaris* con alta sensibilidad<sup>22</sup>.

En el caso de *N. fowleri*, los genes más utilizados para la amplificación son los genes 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 y 28S rRNA<sup>20</sup>.

La PCR tiene mayor sensibilidad y especificidad que la microscopía y la detección de antígenos, permite la detección temprana de la amebiasis para un tratamiento oportuno. La diferenciación de especies se logra mediante la amplificación de regiones del ADN correspondientes a genes de copia única o regiones conservadas<sup>33</sup>. En el **Anexo 6** se recopilan las regiones conservadas para cada especie de amebas de relevancia clínica.

## **CAPÍTULO III. METODOLOGÍA.**

### **Según el enfoque**

Presenta un enfoque cualitativo de revisión bibliográfica, ya que se analizaron las variables a partir de datos obtenidos de artículos científico, que documentan el uso de la técnica de PCR en la detección de amebas patógenas en humanos.

### **Según el nivel o alcance**

Fue un estudio descriptivo, pues se muestran los detalles de las características de las variables objeto de estudio con respecto al uso de la PCR en la detección de amebas. No se establecieron relaciones causales ni probar hipótesis, se describió cómo ha sido utilizada esta técnica, qué variantes metodológicas y principales resultados obtenidos en la literatura.

### **Según el diseño**

Se trató de un estudio de tipo documental de análisis bibliográfico fundamentado en la revisión, análisis e interpretación de información de fuentes científicas y bases de datos académicos en base al objetivo planteado, no se vio la necesidad de manipulación de variables.

### **Según el corte**

Fue de tipo transversal, en el que se obtuvieron los datos de estudios previos, la información fue recopilada y analizada en un solo momento, a partir de publicaciones y metodologías existentes correspondientes a un periodo de tiempo determinado, seleccionando artículos relevantes publicados en años recientes sobre la aplicación de la PCR en el diagnóstico de amebas patógenas en humanos.

## **Según la cronología de los hechos**

La investigación fue retrospectiva, puesto que los datos bibliográficos se obtuvieron de publicaciones realizadas en los últimos 10 años.

## **Población**

La población objeto de estudio fue obtenida a partir de la utilización de palabras claves y operadores booleanos, que dieron como resultado a 178 artículos científicos publicados en revistas especializadas que abordan el uso de la PCR en la detección de amebas en humanos. Se seleccionaron artículos académicos de acceso internacional, de PubMed (121), LILACS (2), Google Scholar (43), Scielo (12) en función de los objetivos.

## **Muestra**

El muestreo fue de tipo no probabilístico, por conveniencia, ya que se eligieron los artículos que cumplen con los criterios de selección. La muestra se estableció en 30 artículos científicos que cumplen con los objetivos de la investigación, obtenidos de bases académicas como PubMed (20), LILACS (0), Google Scholar (8) y Scielo (2).

## **Métodos y técnica de recolección de datos**

**Técnica:** observación

**Procedimiento:** se realizó mediante el análisis de la información documental obtenida sobre la detección molecular de amebas, especialmente las que mencionan la aplicación de diagnóstico molecular por PCR, en artículos publicados en revistas científicas, que se recolectaron para su procesamiento y elaboración de tablas descriptivas.

**Estrategia de búsqueda:** Esta investigación se basó en la revisión bibliográfica sistemática, con el objetivo de investigar datos sobre los procedimientos técnicos de la detección por PCR de amebas. Con el uso de palabras claves sobre los objetivos del presente trabajo se obtuvo una población de artículos, luego aplicando criterios de selección se quedó con 30

artículos que constituyeron la muestra. Estas fueron revisadas para la obtención de los datos requeridos para la interpretación y presentación de los resultados

Los términos utilizados fueron en inglés como: “*amoebiasis PCR*”, “*Entamoeba histolytica PCR*”, “*free living amoeba PCR*”, “*Naegleria PCR*”, “*Acanthamoeba PCR*”, “*Balamuthia PCR*”.

### **Consideraciones éticas**

Al ser una revisión bibliográfica no será necesaria la participación de un comité de bioética.

### **Criterios de inclusión y exclusión**

#### **Criterios de inclusión**

- Artículos publicados entre los años 2015-2025.
- Artículos en inglés y español.
- Artículos que traten muestras humanas o muestras ambientales.
- Artículos que contengan información de la concentración de los componentes de la mezcla de reactivos.
- Artículos que contengan los resultados del gel de electroforesis.

#### **Criterios de exclusión**

- Artículos que, aunque tenían la información requerida, estaban publicados en otros idiomas diferentes al inglés y español.
- Casos clínicos.
- Artículos con información relevante sobre la detección por PCR de amebas patógenas, pero que no contenían la concentración de los componentes de la mezcla de reactivos.
- Artículos con información relevante pero que no contengan los resultados del gel de electroforesis.

## **Métodos de análisis**

Dado que se trató de una investigación de enfoque cualitativo documental, el análisis de datos se basó en la revisión, comparación e interpretación de la información recopilada en fuentes científicas. Para ello, se aplicó una estrategia de análisis de contenido temático, que permitió identificar, organizar y sintetizar los hallazgos más relevantes relacionados con el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el diagnóstico de amebas patógenas en humanos.

El procesamiento de los datos consistió en una lectura crítica y selectiva de los estudios recopilados, seguida de la extracción de datos y la organización sistemática de la información en tablas recopilatorias, facilitando la interpretación. En estas tablas se clasificaron aspectos clave como la composición del Master Mix, las condiciones de termociclador y los resultados observados en gel de agarosa, permitiendo visualizar similitudes, diferencias y patrones recurrentes en los protocolos analizados.

Los hallazgos fueron integrados y organizados de forma descriptiva, agrupando la información por temas relevantes, con el fin de proporcionar una visión clara y estructurada del estado actual del conocimiento sobre el diagnóstico molecular de amebas mediante PCR.

## **CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Se analizaron un total de 30 artículos científicos relacionados con la técnica de PCR aplicada a la detección de amebas patógenas, con 19 artículos para amebas de vida libre y 11 artículos de amebas intestinales.

### **Comparación de concentraciones del Máster mix reportados en la literatura**

El análisis de las concentraciones de los reactivos se realizó considerando la descripción de los componentes del Máster mix, como son buffer, polimerasa, dNTPs,  $MgCl_2$ , primers, muestra de ADN. También, el tamaño de los amplicones y volumen total de reacción, estos resultados se resumen en la tabla 2.

Basado en estos parámetros, se encontró que: 11 artículos (36,66%) presentaron una descripción completa del Máster Mix; 8 artículos (26,66%) fueron clasificados como faltantes, omitiendo al menos dos parámetros; 11 artículos (36,68%) fueron clasificados como incompletos, reportando cuatro o menos componentes.

La mayoría de los artículos coincidían con los rangos estándar de una PCR convencional, el buffer fue utilizado en concentración 1X en casi todos los estudios. La Taq polimerasa se reportó comúnmente entre 1 y 1,25 unidades por reacción, las concentraciones de dNTPs entre 200 y 250  $\mu M$ , con 200  $\mu M$  por cada nucleótido. El  $MgCl_2$  en concentraciones entre 1,5 y 2,5 mM.

Los primers se emplearon en concentraciones entre 0,2 y 0,5  $\mu M$ , y la cantidad de ADN molde se mantuvo entre 1 y 10 ng. El volumen total de reacción fue de 20 a 25  $\mu L$  en el 63.33% de los estudios (19 artículos), lo cual refleja una práctica común para ensayos estándar de PCR. Sin embargo, una parte de los estudios refirió el uso de una mezcla comercial de Máster mix, por lo cual no se desglosa el contenido de los reactivos y concentraciones utilizadas en el estudio.

**Tabla 1.** Análisis del uso de reactivos en la preparación del Máster mix reportados en la literatura

| Nº | Especie                 | Tipo de PCR | Tampón | MgCl <sub>2</sub> | dNTPs   | Primer F y R | Taqpol   | Muestra    | Vol. total | Amplicon (pb) | Referencia |
|----|-------------------------|-------------|--------|-------------------|---------|--------------|----------|------------|------------|---------------|------------|
| 1  | <i>Acanthamoeba sp.</i> | Punto final | -      | 4 mM              | 2 mM    | 1 µM         | 1 U      | 0,1–1,0 ng | 25 µl      | 950           | 35         |
|    | <i>Naegleria sp.</i>    |             |        |                   |         |              |          |            |            | 177           |            |
|    | <i>B. mandrillaris</i>  |             |        |                   |         |              |          |            |            | 1075          |            |
| 2  | <i>Acanthamoeba sp.</i> | Punto final | 1 X    | 3 mM              | 300 µM  | 4 pmol       | 1,25 U   | 2 ng/µl    | 50 µl      | 500           | 36         |
|    | <i>Naegleria sp.</i>    |             |        |                   |         |              |          |            |            | 183           |            |
| 3  | <i>N. fowleri</i>       | Punto final | 1X     | 1,5 mM            | 0,24 mM | 0,4 µM       | 1 U      | 1-2 ng/µl  | 25 µl      | 310           | 37         |
| 4  | <i>Acanthamoeba sp.</i> | Punto final | -      | -                 | -       | 0,1 µM       | -        | 10 ng      | -          | 500           | 38         |
|    | <i>N. fowleri</i>       |             |        |                   |         |              |          |            |            |               |            |
| 5  | <i>Acanthamoeba sp.</i> | Punto final | -      | -                 | -       | 0,1 µM       | -        | 5 µl       | 50 µl      | 500           | 39         |
| 6  | <i>Acanthamoeba sp.</i> | Punto final | 1 X    | 2 mM              | 0,2 mM  | 0,4 µM       | -        | 4 µl       | 25 µl      | 450           | 40         |
| 7  | <i>Acanthamoeba sp.</i> | Punto final | -      | -                 | -       | 1,25 µM      | -        | 2 µl       | 20 µl      | 500           | 41         |
| 8  | <i>Acanthamoeba sp.</i> | Punto final | 1 X    | 1 mM              | 0,2 mM  | 2 µM         | 2,5 U    | 10 µl      | 50 µl      | 180           | 42         |
|    | <i>Naegleria sp.</i>    |             |        |                   |         |              |          |            |            | 183           |            |
| 9  | <i>Acanthamoeba sp.</i> | Punto final | -      | -                 | -       | 0,1 µM       | -        | 0,3 ng/µl  | 30 µl      | 500           | 43         |
| 10 | <i>Acanthamoeba sp.</i> | Punto final | -      | -                 | 0,2 mM  | 0,06 µM      | 1,25 U   | 5 µl       | 25 µl      | 500           | 44         |
| 11 | <i>N. fowleri</i>       | Punto final | 10X    | -                 | 0,2 mM  | 0,2 µM       | 2,5 µmol | 2 µl       | 25 µl      | 450           | 45         |
|    | <i>Acanthamoeba sp.</i> |             |        |                   |         |              |          |            |            | 450           |            |
| 12 | <i>N. fowleri</i>       | Tiempo real | -      | -                 | -       | 0,3 µM       | -        | 4 µl       | 22 µl      | 98            | 46         |
| 13 | <i>Acanthamoeba sp.</i> | Punto final | -      | -                 | -       | 10 pmol      | -        | 0,5 mg/µl  | 20 µl      | 500           | 47         |
| 14 | <i>N. fowleri</i>       | Punto final | -      | -                 | 0,2 mM  | 20 pmol      | 1,25 U   | -          | 25 µl      |               | 48         |
|    | <i>Acanthamoeba sp.</i> |             |        |                   |         |              |          |            |            | 500           |            |
| 15 | <i>Acanthamoeba sp.</i> | Punto final | 1X     | -                 | 0,2 mM  | 0,8 µmol     | -        | 2 µl       | 25 µl      | 500           | 49         |
|    | <i>Naegleria sp.</i>    |             |        |                   |         |              |          |            |            | 400-450       |            |
| 16 | <i>Acanthamoeba sp.</i> | Punto final | 1X     | 1,5 mM            | 0,2 mM  | 10 pmol      | 1 U      | 2 µl       | 25 µl      | 500           | 50         |
| 17 | <i>Acanthamoeba sp.</i> | Punto final | 1X     |                   | 0,2 mM  | 0,4 µM       | 1,25 U   | -          | 25 µl      | 280           | 51         |

|    |                                      |             |       |        |          |         |        |         |       |     |    |
|----|--------------------------------------|-------------|-------|--------|----------|---------|--------|---------|-------|-----|----|
| 18 | <i>Acanthamoeba sp.</i><br><i>M1</i> | Anidada     | -     | -      | -        | 0,4 µM  | -      | 3 µl    | 25 µl | 500 | 52 |
|    | <i>Acanthamoeba sp.</i><br><i>M2</i> |             |       |        |          |         |        | 1 µl    | 25 µl | 500 |    |
|    | <i>Acanthamoeba sp.</i><br><i>M6</i> | Tiempo real | 1X    | -      | -        | 0,4 µM  | -      | 3 µl    | 20 µl | 180 |    |
| 19 | <i>N. fowleri</i>                    | Anidada     | 1 X   | 2,5 mM | 0,2 mM   | 0,6 µM  | 2,5 U  | 2 µl    | -     | 110 | 53 |
| 20 | <i>Entamoeba sp.</i>                 | Anidada     | 1X    | 2 mM   | 0,25 mM  | 1 µM    | 1U     | 2 µl    | 20 µl | 897 | 54 |
|    | <i>E. histolytica</i>                |             |       |        |          |         |        |         |       | 439 |    |
|    | <i>E. dispar</i>                     |             |       |        |          |         |        |         |       | 174 |    |
|    | <i>E. moshkovskii</i>                |             |       |        |          |         |        |         |       | 553 |    |
| 21 | <i>Entamoeba sp.</i>                 | Anidada     | -     | -      | -        | 0,5 µM  | -      | 4 µl    | 25 µl | 888 | 55 |
|    | <i>E. histolytica</i>                |             |       |        |          |         |        |         |       | 439 |    |
|    | <i>E. dispar</i>                     |             |       |        |          |         |        |         |       | 174 |    |
| 22 | <i>Entamoeba sp.</i>                 | Múltiple    | 2X    | 1,5 mM | 0,125 mM | 1,25 µM | 2,5 U  | 15 µl   | 40 µl | 800 | 56 |
|    | <i>E. histolytica</i>                |             |       |        |          |         |        |         |       | 439 |    |
|    | <i>E. dispar</i>                     |             |       |        |          |         |        |         |       | 174 |    |
|    | <i>E. moshkovskii</i>                |             |       |        |          |         |        |         |       | 553 |    |
| 23 | <i>Entamoeba sp.</i>                 | Anidada     | 1 X   | 4 mM   | 0,256 mM | 0,96 µM | 1U     | 4 ng/µl | 25 µl |     | 57 |
|    | <i>E. histolytica</i>                |             | 1,6 X | 6,4 mM | 0,4 mM   | 1,6 µM  | 1 U    | 4 µl    | 25 µl | 874 |    |
|    | <i>E. dispar</i>                     |             |       |        |          |         |        |         |       | 874 |    |
| 24 | <i>I. butschlii</i>                  | Punto final | 1X    | 2,5 mM | 200 µM   | 15 pM   | 0,25 U | 5 µl    | 25 µl | 590 | 58 |
|    | <i>E. hartmanni</i>                  |             |       |        |          |         |        |         |       | 300 |    |
|    | <i>E. nana</i>                       |             |       |        |          |         |        |         |       | 740 |    |
| 25 | <i>Entamoeba sp.</i>                 | Anidada     | 1X    | -      | -        | 0,25 µM | 2 U    | 4 µl    | 40 µl | 898 | 59 |
|    | <i>E. histolytica</i>                |             |       |        |          |         |        |         |       | 439 |    |
|    | <i>E. dispar</i>                     |             |       |        |          |         |        |         |       | 174 |    |
|    | <i>E. moshkovskii</i>                |             |       |        |          |         |        |         |       | 553 |    |
| 26 | <i>Entamoeba sp.</i>                 | Múltiple    | 1 X   | 25 mM  | 5 mM     | 0,3 µM  | 1,5 U  | 2,5 µl  | 25 µl | 898 | 60 |

|    |                       |             |     |        |        |        |       |         |       |     |    |
|----|-----------------------|-------------|-----|--------|--------|--------|-------|---------|-------|-----|----|
|    | <i>E. histolytica</i> |             |     |        |        |        |       |         |       | 439 |    |
|    | <i>E. dispar</i>      |             |     |        |        |        |       |         |       | 174 |    |
|    | <i>E. moshkovskii</i> |             |     |        |        |        |       |         |       | 553 |    |
| 27 | <i>E. histolytica</i> | Punto final | 1X  | 1 mM   | 0,2 mM | 0,4 µM | 1 U   | 1 µl    | 50 µl | 605 | 61 |
| 28 | <i>E. histolytica</i> | Tiempo real | 1 X |        |        | 5 µM   |       | 5 ng/µl | 20 µl | 134 | 62 |
| 29 | <i>E. histolytica</i> | Múltiple    | 1X  | 1,5 mM | 200 µM | 0,6 µM | 1,5 U | 4 ng/µl | 25 µl | 477 | 63 |
| 30 | <i>E. histolytica</i> | Múltiple    | 1 X |        | 16 mM  |        | 1,5 U | 2 ng/µl | 25 µl | 439 | 64 |

## Análisis

Los reactivos de la técnica de PCR listados en la tabla 2 muestran variaciones notorias para las condiciones de amplificación. La mayoría de los estudios emplean PCR de punto final, con volúmenes de reacción entre 20 y 50  $\mu\text{L}$ . Los reactivos más importantes son el  $\text{MgCl}_2$ , dNTPs, Taq polimerasa, primers, ADN molde y el buffer de reacción.

Los protocolos de PCR para *Acanthamoeba sp.* y *Naegleria sp.* presentan variaciones en sus componentes, por diferencias en los objetivos de los estudios, tipo muestras, extracción de ADN y limitaciones técnicas. Por ejemplo, la concentración de  $\text{MgCl}_2$  varía entre valores bajos (1 - 1,5 mM), como fue reportado por Panda et al.<sup>37</sup>, siendo ideales para genomas con bajo contenido de G - C y reduce errores de la polimerasa. Las concentraciones altas (3 - 4 mM), como las aplicadas por Gabriel et al.<sup>35</sup>, se utilizan en muestras ambientales con inhibidores para neutralizar interferentes, considerando que fragmentos largos (>800 pb) pueden requerir más  $\text{MgCl}_2$  para estabilizar la estructura del ADN.

Los dNTPs suelen mantenerse en rangos bajos (0,1 - 0,2 mM) para evitar la quelación de Mg y minimizar errores de incorporación, como en el protocolo de Rojas et al.<sup>44</sup>. Sin embargo, algunos estudios, como López et al.<sup>57</sup> usan hasta 0,4 mM cuando se combinan con altas concentraciones de  $\text{MgCl}_2$  (6,4 mM), para un mejor equilibrio.

También, se observó una notable consistencia en la concentración de Taq polimerasa, con la mayoría de los estudios empleando entre 1 y 2 unidades (U) por reacción. Este rango coincide con las recomendaciones estándar del fabricante para volúmenes de 25 a 50  $\mu\text{L}$ , sin embargo, se identificó un caso en el que se reportó una cantidad de 2,5  $\mu\text{mol}$  de Taq polimerasa (Tiewcharoen et al.<sup>45</sup>). Dado que la actividad se mide en unidades enzimáticas, el reporte no permite una comparación directa con el resto de los estudios, y podría corresponder a un error de redacción o a una confusión entre concentración molar y unidades de actividad.

La cantidad de primers varía según el tipo de PCR, complejidad del genoma y la calidad de la muestra. Concentraciones bajas (0,06 - 0,2  $\mu\text{M}$ ), como las de Rojas et al.<sup>44</sup>, esta concentración puede utilizarse para evitar las amplificaciones inespecíficas, dependiendo de

la calidad de la muestra, material genético en buen estado es suficiente para asegurar que la amplificación tendrá resultados óptimos, ya que, en este protocolo la extracción se realizó “in house” (protocolo desarrollado y optimizado dentro del laboratorio) aumentando la calidad del ADN. En contraste, valores altos (1 - 2  $\mu$ M), como los de Aguayo et al.<sup>62</sup>, con una concentración de 5 $\mu$ M, en muestras con baja carga parasitaria.

La cantidad de ADN molde refleja el origen, calidad de la muestra y el proceso de extracción de ADN. Muestras con alta pureza como cultivos pueden amplificarse con solo 0,1 - 1 ng (Gabriel et al.<sup>35</sup>), mientras que muestras ambientales complejas, como muestras de fuente de agua, requieren hasta 100 ng (Degerli et al.<sup>36</sup>) para compensar la presencia de inhibidores.

En cuanto al buffer, la mayoría de los protocolos revisados especificaron el uso de una concentración final de 1X, no obstante, se encontró un caso en el que se reportó una concentración de 10X (Tiewcharoen et al.<sup>45</sup>), lo cual resulta inusualmente alta como concentración final. Sin embargo, es probable que esta cifra haga referencia al buffer stock utilizado en la preparación de la mezcla, y no a la concentración en la reacción final. Este protocolo no especificaba el volumen de buffer agregado, lo que impidió calcular su concentración final con precisión.

La PCR punto final es preferida por su simplicidad y bajo costo, como Khurana et al.<sup>48</sup> ideal para estudios ecológicos. La PCR anidada, como la usada por Mahittikorn et al.<sup>53</sup>, se reserva para muestras críticas (LCR) cuando se necesita una alta sensibilidad, aunque implica mayor riesgo de contaminación.

Por último, el tamaño de los amplicones influye en aspectos como la cantidad de dNTPs, MgCl<sub>2</sub> (fragmentos más largos necesitan concentraciones de 2,5 - 4 mM para estabilizar la doble hebra de ADN, fragmentos cortos se reducen a 1 - 1,5 mM para minimizar amplificaciones inespecíficas), primers y aditivos especiales. Tal como se ve en el protocolo de López et al.<sup>57</sup>, que emplea una concentración de 6,4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de dNTPs, 1,6 M de primer F y R y 1 U de Taqpol, para un amplicon de 874 pb.

Las variaciones en los protocolos no son arbitrarias, sino que buscan ajustarse a muestras complejas, recursos disponibles y distintas aplicaciones, como estudios epidemiológicos o

clínicos. Entender estas razones permite seleccionar o ajustar protocolos para cada contexto experimental, como puede ser dentro de un laboratorio con muestras clínicas puras, la cantidad de  $\text{MgCl}_2$  sería baja y primers a  $0,4 \mu\text{M}$ , mientras tanto, en estudios con muestras ambientales, la concentración de  $\text{MgCl}_2$  debe ser alta y mayor cantidad de ADN.

## Discusión

La composición del Master Mix representa uno de los factores más determinantes en la eficacia de la PCR para la identificación de amebas tanto intestinales como de vida libre. Esta mezcla debe asegurar condiciones óptimas para que la ADN polimerasa lleve a cabo una amplificación específica y eficiente, aún en presencia de ADN de baja calidad o posibles inhibidores presentes en las muestras.

Entre los componentes esenciales, la enzima polimerasa es quizás el reactivo más crítico. La mayoría de los protocolos para *E. histolytica*, como los descritos por Sindhusuta et al. emplean Taq polimerasa estándar con una concentración final de  $1,5 \text{ U}$ , adecuada para la amplificación de con buena eficiencia<sup>65</sup>, de igual manera, Attarianai et al. con una concentración de  $1 \text{ U}$  de Taq polimerasa para la identificación de *Acanthamoeba* en muestras de agua<sup>66</sup>.

El  $\text{MgCl}_2$  es el cofactor necesario para la actividad de la polimerasa, y su concentración puede afectar directamente la fidelidad y eficiencia de la reacción, concentraciones insuficientes pueden reducir la tasa de amplificación, mientras que concentraciones elevadas tienden a favorecer productos inespecíficos. Autores como Ajonina et al.<sup>67</sup> usaron  $3 \text{ mM}$  de  $\text{MgCl}_2$  para identificar *E. histolytica* con resultados óptimos, mientras que Attarianai et al.<sup>66</sup> y Gabr et al.<sup>68</sup> reportaron que para *Acanthamoeba* en muestras de agua, una concentración de  $1,5 \text{ mM}$  y  $2 \text{ mM}$  respectivamente, lo permitió obtener bandas específicas y óptimos resultados en la secuenciación.

Los dNTPs se suelen utilizar en concentraciones estándar de  $200 \mu\text{M}$  por cada base, sin embargo, en protocolos de alta sensibilidad se pueden ajustar levemente para mejorar la eficiencia de reacción y reducir la tasa de errores, por ejemplo, para la detección de *E.*

*histolytica*, Ajonina et al.<sup>67</sup>, aplicaron una concentración de 200 µM de cada dNTPs, al igual que Attarianai et al.<sup>66</sup> para la identificación de *Acanthamoeba*.

En cuanto a los cebadores, su especificidad y diseño determinan en gran medida el éxito del diagnóstico, protocolos dirigidos al gen 18S rRNA han sido los más empleados en la identificación de *Entamoeba sp.*, *Naegleria* y *Acanthamoeba*, dado que contiene regiones altamente conservadas que permiten diferenciar especies.

### **Comparación de condiciones de termociclado**

A continuación, en la tabla 3 constan la recopilación y comparación de las condiciones de termociclado empleadas en distintos protocolos de PCR reportados en la literatura, de los 30 artículos revisados, se identificaron diferencias en las condiciones óptimas utilizadas para la amplificación de ADN de amebas de vida libre y amebas intestinales, considerando los ciclos de predesnaturalización, desnaturalización, hibridación, elongación y extensión de la polimerasa.

El análisis de los datos permitió observar que, si bien existe cierta variación entre protocolos, se mantiene una tendencia general hacia el uso de condiciones similares, especialmente en lo que respecta a la temperatura de desnaturalización (94 - 95 °C) y el número de ciclos (30 - 35). No obstante, se identificaron diferencias relevantes en las temperaturas de hibridación y en los tiempos de extensión, posiblemente asociadas al diseño de los primers o al tamaño del amplicon.

**Tabla 2.** Condiciones del termociclador para la amplificación de diferentes especies de amebas

| Nº | Especie                                                                                | Predesnaturalización |     | Desnaturalización |     | Hibridación |     | Elongación |     | Extensión |     | Ciclos | Refer_encia |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|-----|-------------------|-----|-------------|-----|------------|-----|-----------|-----|--------|-------------|
|    |                                                                                        | Cº                   | Min | Cº                | Seg | Cº          | Seg | Cº         | Seg | Cº        | Min |        |             |
| 1  | <i>Acanthamoeba sp.</i> ,<br><i>B. mandrillaris</i><br><i>Naegleria sp.</i>            | 94                   | 3   | 94                | 30  | 50          | 30  | 72         | 30  | 72        | 10  | 40     | 35          |
| 2  | <i>Acanthamoeba sp.</i> ,<br><i>Naegleria sp.</i>                                      | 94                   | 3   | 95                | 9   | 57,6        | 18  | 72         | 21  | 72        | 5   | 45     | 36          |
| 3  | <i>N. fowleri</i>                                                                      | 95                   | 5   | 94                | 30  | 55          | 30  | 72         | 30  | 72        | 5   | 30     | 37          |
| 4  | <i>Acanthamoeba sp.</i><br><i>Naegleria sp.</i>                                        | 94                   | 3   | 95                | 35  | 56          | 60  | 72         | 60  | -         | -   | 34     | 38          |
| 5  | <i>Acanthamoeba sp.</i>                                                                | 95                   | 5   | 94                | 30  | 48          | 60  | 72         | 45  | 72        | 11  | 44     | 39          |
| 6  | <i>Acanthamoeba sp.</i>                                                                | 94                   | 7   | 94                | 30  | 56          | 30  | 72         | 600 | -         | -   | 35     | 40          |
| 7  | <i>Acanthamoeba sp.</i>                                                                | 95                   | 5   | 95                | 40  | 56          | 45  | 72         | 55  | 72        | 7   | 35     | 41          |
| 8  | <i>Acanthamoeba sp.</i><br><i>Naegleria sp.</i>                                        | 94                   | 5   | 94                | 60  | 58          | 60  | 72         | 60  | 72        | 10  | 35     | 42          |
| 9  | <i>Acanthamoeba sp.</i>                                                                | 94                   | 1   | 94                | 35  | 56          | 4   | 72         | 60  | 72        | 5   | 35     | 43          |
| 10 | <i>Acanthamoeba sp.</i>                                                                | 95                   | 7   | 95                | 60  | 60          | 60  | 72         | 120 | 72        | 10  | 45     | 44          |
| 11 | <i>N. fowleri</i> , <i>Acanthamoeba sp.</i>                                            | 94                   | 3   | 94                | 30  | 55          | 30  | 72         | 60  | 72        | 5   | 35     | 45          |
| 12 | <i>N. fowleri.</i>                                                                     | 95                   | 0,5 | 95                | 5   | 60          | 30  | 72         | 40  | -         | -   | 45     | 46          |
| 13 | <i>Acanthamoeba sp.</i>                                                                | 94                   | 4   | 94                | 35  | 57          | 45  | 72         | 60  | 72        | 5   | 33     | 47          |
| 14 | <i>Acanthamoeba sp.</i>                                                                | 95                   | 1   | 95                | 60  | 60          | 60  | 72         | 120 | 72        | 7   | 39     | 48          |
| 15 | <i>Acanthamoeba sp.</i><br><i>Naegleria sp.</i>                                        | 95                   | 5   | 95                | 20  | 60          | 40  | 72         | 45  | 72        | 5   | 35     | 49          |
| 16 | <i>Acanthamoeba sp.</i>                                                                | 94                   | 4   | 94                | 35  | 57          | 45  | 72         | 60  | 72        | 5   | 33     | 50          |
| 17 | <i>Acanthamoeba sp.</i>                                                                | 94                   | 10  | 94                | 60  | 57          | 60  | 72         | 60  | 72        | 10  | 35     | 51          |
| 18 | <i>Acanthamoeba sp. M1</i><br><i>Acanthamoeba sp. M2</i><br><i>Acanthamoeba sp. M6</i> | 95                   | 5   | 95                | 15  | 62          | 15  | 72         | 30  | 72        | 10  | 35     | 52          |
|    |                                                                                        | 95                   | 0,3 | 95                | 3   | 58          | 30  | -          | -   | -         | -   | 45     |             |

|    |                                          |    |    |    |    |    |    |    |        |    |    |    |    |
|----|------------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|--------|----|----|----|----|
| 19 | <i>N. fowleri</i>                        | 95 | 5  | 95 | 60 | 65 | 60 | 72 | 120    | -  | -  | 35 | 53 |
| 20 | <i>Entamoeba sp.</i>                     | 95 | 1  | 94 | 30 | 52 | 30 | 72 | 30     | 72 | 5  | 35 | 54 |
| 21 | <i>E. dispar</i> y <i>E. histolytica</i> | 96 | 2  | 92 | 60 | 56 | 60 | 72 | 90     | 72 | 7  | 30 | 55 |
| 22 | <i>Entamoeba sp.</i>                     | 94 | 1  | 94 | 60 | 48 | 60 | 72 | 60-900 | 72 | 10 | 25 | 56 |
| 23 | <i>E. dispar</i> y <i>E. histolytica</i> | 94 | 2  | 92 | 60 | 62 | 60 | 72 | 90     | 72 | 7  | 40 | 57 |
| 24 | <i>Entamoeba coli</i>                    | 95 | 7  | 95 | 30 | 62 | 30 | 72 | 30     | 72 | 7  | 40 | 58 |
| 25 | <i>Entamoeba sp.</i>                     | 95 | 1  | 94 | 30 | 52 | 30 | 72 | 30     | 72 | 5  | 35 | 59 |
| 26 | <i>Entamoeba sp.</i>                     | 95 | 2  | 92 | 60 | 56 | 60 | 72 | 90     | 72 | 7  | 30 | 60 |
| 27 | <i>E. histolytica</i>                    | 94 | 5  | 94 | 60 | 55 | 90 | 72 | 120    | -  | -  | 35 | 61 |
| 28 | <i>E. histolytica</i>                    | 95 | 10 | 95 | 15 | 63 | 30 | 72 | 30     | -  | -  | 40 | 62 |
| 29 | <i>E. histolytica</i>                    | -  | -  | 95 | 30 | 55 | 30 | 72 | 60     | 72 | 7  | 35 | 63 |
| 30 | <i>E. histolytica</i>                    | 96 | 2  | 92 | 60 | 48 | 60 | 72 | 90     | 72 | 7  | 30 | 64 |

## Análisis

Para las AVL la mayoría de los estudios emplearon 35 ciclos de desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 minutos, desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación 56 °C durante 30 segundos, y elongación a 72 °C durante 60 seg. La extensión final se realizó generalmente a 72 °C durante 5 minutos.

Por otro lado, para las amebas intestinales, las condiciones fueron relativamente similares en la fase de desnaturalización inicial 95°C por 1 minuto, seguidos de 94° C por 60 segundos, hibridación de 52°C durante 30 segundos, elongación a 72°C por 30 seg y la extensión final a 72°C por 7 minutos en 35 ciclos. Algunos artículos incluyeron una fase de conservación.

Estas diferencias en las condiciones del termociclador reflejan la diversidad genética y estructural, en el caso de AVL, las temperaturas de desnaturalización son más altas por sus estructuras ricas en G - C, como *N. fowleri*, en contraste con las amebas intestinales que poseen un genoma menos complejo. En cuanto a la temperatura de hibridación para los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria* varían entre los 55 - 62°C al usar como diana genes ribosomales conservados y el género *Entamoeba* temperaturas de 50 - 55°C al usar genes de virulencia variables. La amplificación de AVL desde muestras ambientales puede requerir tiempos prolongados para asegurar la detección de baja carga parasitaria.

Una extensión final prolongada aseguraría la completa elongación de productos de amplificación largos. La inclusión variable de una fase de conservación (4 - 10°C) en algunos protocolos respondería a diferencias en el manejo posterior de las muestras. Estos parámetros uniformes facilitan la comparabilidad entre estudios para mejorar la especificidad sin comprometer la sensibilidad.

Además, otro factor que determina directamente la temperatura de reacción es el tamaño de los amplicones, para fragmentos más largos (500 - 1000 pb) necesitan una extensión de 1 - 2 min y para amplicones más cortos (200 - 400 pb) una extensión reducida de 30 - 45 seg. También, el tipo de muestras y técnicas de extracción van a influir en el número de ciclos, la presencia de inhibidores en la muestra aumenta los ciclos.

Las diferencias en las condiciones de PCR reflejan adaptaciones biológicas y exigencias diagnósticas, las AVL requieren protocolos que aseguren la amplificación de baja cargas parasitarias y presencia de inhibidores para muestras ambientales complejas, las amebas intestinales demandan sensibilidad para detectar infecciones humanas.

## Discusión

Las condiciones del termociclador son un factor crítico que influye directamente en la eficiencia, especificidad y sensibilidad de la PCR, especialmente en la detección de amebas morfológicamente similares. Los estudios revisados evidencian variabilidad en los parámetros utilizados, aunque se mantienen tendencia a usar la programación estándar.

La mayoría de los protocolos incluyen 35 ciclos con una fase de desnaturalización inicial entre 94 °C y 95 °C durante 2 a 5 minutos, para separar las hebras de ADN. Estos resultados se alinean a las condiciones utilizadas por Wagner et al.<sup>69</sup>, las cuales fueron de 95°C por 5 minutos, seguido de 95°C por 45 segundos en 45 ciclos para la amplificación de *Acanthamoeba* en muestras de suelo, y Ajonina et al.<sup>67</sup> con una temperatura de 94°C por 3 minutos, seguido de 94°C por 30 segundos en 35 ciclos para *E. histolytica*.

La hibridación en los estudios presenta más comúnmente temperaturas de 56 °C durante 30 segundos, sin embargo, se pueden ajustar según las características del protocolo, como lo indican Tokoro et al.<sup>70</sup>, que reportaron una temperatura de 57 °C por 30 segundos para cebadores dirigidos al gen 18S rRNA de *E. histolytica*, mientras que Gabr et al.<sup>68</sup> ajustaron el alineamiento a 60 °C por un minuto para *Acanthamoeba*.

La mayoría de los protocolos utilizaron una temperatura de 72 °C durante 30 – 60 segundos, lo cual es adecuado para productos de hasta 500 pb. Sin embargo, algunos estudios que amplifican fragmentos mayores, como el de Gabr et al.<sup>68</sup>, extienden este paso a 120 segundos, demostrando que este parámetro debe ajustarse en función del tamaño del amplicon. La inclusión de una fase de extensión final a 72 °C durante 5 a 10 minutos se mantiene como práctica común para asegurar la elongación completa de todos los productos amplificados.

La mayoría de los estudios analizados coinciden en que las condiciones del termociclador deben ser adaptadas según las características de los cebadores, el tamaño del amplicón, la complejidad de la muestra y el tipo de PCR. La falta de consenso en los protocolos, particularmente para *Acanthamoeba*, plantea desafíos importantes para la estandarización de protocolo, como plantean Rojas et al.<sup>44</sup>, esta variabilidad podría afectar la sensibilidad diagnóstica entre laboratorios.

Las diferencias observadas reflejan las distintas necesidades diagnósticas. Para *E. histolytica*, el mayor número de ciclos (35 - 40) coincide con las recomendaciones de Sindhusuta et al.<sup>65</sup> para muestras fecales, donde la carga parasitaria puede ser baja. En contraste, los protocolos para *Acanthamoeba* en queratitis (30 - 35 ciclos) priorizan la especificidad sobre la sensibilidad, Memari et al.<sup>43</sup> muestran que utilizar 35 ciclos muestras resultados satisfactorios.

### **Resultados obtenidos en la PCR descritos en la bibliografía**

En la tabla 4, se evaluó la calidad de las bandas obtenidas en geles de agarosa, en una escala cualitativa, se estableció un criterio de calidad visual de las bandas, considerando como “Óptimo” aquellas bandas bien definidas, sin arrastre y de intensidad homogénea; “Bueno” para bandas visibles, pero con ligera variación en la intensidad o presencia de arrastre; “Regular” a las bandas que no estaban bien definidas con arrastre moderado; y “Deficiente” para aquellas bandas poco claras o productos inespecíficos (ver **Anexo 7, 8, 9**)

Además, se reportó la sensibilidad y especificidad de los estudios, aunque no se reportó de forma cuantitativa en muchos estudios, varios autores validaron los resultados de PCR mediante el límite inferior de detección (LOD) y la secuenciación del producto amplificado, mostrando identidades del 99 - 100 % con secuencias de referencia depositadas en GenBank, respaldando la identificación de especies como *Entamoeba*, *Naegleria* o *Acanthamoeba*, así también, los porcentajes de muestras amplificadas como positivas permiten determinar la prevalencia y la utilidad de los estudios.

**Tabla 3.** Resultados obtenidos en la amplificación por PCR en la literatura

| Nº | Especie                                                                   | Calidad de banda | Arrastre de bandas | Especificidad               | Sensibilidad              | Referencia |
|----|---------------------------------------------------------------------------|------------------|--------------------|-----------------------------|---------------------------|------------|
| 01 | <i>Acanthamoeba sp.</i><br><i>B. mandrillaris</i><br><i>Naegleria sp.</i> | Óptimo           | Ausente            |                             | LOD: 10 células/ reacción | 35         |
| 02 | <i>Acanthamoeba sp.</i><br><i>Naegleria sp.</i>                           | Bueno            | Presente           |                             |                           | 36         |
| 03 | <i>N. fowleri</i>                                                         | Óptimo           | Ausente            | Homología del 99%           | -                         | 37         |
| 04 | <i>Acanthamoeba sp.</i><br><i>Naegleria sp.</i>                           | Óptimo           | Ausente            | Homología del 95-100%       |                           | 38         |
| 05 | <i>Acanthamoeba sp.</i>                                                   | Bueno            | Presente           | 100%                        | 73,3 - 80%                | 39         |
| 06 | <i>Acanthamoeba sp.</i>                                                   | Óptimo           | Ausente            |                             |                           | 40         |
| 07 | <i>Acanthamoeba sp.</i>                                                   | Bueno            | Presente           | Homología del 99-100%       |                           | 41         |
| 08 | <i>Acanthamoeba sp.</i><br><i>Naegleria sp.</i>                           | Óptimo           | Ausente            | Identidad nucleotídica 100% |                           | 42         |
| 09 | <i>Acanthamoeba sp.</i>                                                   | Óptimo           | Ausente            |                             |                           | 43         |
| 10 | <i>Acanthamoeba sp.</i>                                                   | Bueno            | Presente           | Identidad nucleotídica >85% |                           | 44         |
| 11 | <i>N. fowleri</i><br><i>Acanthamoeba sp.</i>                              | Bueno            | Presente           |                             |                           | 45         |
| 12 | <i>N. fowleri.</i>                                                        | Regular          | Presente           |                             | LOD: 1 copia/μL           | 46         |
| 13 | <i>Acanthamoeba sp.</i>                                                   | Bueno            | Presente           | Homología del 95-100%       |                           | 47         |
| 14 | <i>Acanthamoeba sp.</i>                                                   | Óptimo           | Ausente            |                             |                           | 48         |
| 15 | <i>Acanthamoeba sp.</i><br><i>Naegleria sp.</i>                           | Bueno            | Moderado           |                             |                           | 49         |
| 16 | <i>Acanthamoeba sp.</i>                                                   | Óptimo           | Ausente            | Homología del 98-100%       |                           | 50         |
| 17 | <i>Acanthamoeba sp.</i>                                                   | Bueno            | Presente           | Homología del 99-100%       |                           | 51         |
| 18 | <i>Acanthamoeba sp.</i>                                                   | Óptimo           | Ausente            | M6 88%<br>M3 97%            | M6 86%<br>M3 96%          | 52         |

|    |                       |         | M1 41-56% | M1 32-50%                     |    |
|----|-----------------------|---------|-----------|-------------------------------|----|
| 19 | <i>N. fowleri</i>     | Óptimo  | Ausente   | LOD: 1 trofozoíto/ 200 ml LCR | 53 |
| 20 | <i>Entamoeba sp.</i>  | Óptimo  | Ausente   | Homología del 99.7%           | 54 |
| 21 | <i>Entamoeba sp.</i>  | Óptimo  | Ausente   |                               | 55 |
| 22 | <i>Entamoeba sp.</i>  | Óptimo  | Ausente   |                               | 56 |
| 23 | <i>Entamoeba sp.</i>  | Óptimo  | Ausente   | 100%                          | 57 |
| 24 | <i>Entamoeba sp.</i>  | Bueno   | Presente  |                               | 58 |
| 25 | <i>Entamoeba sp.</i>  | Bueno   | Presente  |                               | 59 |
| 26 | <i>Entamoeba sp.</i>  | Regular | Moderado  | 80%                           | 60 |
| 27 | <i>E. histolytica</i> | Óptimo  | Ausente   | 86,36%                        | 61 |
| 28 | <i>E. histolytica</i> | Óptimo  | Ausente   | 100%                          | 62 |
| 29 | <i>E. histolytica</i> | Bueno   | Presente  | Homología del 98-100%         | 63 |
| 30 | <i>E. histolytica</i> | Óptimo  | Ausente   | LOD 0,0651 ng/μl              | 64 |

LOD: límite inferior de detección

## Análisis

La evaluación cualitativa de los geles mediante el sistema de clasificación como Óptimo, Bueno, Regular, Deficiente, permite inferir importantes aspectos técnicos y metodológicos. Un 56,66% de los estudios (17 artículos) mostraron bandas óptimas, un 36,67% (11 artículos) tuvieron buenos resultados, un 6,67% (2 artículos) tuvieron resultados regulares y no se reportaron resultados deficientes, lo que sugiere que existen diferencias significativas en la optimización de los protocolos de PCR para estas amebas.

El arrastre de bandas o manchas difusas en las bandas en el gel de agarosa (smear), es un patrón de bandas de ADN poco definidas, con una dispersión de material genético que forma una especie de fondo continuo entre las bandas. De los artículos revisados, 11 muestran presencia de arrastre de bandas y 2 muestran una cantidad moderada, sin embargo, en la mayoría de los artículos no se describe smear o arrastre.

La variabilidad en la calidad de las bandas podría atribuirse factores técnicos en la PCR como falta de optimización de las condiciones de amplificación como temperatura de hibridación, concentración de  $MgCl_2$ ; degradación del ADN en muestras ambientales o clínicas mal preservadas y la presencia de inhibidores. También influirían factores en la electroforesis, como una concentración inadecuada del gel de agarosa, sobrecarga de los pocillos con producto, tiempo de corrida electroforética no optimizado, etc.

Trabajos que reportaron bandas "óptimas" en los geles de agarosa, como para la identificación de AVL por Gabriel et al.<sup>35</sup>, utilizaron Taq polimerasa (1 U), concentraciones de  $MgCl_2$  de 4,0 mM, y dNTPs de 2 mM. En cambio, para la identificación de *E. histolytica*, Bairami et al.<sup>61</sup> utiliza 1U de Taq polimerasa, 1,5 mM de  $MgCl_2$  y 200  $\mu M$  (0,2 mM) de dNTPs. Al comparar ambos resultados, parece que el protocolo para *E. histolytica* está más optimizado, sin embargo, esto podría deberse a que para *E. histolytica* existen cebadores más específicos, muestras clínicas con menos inhibidores y la diferencia entre el genoma de estas amebas.

De igual forma, los estudios que reportaron bandas consideradas como "regulares" también presentaron variaciones importantes en la concentración de  $MgCl_2$ , ya sea por debajo del

rango óptimo (como 1,5 mM), o por encima de lo recomendado (>4,0 mM). Una situación particular se observó en el estudio de Soares et al.<sup>60</sup>, el cual reporta el uso de 25 mM de MgCl<sub>2</sub> y 5 mM de cada dNTPs, siendo valores muy alejados del estándar para una PCR, lo cual sugiere que podría tratarse de un error en la forma de reportar los datos, posiblemente confundiendo la concentración del stock con la concentración final utilizada en la mezcla de reacción, ya que no se reporta una concentración final utilizada de dichos reactivos.

La inclusión de estos datos en el análisis requiere un enfoque crítico, ya que su valor informativo puede ser limitado si no se especifican claramente las condiciones experimentales, considerando que, concentraciones tan elevadas de MgCl<sub>2</sub> y dNTPs podrían afectar negativamente la especificidad y eficiencia de la reacción, este tipo de inconsistencias deben interpretarse con cautela, y subrayan la necesidad de una descripción precisa y estandarizada de los parámetros experimentales en los estudios científicos.

En cuanto a la comparación de los parámetros del termociclador que influyen en la sensibilidad de la PCR se puede ver en la diferencia entre Gabriel et al.<sup>35</sup> que logró un límite de detección bajo (10 células por reacción) probablemente a la combinación de un mayor número de ciclos (40), temperaturas de hibridación más bajas (50–56 °C), y tiempos de extensión cortos, que reducen la amplificación inespecífica, y el protocolo de Regoudis et al.<sup>46</sup>, con 35 ciclos y condiciones de hibridación a 58 °C y extensión de 72°C por 60 segundos, si bien es técnicamente adecuado, podría no haber sido lo suficientemente sensible para detectar cantidades mínimas de ADN en muestras con baja concentración de ADN.

En cuanto a sensibilidad técnica, solo cuatro estudios proporcionaron valores cuantitativos de LOD (Límite de Detección), como Gabriel et al.<sup>35</sup> reportaron un LOD de 10 células para *Acanthamoeba sp.*, Regoudis et al.<sup>46</sup> alcanzaron una sensibilidad de 1 copia/μL y Mahittikorn, et al.<sup>53</sup> un LOD de 1 trofozoíto por 200 ml de LCR ambos para *N. fowleri*, por último, Prem, et al.<sup>63</sup> un LOD de 0,0651 ng de ADN por μl de *E. histolytica*.

En el caso de la especificidad, los estudios que reportaron homologías del 95 - 100% con secuencias de GenBank confirmaron la alta precisión de sus cebadores, un total de 10 artículos (33,33%) muestran una alta homología o fidelidad de la identidad de nucleótidos,

lo que indica que los productos amplificados corresponden al blanco deseado, minimizando la amplificación de secuencias no deseadas o inespecíficas.

Los protocolos que confirmaron homología  $\geq 95\%$  con secuencias de GenBank, como los de Panda et al.<sup>37</sup> y Golestani et al.<sup>47</sup>, se caracterizaron por usar cebadores diseñados con herramientas bioinformáticas especializadas, controles rigurosos de contaminación y emplear volúmenes de reacción pequeños (20-25  $\mu$ l) para reducir variabilidad.

En contraste, existen artículos que reportan el porcentaje de sensibilidad y especificidad diagnóstica de la técnica de PCR, fueron 6 artículos reportaron una sensibilidad en porcentaje, que varía entre 70-100%. Sin embargo, la mayoría de los trabajos no incluyeron este parámetro, limitando la comparación directa entre métodos.

Estos hallazgos demuestran la necesidad de estandarizar las condiciones experimentales en futuras investigaciones sobre PCR aplicada a amebas, la implementación de estas buenas prácticas permitiría comparar los resultados de diversos estudios y también aumentaría la fiabilidad diagnóstica de las técnicas moleculares.

## **Discusión**

Los resultados reportados por diversos autores revelan diferencias que afectan en la eficacia de la PCR para la identificación de amebas, las cuales están directamente relacionadas con la composición del Máster Mix (ej. tipo de polimerasa utilizada), condiciones de termociclado y la calidad del ADN extraído.

Por ejemplo, el estudio de Das et al., reportó una sensibilidad del 98,36% y especificidad del 100%, utilizando 1,5 U Taq pol, 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 0,28 mM de cada dNTPs, 0,3  $\mu$ M de cada primer y 1X de buffer, condiciones de temperatura de desnaturalización de 96°C por 60 seg, hibridación de 56°C por 60 seg y extensión de 72°C para la amplificación del gen 16S rRNA en muestras fecales para la diferenciación de especies de *Entamoeba* utilizando una PCR anidada<sup>65</sup>. Estos resultados se alinean con lo reportado por Prem et al., que utiliza concentraciones de 1X de buffer, 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 0,2 mM de dNTPs, 1,5 U de Taq pol y 0,6  $\mu$ M de cada primer, en muestras fecales del gen 16S rRNA<sup>63</sup>.

En la detección de *Acanthamoeba* sp. en muestras de agua, Abdul et al.<sup>71</sup> utilizaron una mezcla de PCR con buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTPs 200 µM, primers a 200 nM y 5 ng de ADN, aplicando 40 ciclos con tiempos estándar. En cambio, Degerli et al.<sup>36</sup> emplearon concentraciones más altas de dNTPs (300 µM) y MgCl<sub>2</sub> (3 mM), menor cantidad de ADN (2 ng/µL), 4 pmol de cada primer y un protocolo más rápido, pero con 45 ciclos. Estas diferencias pueden atribuirse a la optimización según el tipo y calidad de las muestras, buscando mayor sensibilidad o eficiencia, un mayor número de ciclos y concentraciones ajustadas podrían compensar una menor cantidad de ADN o inhibidores presentes.

En la detección de *N. fowleri*, Abdul et al.<sup>71</sup>, amplificaron la región ITS utilizando concentraciones similares a las usadas para *Acanthamoeba* y un protocolo con 30 ciclos, con desnaturalización inicial a 94 °C por 6 min, 94 °C por 1 min, 55 °C por 1,5 mins, 72 °C por 2 mins y 72 °C por 10 min. En contraste, el estudio de Panda et al.<sup>37</sup> empleó concentraciones ligeramente diferentes: 0,24 mM de dNTPs, 0,4 µM de cada primer y 1–2 ng/µL de ADN molde, aunque las temperaturas del termociclado fueron similares, los tiempos de cada fase fueron más cortos. Ambos métodos apuntan al mismo blanco molecular, pero optimizan sus condiciones según las necesidades del experimento.

Las variaciones en la calidad de las bandas pueden atribuirse a múltiples factores, siendo la composición del Máster mix uno de los más críticos. Los estudios que reportaron bandas óptimas utilizaron concentraciones de MgCl<sub>2</sub> de 2,0-3,0 mM y 200-250 µM por cada dNTP fueron las más efectivas, concentraciones menores resultaron en bandas débiles y mayores aumentaron el riesgo de incorporación errónea.

Es notable que incluso estudios con bandas clasificadas como regulares 6,67% (2 artículos) lograron un LOD bajo y porcentajes de especificidad y sensibilidad mayores al 80%. Esto sugiere que el criterio visual podría no ser el único parámetro por el cual se deba evaluar la utilidad diagnóstica, también hay que considerar que la secuenciación sigue siendo el “Gold standard” para confirmación y que las bandas con arrastre moderado pueden aún contener producto específico amplificado.

Las limitaciones de esta revisión incluyen la heterogeneidad en los reportes y la falta de estandarización en la presentación de resultados, muchas investigaciones omitieron detalles

críticos como la concentración exacta de reactivos, dificultando la comparación directa entre protocolos. Esta observación refuerza la necesidad de adoptar guías estandarizadas para la publicación de estudios moleculares en parasitología.

Los resultados de esta revisión bibliográfica revelan aspectos críticos en la aplicación de la PCR para la identificación de amebas, destacando la relación entre los componentes técnicos del protocolo y la calidad de los resultados obtenidos. La evidencia analizada sugiere que la variabilidad en los reportes de sensibilidad y especificidad no solo depende de las características biológicas de las amebas estudiadas, sino fundamentalmente de las decisiones metodológicas adoptadas en cada investigación.

## CAPITULO V. CONCLUSIONES

La PCR se ha consolidado como el método de referencia para la identificación de amebas, su eficacia depende de una adecuada selección de reactivos, parámetros de amplificación optimizados y una confirmación precisa de los resultados. Esta revisión se centró en el análisis comparativo de diversos protocolos para diferentes especies de amebas, con el objetivo de identificar diferencias en las técnicas reportadas, también, se evidenció que, a pesar de la variabilidad en los métodos, existe un desempeño adecuado. El análisis permite ofrecer una síntesis de las condiciones comúnmente empleadas, aportando una guía práctica para su aplicación en contextos de investigación y diagnóstico.

Se evidenció que la mayoría de los protocolos revisados para la identificación de amebas mediante PCR emplean concentraciones de reactivos que se alinean con los estándares comúnmente aceptados para una PCR, usando tampones, dNTPs, primers, Taq polimerasa,  $MgCl_2$  y ADN molde en proporciones que favorecen una amplificación eficiente. Sin embargo, persisten variaciones entre estudios, por las diferentes condiciones que deben ajustarse a la secuencia diana, tipo de muestra, extracción de ADN, entre otros factores, por lo tanto, se refleja la ausencia de un protocolo universalmente estandarizado para cada especie de ameba.

Otra parte importante con notables variaciones en los reportes son los parámetros de amplificación del termociclador, si bien la mayoría de los protocolos siguen un patrón general con las fases clásicas de desnaturalización, hibridación y extensión, todas dentro de rangos considerados óptimos, se observaron diferencias importantes en los tiempos y temperaturas específicos aplicados en cada etapa. Estas variaciones suelen estar relacionadas con factores como la composición genética de la especie, contenido de bases G-C y la complejidad de la región diana, pudiendo afectar directamente en la eficiencia y especificidad de la amplificación, requiriendo ajustes para optimizar los resultados.

Aunque se observó que muy pocos estudios reportan de manera explícita los valores de sensibilidad y especificidad de sus protocolos, en varios casos fue posible inferir un buen desempeño diagnóstico a partir de resultados validados mediante técnicas de secuenciación.

Sin embargo, la evaluación cualitativa de los geles de agarosa mediante un sistema de clasificación permitió inferir aspectos técnicos y metodológicos relevantes: un 56,66% de los estudios mostraron bandas óptimas, un 36,67% reportaron resultados buenos, un 6,67% un nivel regular y no se documentaron resultados deficientes. Estos hallazgos sugieren que, si bien la mayoría de los protocolos permiten obtener productos de amplificación claros y definidos, aún existen variaciones significativas entre estudios, principalmente por la optimización de reactivos y condiciones de termociclado.

En definitiva, esta investigación demostró que la obtención de resultados óptimos en la PCR para la detección de amebas patógenas, en términos de sensibilidad y especificidad, está sujeta a una significativa variabilidad en los protocolos. La evidencia recopilada indica que no existe una condición universal, por lo tanto, la optimización mediante pruebas de ensayo y error es fundamental para determinar las concentraciones de reactivos en el Máster Mix y los parámetros del termociclador que garanticen la confiabilidad de los resultados en cada contexto experimental específico.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Becerril MA. Parasitología médica [Internet]. Sexta edic. Mexico: McGraw-Hill Interamericana; 2023. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookid=3370>
2. Botero D, Restrepo M. Parasitosis humanas. Sexta edic. Medellín - Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2019. 676 p.
3. Nasrallah J, Akhoundi M, Haouchine D, Marteau A, Mantelet S, Wind P, et al. Updates on the worldwide burden of amoebiasis: A case series and literature review. J Infect Public Health [Internet]. 2022;15(10):1134–41. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2022.08.013>
4. Servián A, Helman E, Iglesias M, Panti J, Zonta M, Navone G. Prevalence of Human Intestinal Entamoeba sp. in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis, 1990–2022. Pathogens [Internet]. 2022;11(11). Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9699389/>
5. Aguaiza M, Piñero M, Contreras J, Quintero A. Prevalencia de parasitosis intestinal, condiciones socio-sanitarias y estado nutricional de niños indígenas del Ecuador. Kasma [Internet]. 2022;50. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/360167172\\_Prevalencia\\_de\\_parasitosis\\_intestinal\\_condiciones\\_socio-sanitarias\\_y\\_estado\\_nutricional\\_de\\_ninos\\_indigenas\\_del\\_Ecuador](https://www.researchgate.net/publication/360167172_Prevalencia_de_parasitosis_intestinal_condiciones_socio-sanitarias_y_estado_nutricional_de_ninos_indigenas_del_Ecuador)
6. Escobar S, Cando V, Sánchez H, Buenaño Y, Lamiña J, Lamiña B, et al. Prevalencia de parasitosis y su influencia en la microbiota intestinal de niños escolares de comunidades rurales de la provincia de Chimborazo, Ecuador. Salud, Cienc y Tecnología [Internet]. 2023;3(636). Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/381564717\\_Prevalence\\_of\\_parasitosis\\_and\\_its\\_influence\\_on\\_the\\_intestinal\\_microbiota\\_of\\_school\\_children\\_from\\_rural\\_communities\\_in\\_the\\_province\\_of\\_Chimborazo\\_Ecuador](https://www.researchgate.net/publication/381564717_Prevalence_of_parasitosis_and_its_influence_on_the_intestinal_microbiota_of_school_children_from_rural_communities_in_the_province_of_Chimborazo_Ecuador)
7. Cabello A. Naegleria fowleri en Centro y Sudamérica: ¿La ameba come-cerebro está en el Perú? Rev del Cuerpo Médico Hosp Nac Almanzor Aguinaga Asenjo [Internet]. 2023;16(2). Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2227-47312023000200009](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2227-47312023000200009)

8. Asamblea Nacional del Ecuador. CONSTITUCIÓN DE LA REPÚBLICA DEL ECUADOR [Internet]. Registro Oficial 449 Ecuador; 2008. Disponible en: [https://www.defensa.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2021/02/Constitucion-de-la-Republica-del-Ecuador\\_act\\_ene-2021.pdf](https://www.defensa.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2021/02/Constitucion-de-la-Republica-del-Ecuador_act_ene-2021.pdf)
9. Kadri K. Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. In: Nagpal M, editor. Synthetic Biology [Internet]. IntechOpen; 2020. Disponible en: <https://www.intechopen.com/chapters/67558>
10. Asamblea Nacional del Ecuador. Ley Orgánica de Salud [Internet]. Registro Oficial Suplemento 423 Ecuador; 2006. Disponible en: <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2017/03/LEY-ORGÁNICA-DE-SALUD4.pdf>
11. Shi Y, Queller D, Tian Y, Zhang S, Yan Q, He Z, et al. The Ecology and Evolution of Amoeba-Bacterium Interactions. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2021;87(2). Disponible en: <https://doi.org/10.1128/AEM.01866-20>
12. Guillén N. Pathogenicity and virulence of *Entamoeba histolytica*, the agent of amoebiasis. *Virulence* [Internet]. 2023;14(1). Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9815260/>
13. Uribe E, Rosales C. Immune Response to the Enteric Parasite *Entamoeba histolytica*. *Am Physiological Soc* [Internet]. 2020;35(4):244–60. Disponible en: [https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physiol.00038.2019?rfr\\_dat=cr\\_pub++0pubmed&url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org](https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physiol.00038.2019?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org)
14. Rosales C. Neutrophils vs. amoebas: Immunity against the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2021;110(6):1241–1252. Disponible en: <https://academic.oup.com/jleukbio/article/110/6/1241/6884659?login=false>
15. Fage S. Genetic Variability of *Entamoeba histolytica* Strains. *Genet Divers* [Internet]. 2022; Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.106828>
16. Morán P, Serrano A, Rojas L, González E, Pérez H, Hernández E, et al. Amoebiasis: Advances in Diagnosis, Treatment, Immunology Features and the Interaction with the Intestinal Ecosystem. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023;24(14). Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10380210/>

17. Erazo L, Roca H, Castro A. Parasitosis intestinal y alteraciones hematológicas: características clínicas, sociodemográficas y epidemiológicas. *MQRInvestigar* [Internet]. 2023;7(3):1723–1246. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/372629769\\_Parasitosis\\_intestinal\\_y\\_alteraciones\\_hematologicas\\_caracteristicas\\_clinicas\\_sociodemograficas\\_y\\_epidemiologicas](https://www.researchgate.net/publication/372629769_Parasitosis_intestinal_y_alteraciones_hematologicas_caracteristicas_clinicas_sociodemograficas_y_epidemiologicas)
18. Kofman A, Guarner J. Infections Caused by Free-Living Amoebae. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2022;60(1). Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8769735/>
19. Zhang H, Cheng X. Various brain-eating amoebae: the protozoa, the pathogenesis, and the disease. *Front Med* [Internet]. 2021;15:842–66. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11684-021-0865-2>
20. Sandeep J, Park S, Kelley A, Roy S, Cope J, Karim I, et al. Comparative Genomic and Transcriptomic Analysis of *Naegleria fowleri* Clinical and Environmental Isolates. *Am Soc Microbiol* [Internet]. 2021;6(4). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/org/science/article/pii/S2379504221001338>
21. Aurongzeb M, Rashid Y, Naqvi SHA, Malik HMT, Azim MK, Hassan SS, et al. Insights into genome evolution, pan-genome, and phylogenetic implication through mitochondrial genome sequence of *Naegleria fowleri* species. *Sci Rep* [Internet]. 2022;12(13152). Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-17006-4>
22. Ridwane M, Ahmed N, Maciver S, Siddiqui R. Opportunistic free-living amoebal pathogens. *Pathog Glob Health* [Internet]. 2021;116(2):70–84. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8933017/#s0006>
23. Haston J, Cope J. Amebic encephalitis and meningoencephalitis: an update on epidemiology, diagnostic methods, and treatment. *Curr Opin Infect Dis* [Internet]. 2024;36(3):186–191. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10798061/>
24. Yiu C, Nivesvivat T, Xiong Q, Kulkeaw K, Shi L, Ruenchit P, et al. Mitochondrial genome diversity of *Balamuthia mandrillaris* revealed by a fatal case of granulomatous amoebic encephalitis. *Front Microbiol* [Internet]. 2023;14. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1162963>

25. Król-Turmińska K, Olender A. Human infections caused by free-living amoebae. *Ann Agric Environ Med* [Internet]. 2017;24(2). Disponible en: <https://www.aaem.pl/Human-infections-caused-by-free-living-amoebae,72498,0,2.html>
26. Sharma C, Khurana S, Arora A, Bhatia A, Gupta A. An Insight into the Genome of Pathogenic and Non-Pathogenic *Acanthamoeba*. *Pathogens* [Internet]. 2022;11(12). Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9783929/#B10-pathogens-11-01558>
27. Zhang Y, Xu X, Wei Z, Cao K, Zhang Z, Liang Q. The global epidemiology and clinical diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *J Infect Public Health* [Internet]. 2023;16(5). Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/369474620\\_The\\_global\\_epidemiology\\_and\\_clinical\\_diagnosis\\_of\\_Acanthamoeba\\_keratitis](https://www.researchgate.net/publication/369474620_The_global_epidemiology_and_clinical_diagnosis_of_Acanthamoeba_keratitis)
28. Shahzad S, Afzal M, Sikandar S, Afzal I. Polymerase Chain Reaction. In: *Genetic Engineering - A Glimpse of Techniques and Applications* [Internet]. IntechOpen; 2020. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/342122631\\_Polymerase\\_Chain\\_Reaction](https://www.researchgate.net/publication/342122631_Polymerase_Chain_Reaction)
29. Mubarak S, Al-Koofee D, Radhi O, Mohammed J, Al-Zubaidi Z. An Optimization and Common Troubleshooting Solving in Polymerase Chain Reaction Technique. *Syst Rev Pharm*. 2020;11(2):427–36.
30. Sharma M. Basic concepts of primer desingning: a minireview. *Int J Latest Trends Eng Technol* [Internet]. 2021;17(4):10–2. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/353304868\\_BASIC\\_CONCEPTS\\_OF\\_PRIMER\\_DESIGNING\\_A\\_MINIREVIEW](https://www.researchgate.net/publication/353304868_BASIC_CONCEPTS_OF_PRIMER_DESIGNING_A_MINIREVIEW)
31. Khalil MI. Different types of PCR. *Glob Sci J* [Internet]. 9AD;2(2021). Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/349502871\\_Different\\_types\\_of\\_PCR\\_A\\_review\\_paper](https://www.researchgate.net/publication/349502871_Different_types_of_PCR_A_review_paper)
32. Benavides C, Plúa A, Vera K, Lucas E. Reacción en cadena de la polimerasa: variabilidad en técnicas y métodos diagnósticos para covid -19. *MQRInvestigar* [Internet]. 2023;7(1):231–47. Disponible en: <https://doi.org/10.56048/MQR20225.7.1.2023.231-247>

33. Calle G, Jiménez J, Vivas D. Molecular diagnosis of amoebiasis. *Bol Med Hosp Infant Mex* [Internet]. 2021;79(1):3–16. Disponible en: [https://www.bmhim.com/frame\\_esp.php?id=290](https://www.bmhim.com/frame_esp.php?id=290)
34. Saidin S, Othman N, Noordin R. Update on laboratory diagnosis of amoebiasis. *Eur J Clin Microbiol Infectious Dis* [Internet]. 2019;38:15–38. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3379-3>
35. Gabriel S, Khan NA, Siddiqui R. Occurrence of free-living amoebae (*Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Naegleria*) in water samples in Peninsular Malaysia. *J Water Health* [Internet]. 2019;17(1):160–71. Disponible en: <https://doi.org/10.2166/wh.2018.164>
36. Değerli S, Değerli N, Çamur D, Doğan Ö, İlter H. Genotyping by Sequencing of *Acanthamoeba* and *Naegleria* Isolates from the Thermal Pool Distributed Throughout Turkey. *Acta Parasitol* [Internet]. 2019;65:174–86. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.2478/s11686-019-00148-3>
37. Panda A, Khalil S, Mirdha BR, Singh Y, Kaushik S. Prevalence of *naegleria fowleri* in environmental samples from northern part of India. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(10):1–14. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0137736>
38. Feiz MH, Khoshnood S, Mahmoudi MR, Habibpour H, Ali SA, Mirzaei H, et al. Molecular identification of free-living amoebae (*Naegleria* sp., *acanthamoeba* sp. and *vermamoeba* sp.) isolated from unimproved hot springs, Guilan Province, Northern Iran. *Iran J Parasitol* [Internet]. 2019;14(4):584–91. Disponible en: <https://ijpa.tums.ac.ir/index.php/ijpa/article/view/2284>
39. Yera H, Ok V, Kuet FLK, Dahane N, Arieu F, Hasseine L, et al. PCR and culture for diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *Lab Sci* [Internet]. 2020;105(9). Disponible en: <https://bjo.bmj.com/content/105/9/1302.long>
40. Rayamajhee B, Sharma S, Willcox M, Henriquez FL, Rajagopal RN, Shrestha GS, et al. Assessment of genotypes, endosymbionts and clinical characteristics of *Acanthamoeba* recovered from ocular infection. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2022;22(1):1–14. Disponible en: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-022-07741-4>
41. Poor BM, Dalimi A, Ghafarifar F, Khoshzaban F, Abdolalizadeh J. Contamination of swimming pools and hot tubs biofilms with *Acanthamoeba*.

- Acta Parasitol [Internet]. 2018;63(1):147–53. Disponible en: <https://www.degruyterbrill.com/document/doi/10.1515/ap-2018-0016/html>
42. Al-Herrawy A, Khalil MI, El-sherif SS, Omar FAE, Lotfy WM. Surveillance and Molecular Identification of Acanthamoeba and Naegleria Species in Two Swimming Pools in Alexandria University, Egypt. Iran Soc Parasitol [Internet]. 2017;12(2):196–205. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5527029/>
  43. Memari F, Niyyati M, Haghighi A, Seyyed Tabaei SJ, Lasjerdi Z. Occurrence of pathogenic Acanthamoeba genotypes in nasal swabs of cancer patients in Iran. Parasitol Res [Internet]. 2015;114(5):1907–12. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-015-4378-2>
  44. Rojas M del C, Rodríguez Fermepín M, Gracia Martínez F, Costamagna SR. Presence of Acanthamoeba sp. in watering trough in La Pampa province, Argentina. Rev Argent Microbiol [Internet]. 2017;49(3):227–34. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2016.12.003>
  45. Tiewcharoen S, Junnu V, Roongruangchai K, Angkanasinsiri A, Rabablert J. Molecular identification of naegleria fowleri and pathogenic acanthamoeba sp. In chao phraya river and canals around siriraj hospital, Thailand. J Med Assoc Thail [Internet]. 2018;101(10):1303–9. Disponible en: [http://www.jmatonline.com/PDF/1303-9\\_8447.pdf](http://www.jmatonline.com/PDF/1303-9_8447.pdf)
  46. Régoudis E, Pélandakis M. Detection of the free living amoeba Naegleria fowleri by using conventional and real-time PCR based on a single copy DNA sequence. Exp Parasitol [Internet]. 2016;161:35–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2015.12.007>
  47. Golestani MH, Rasti S, Hooshyar H, Delavari M, Mousavi SGA, Iranshahi L, et al. Molecular identification and genotyping of acanthamoeba isolated from environmental sources in Kashan, central Iran. Jundishapur J Microbiol [Internet]. 2018;11(4):7–11. Disponible en: <https://brieflands.com/articles/jjm-55582.html>
  48. Khurana S, Biswal M, Kaur H, Malhotra P, Arora P, Megha K, et al. Free living amoebae in water sources of critical units in a tertiary care hospital in India. Indian J Med Microbiol [Internet]. 2015;33(3):343–8. Disponible en: <https://doi.org/10.4103/0255-0857.158543>

49. Hernández CC, Saénz-Montoya G, Alvarado-Soto S, Carrillo-Méndez JD, Soto-Padilla MY, Otero-Ruiz A, et al. Identificación de *Naegleria* sp. y *Acanthamoeba* sp. en agua de fuentes de Ciudad Juárez, Chihuahua. *Rev Latinoam Recur Nat* [Internet]. 2019;15(3):88–96. Disponible en: <https://revista.itson.edu.mx/index.php/rlrn/article/view/284>
50. Karimi A, Kheirandish F, Javadi Mamaghani A, Taghipour N, Mousavi SF, Aghajani A, et al. Identification and genotyping of *Acanthamoeba* sp. in the water resources of western Iran. *Parasite Epidemiol Control* [Internet]. 2023;22(June 2022):e00308. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2023.e00308>
51. Behera HS, Satpathy G, Tripathi M. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* sp. from *Acanthamoeba* meningitis/ meningoencephalitis (AME) patients in India. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2016;9(1):4–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1729-5>
52. Hsu TK, Chen JS, Tsai HC, Tao CW, Yang YY, Tseng YC, et al. Efficient nested-PCR-based method development for detection and genotype identification of *Acanthamoeba* from a small volume of aquatic environmental sample. *Sci Rep* [Internet]. 2021;11(1):1–13. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00968-2>
53. Mahittikorn A, Mori H, Popruk S, Roobthaisong A, Sutthikornchai C, Koompaong K, et al. Development of a rapid, simple method for detecting *Naegleria fowleri* visually in water samples by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *PLoS One* [Internet]. 2015;10(3):1–15. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4379150/>
54. Fage SA, Bakr HM. Molecular Identification and Prevalence of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* and *Entamoeba moshkovskii* in Erbil City, Northern Iraq. *Polish J Microbiol* [Internet]. 2020;69(3):263–72. Disponible en: <https://doi.org/10.33073/pjm-2020-028>
55. Hassan M, Khazaal RM, Kadhim MK, Hussein KR, Alhamadani FAB. The epidemiology of amoebiasis in Thi-Qar Province, Iraq (2015-2020): Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* using nested and real-time polymerase chain reaction. *Epidemiol Health* [Internet]. 2021;43:1–7. Disponible en: <https://e-epih.org/journal/view.php?doi=10.4178/epih.e2021034>

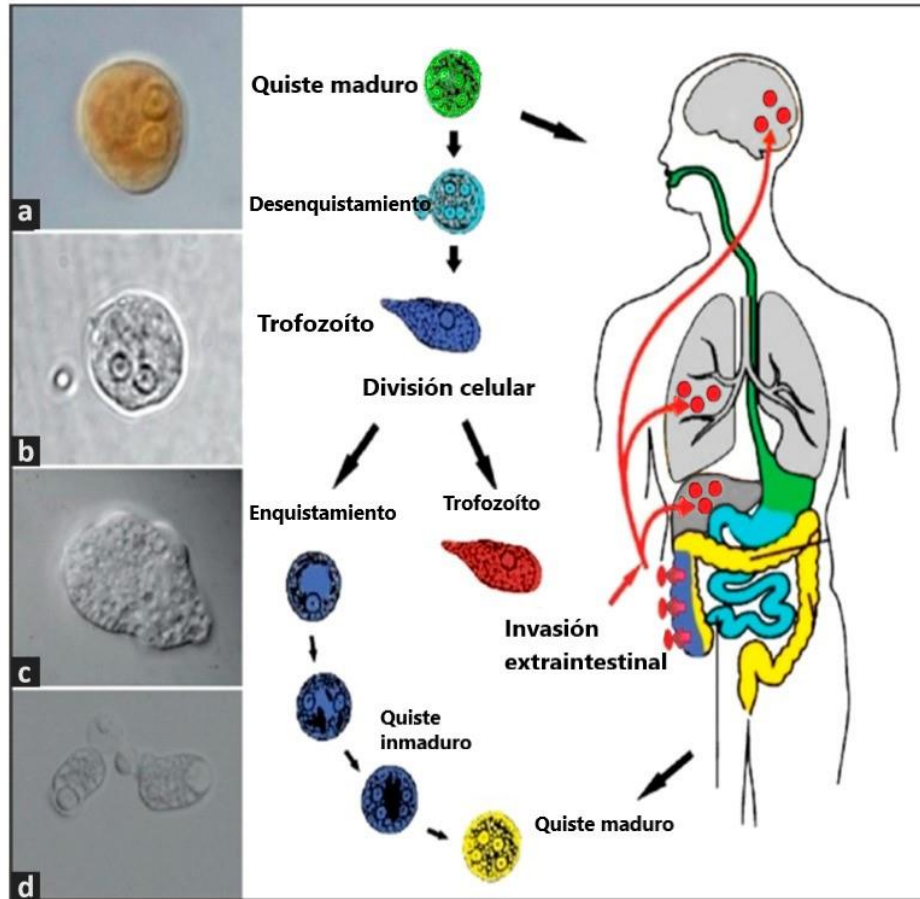
56. Rivero Z, Villarreal L, Bracho A, Prieto C, Villalobos R. Molecular identification of *Entamoeba histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii* in children with diarrhea from Maracaibo, Venezuela. *Biomedica* [Internet]. 2021;41(Supplement 1):1–28. Disponible en: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/5584>
57. López P, Martínez López MC, Boldo León XM, Hernández Díaz Y, González Castro TB, Tovilla Zárate CA, et al. Detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in clinical samples through PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Brazilian J Med Biol Res* [Internet]. 2017;50(4):1–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20175997>
58. Chihi A, Stensvold CR, Ben-Abda I, Ben-Romdhane R, Aoun K, Siala E, et al. Development and evaluation of molecular tools for detecting and differentiating intestinal amoebae in healthy individuals. *Parasitology* [Internet]. 2018;146(6):821–7. Disponible en: <https://doi.org/10.1017/S0031182018002196>
59. Hasan HK, Mohammed AB, Mero WMS. Detection and molecular identification of *Entamoeba* species in faecal samples from Duhok province, Kurdistan Region, Iraq. *Ann Parasitol* [Internet]. 2024;70(2):91–101. Disponible en: <https://annals-parasitology.eu/index.php/AoP/article/view/49/63>
60. Soares NM, Azevedo HC, Pacheco FTF, De Souza JN, Del-Rei RP, Teixeira MCA, et al. A Cross-Sectional Study of *Entamoeba histolytica*/*dispar*/*moshkovskii* Complex in Salvador, Bahia, Brazil. *Biomed Res Int* [Internet]. 2019;2019(1). Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2019/7523670>
61. Bairami A, Rezaei S, Rezaeian M. Synchronous identification of *entamoeba histolytica*, *giardia intestinalis*, and *Cryptosporidium* sp. In stool samples using a multiplex PCR assay. *Iran J Parasitol* [Internet]. 2018;13(1):24–30. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6019599/>
62. Aguayo S, Castillo Fimbres R, Quihui Cota L, Calderón AM. Use of real-time polymerase chain reaction to identify *Entamoeba histolytica* in schoolchildren from northwest Mexico. *J Infect Dev Ctries* [Internet]. 2017;11(10):800–5. Disponible en: <https://www.jidc.org/index.php/journal/article/view/31600153>
63. Prem JM, Bharti V, Parashar D, Singh S. Multiplex PCR assay for simultaneous detection and differentiation of *ntamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and

- Salmonella sp. in the municipality-supplied drinking water. J Lab Physicians [Internet]. 2019; Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6771313/>
64. Singh A, Banerjee T, Kumar R, Shukla SK. Prevalence of cases of amebic liver abscess in a tertiary care centre in India: A study on risk factors, associated microflora and strain variation of *Entamoeba histolytica*. PLoS One [Internet]. 2019;14(4):1–14. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214880>
  65. Sindhusuta D, Rajkumari N, Gunalan A, Rajavelu D, Olickal JJ. A Comparative Analysis of Microscopy, Coproantigen Serology, and Nested Multiplex PCR in the Laboratory Diagnosis of *Entamoeba histolytica* Infection. J Lab Physicians [Internet]. 2021;14(2):125–31. Disponible en: <https://jlabphy.org/a-comparative-analysis-of-microscopy-coproantigen-serology-and-nested-multiplex-pcr-in-the-laboratory-diagnosis-of-entamoeba-histolytica-infection/>
  66. Attariani H, Turki H, Shoja S, Salahi-Moghaddam A, Ghanbarnejad A, Shamseddin J. Investigating the frequency of free-living amoeba in water resources with emphasis on *Acanthamoeba* in Bandar Abbas city, Hormozgan province, Iran in 2019–2020. BMC Res Notes [Internet]. 2020;13(420). Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13104-020-05267-z>
  67. Ajonina C, Buzie C, Möller J, Otterpohl R. The detection of *Entamoeba histolytica* and *Toxoplasma gondii* in wastewater. J Toxicol Environ Health [Internet]. 2017;81. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1392399>
  68. Gabr N, Mohamed R, Belal U, Abdel-Hafeez E, Abdel M, Ahmed R. Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* species from different water sources in Minia Governorate, Egypt. Minia J Med Res [Internet]. 2020;31(3):298–303. Disponible en: [https://mjmr.journals.ekb.eg/article\\_220296.html](https://mjmr.journals.ekb.eg/article_220296.html)
  69. Wagner C, Reyes M, Hernán A, Rojas E, Pérez G, López A, et al. High occurrence of *Acanthamoeba* genotype T4 in soil sources from Bolívar State, Venezuela. Acta Parasitol [Internet]. 2016;61(3):466–70. Disponible en: <https://www.degruyterbrill.com/document/doi/10.1515/ap-2016-0063/html>
  70. Tokoro M, Mizuno T, Bi X, Lacante SA. Molecular screening of *Entamoeba* sp. (*E. histolytica*, *E. dispar*, *E. coli*, and *E. hartmanni*) and *Giardia intestinalis* using

- PCR and sequencing. *MethodsX* [Internet]. 2023;11(5). Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.mex.2023.102361>
71. Abdul M, Mahboob T, Mong B, Jaturas N, Richard RL, Tian-Chye T, et al. Pathogenic waterborne free-living amoebae: An update from selected Southeast Asian countries. *PLoS One*. 2017;12(2):e0169448.
  72. Padilla J, Andrea S, Peña E, Herrera J, Olalde L, Ramírez F, et al. Detección molecular de *Entamoeba histolytica*. *Jovenes en la Cienc* [Internet]. 2022;16. Disponible en: <https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/3652>
  73. Kyanya C, Eyase F, Odundo, Elizabeth Kipkirui E. First report of *Entamoeba moshkovskii* in human stool samples from symptomatic and asymptomatic participants in Kenya. *Trop Dis Travel Med Vaccines*. 2019;5(1).
  74. Tanzifi A, Dodangeh S, Daryani A, Moghaddam Y. Detection and Molecular Characterization of Potentially Pathogenic Free-Living Amoebae from Recreational and Public Soils in Mazandaran, Northern Iran. *Iran J Parasitol* [Internet]. 2021;16(2). Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/352217865\\_Detection\\_and\\_Molecular\\_Characterization\\_of\\_Potentially\\_Pathogenic\\_Free-Living\\_Amoebae\\_from\\_Recreational\\_and\\_Public\\_Soils\\_in\\_Mazandaran\\_Northern\\_Iran](https://www.researchgate.net/publication/352217865_Detection_and_Molecular_Characterization_of_Potentially_Pathogenic_Free-Living_Amoebae_from_Recreational_and_Public_Soils_in_Mazandaran_Northern_Iran)
  75. Gunarathna N, Amarasinghe A, Wijesundara S, Iddawela D, Wickramasinghe S. Isolation, molecular characterization and phylogeny of *Naegleria* species in water bodies of North-Western Province, Sri Lanka. *PLoS One* [Internet]. 2021;16(3). Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7951808/>

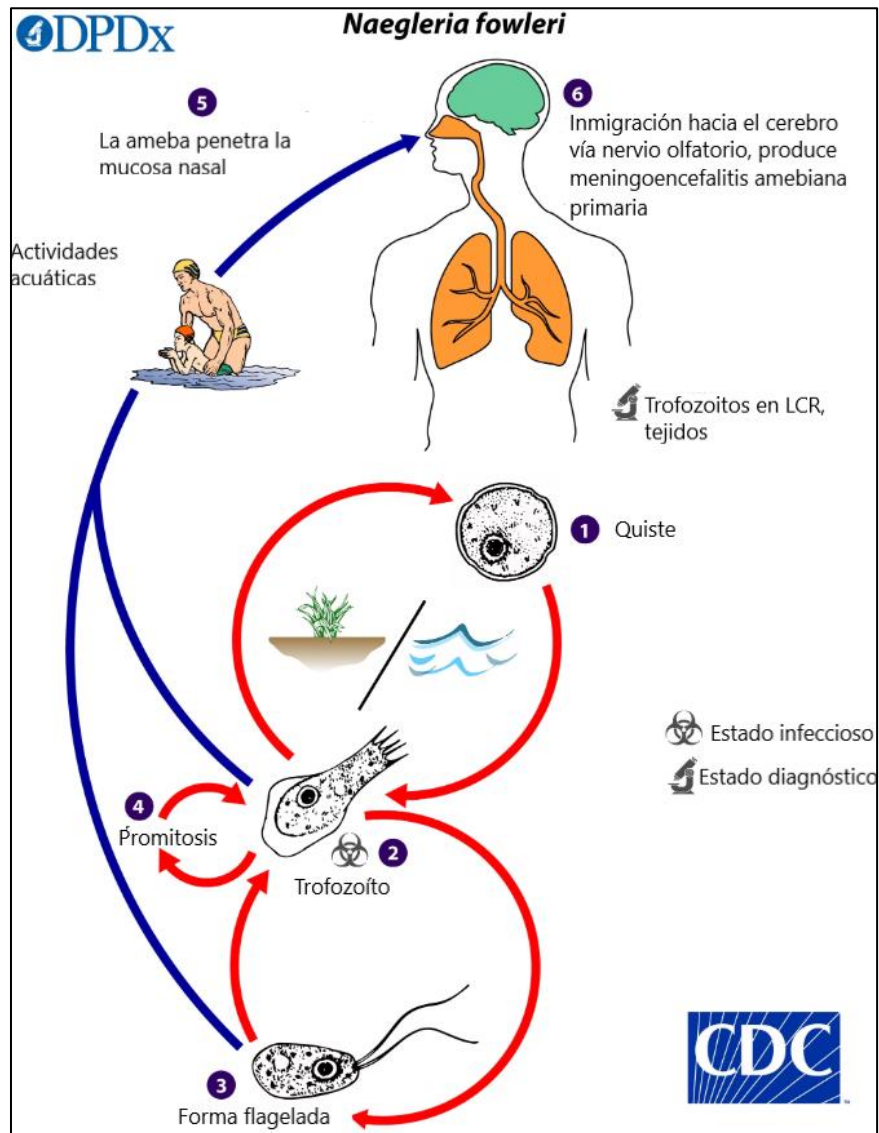
## ANEXOS

### *Anexo 1* Ciclo de vida de *E. histolytica*.



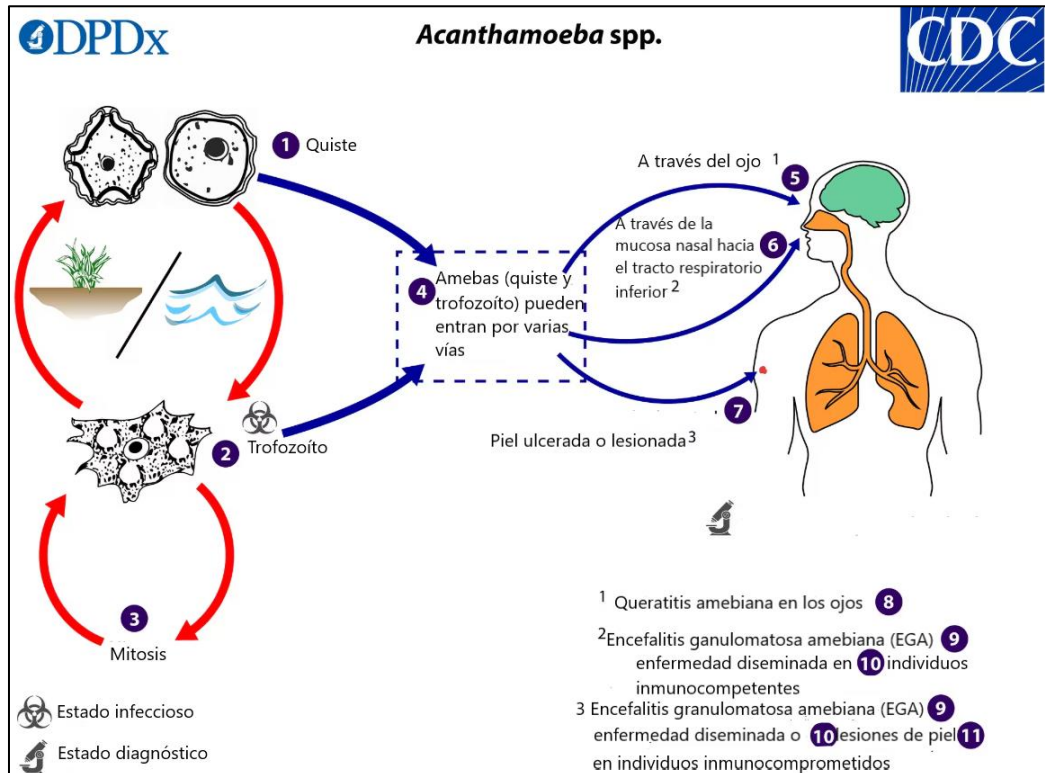
Fuente: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10380210/>

## Anexo 2. Ciclo de vida de *N. fowleri*.



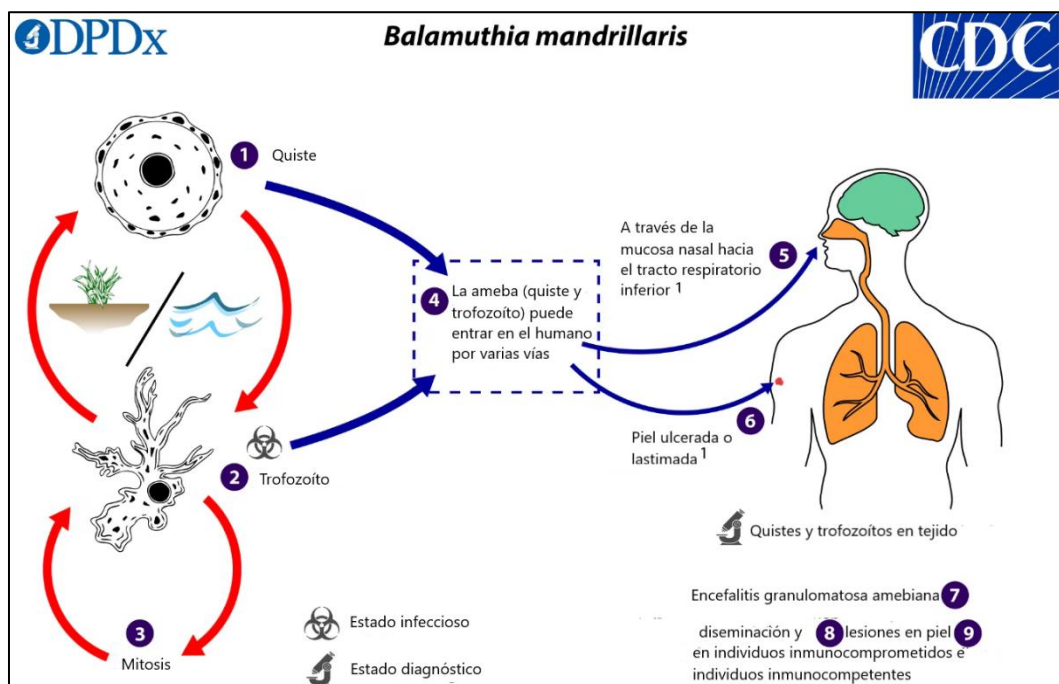
Fuente: <https://www.cdc.gov/dpdx/freeLivingAmebic/index.html>

### Anexo 3. Ciclo de vida de *Acanthamoeba* sp.



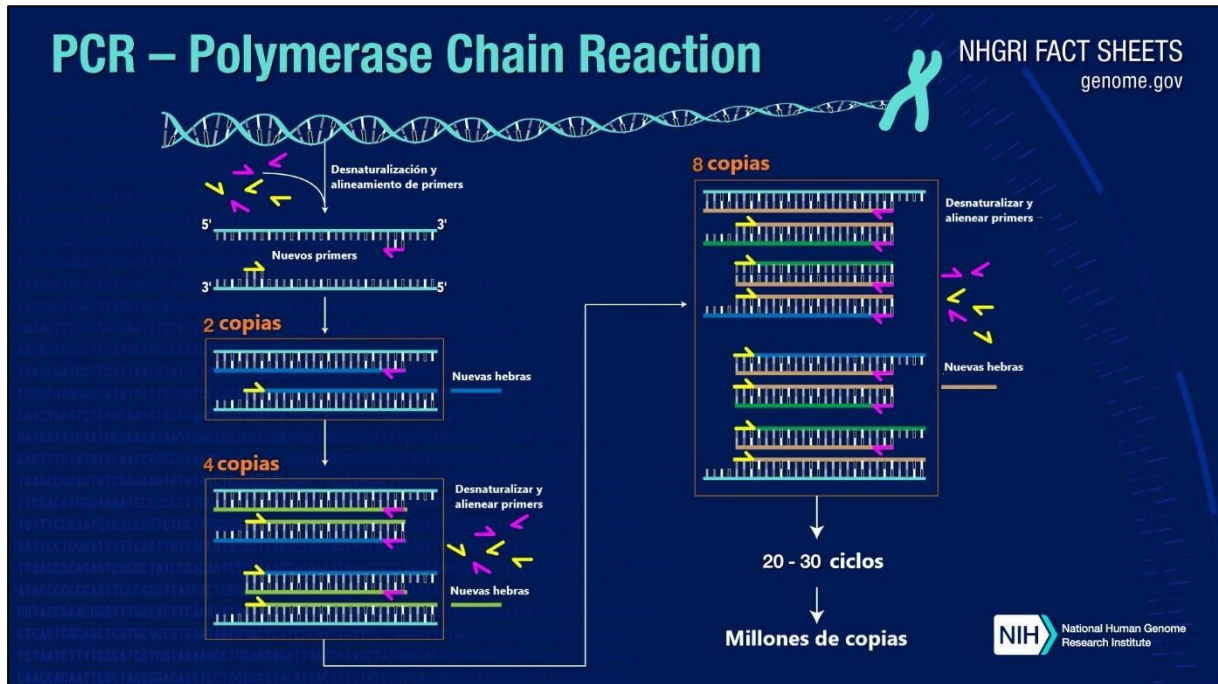
Fuente: <https://www.cdc.gov/dpdx/freeLivingAmebic/index.html>

### Anexo 4. Ciclo de vida de *B. mandrillaris*



Fuente: <https://www.cdc.gov/dpdx/freeLivingAmebic/index.html>

## Anexo 5. Ciclos de la PCR.



Fuente: <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Polymerase-Chain-Reaction-Fact-Sheet>

**Anexo 6.** Primers utilizados para la identificación de amebas de importancia clínica.

| <b>Especie</b>          | <b>Región</b> | <b>Primer F (5' → 3')</b>    | <b>Primer R (5' → 3')</b>     |
|-------------------------|---------------|------------------------------|-------------------------------|
| <i>E. histolytica</i>   | Gen 18S rRNA  | <b>Eh-1</b>                  | <b>Eh-2</b>                   |
|                         |               | AAGCATTGTTTCTAGATCTGAG       | AAGAGGTCTAACCGAAATTAG         |
|                         | Locus 1-2     | <b>DIF1</b>                  | <b>DIF2</b>                   |
|                         |               | CTGGTTAGTATCTTCGCCTGT        | CTTACACCCCCATTAACAAT          |
| <i>N. fowleri</i>       | Gen Mp2Cl5    | <b>Mp2Cl5 for</b>            | <b>Mp2Cl5 rev</b>             |
|                         |               | TCTAGAGATCCAACCAATGG         | ATTCTATTCACTCCACAATCC         |
|                         | ITS           | <b>ITS1</b>                  | <b>ITS2</b>                   |
|                         |               | AGAAAGAGCTATCAATCTGT         | GAACCTGCGTAGGGATCATT          |
|                         | ITS           | <b>NFITSRW</b>               | <b>NGITS FW</b>               |
|                         |               | AATAAAAGATTGACCATTGAAA       | AACCTGCGTAGGGATCATTT          |
| <i>Acanthamoeba sp.</i> | SSU ARN       |                              |                               |
|                         |               | TTTGAATTGCTCCAATAGCGTATATTAA | TTTGAATTCAGAAAGAGCTATCAATCTGT |
|                         | Gen 18S ARN   | <b>JDP1</b>                  | <b>JDP2</b>                   |
|                         |               | GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA       | TCTCACAAGCTGCTAGGGAGTCA       |
| <i>B. mandrillaris</i>  | SSU           | <b>Bal1</b>                  | <b>Bal 2</b>                  |
|                         | ADNr          |                              |                               |
|                         | mitochondrial | CGCATGTATGAAGAAGACCA         | TTACCTATATAATTGTCGATACCA      |
|                         | Gen 16S rRNA  | <b>Balspec16S</b>            | <b>Balspec16S</b>             |
|                         |               | CGCATGTATGAAGAAGACCA         | TTACCTATATAATTGTCGATACCA      |

**Adaptado de:** Padilla, 2022<sup>72</sup>; Kyanya, 2019<sup>73</sup>; Tanzifi, 2021<sup>74</sup>; Gunarathna, 2021<sup>75</sup>; Gabriel, 2019<sup>35</sup>.

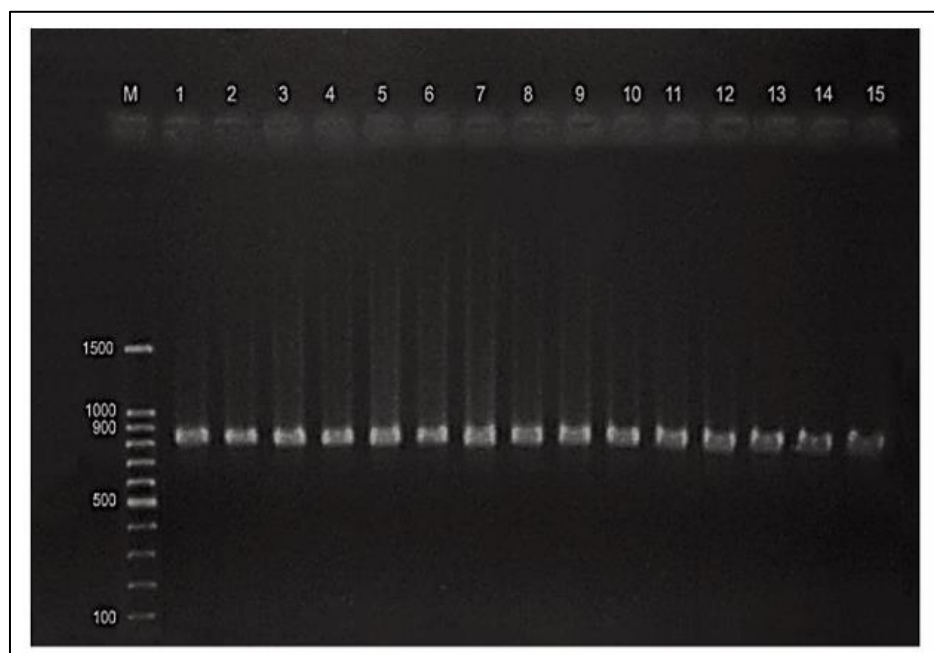
**Anexo 7.** Ejemplo de un resultado óptimo en la escala cualitativa para los resultados del gel de agarosa



En la figura a) se observan resultado de la especificidad de la PCR con los pimers genérico-específicos para *Acanthamoeba sp.* el producto de la amplificación por PCR para *Acanthamoeba sp.* es de 950 pb, positivo para la banda denominada Acan.

**Fuente:** <https://doi.org/10.2166/wh.2018.164>

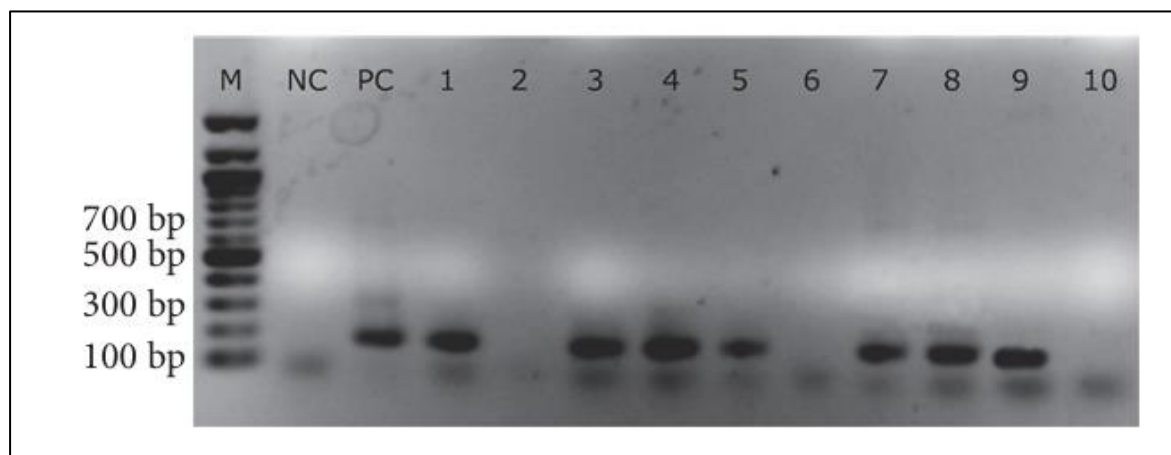
**Anexo 8.** Ejemplo de un resultado bueno en la escala cualitativa para los resultados del gel de agarosa



Se observan los productos en el gel de agarosa al 1,5% para primers específicos del género *Entamoeba*, banda M corresponde el marcador molecular (100-150 pb), bandas 1-15 amplicones 898 pb.

**Fuente:** <https://annals-parasitology.eu/index.php/AoP/article/view/49/63>

**Anexo 9.** Ejemplo de un resultado regular en la escala cualitativa para los resultados del gel de agarosa



Electroforesis en gel de agarosa (1%) de amplificación multiplex-PCR de 72 muestras positivas del complejo *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii*. Se observan bandas específicas de *E. dispar* en los canales 1, 3, 5 y 7-9; canales 2, 6 y 10 fueron negativos.

Fuente: <https://doi.org/10.1155/2019/7523670>