

## Detección molecular de *Entamoeba histolytica*

Juan Pablo Padilla-Martínez<sup>1</sup>, Andrea Berenice Sánchez-Ponce<sup>1</sup>, Eduardo Peña-Jiménez<sup>1</sup>, Javier Herrera-Gallardo<sup>1</sup>, Lizet Irazú Olalde-Arriaga<sup>1</sup>, Fátima Berenice Ramírez-Montiel<sup>2</sup>, Ángeles Rangel-Serrano<sup>2</sup>, Bernardo Franco<sup>2</sup>, Itzel Páramo-Pérez<sup>2</sup>, Fernando Anaya-Velázquez<sup>2</sup>, Felipe Padilla-Vaca<sup>2</sup> (padillaf@ugto.mx).

<sup>1</sup>Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo. División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato. Universidad de Guanajuato. C.P. 36050. México

<sup>2</sup>Departamento de Biología. División de Ciencias Naturales y Exactas. Campus Guanajuato. Universidad de Guanajuato. C.P. 36050. México.

### Resumen

La amibiasis es una infección ocasionada por el protozoo parásito *Entamoeba histolytica*, responsable de 40,000 a 100,000 muertes por año a nivel mundial, lo que la sitúa como una de las principales causas de muerte por parasitosis alrededor del mundo. Las técnicas tradicionales de detección del parásito son poco sensibles, generando falsos negativos y no distinguen con certeza a las diferentes especies de *Entamoeba*. Por lo anterior, se implementó un método basado en la PCR para la detección del parásito. Se emplearon 5 cepas de *E. histolytica* cultivadas en el laboratorio con diferentes características y fondos genéticos. Para la detección se utilizó la técnica de PCR y dos pares de oligonucleótidos específicos para *E. histolytica* previamente reportados. Para determinar la sensibilidad de la técnica de PCR se utilizó DNA genómico purificado de cada cepa. Los resultados indican que es posible detectar hasta 1 pg de DNA de cada una de las cepas. Asimismo, se evaluó la especificidad empleando DNA purificado del protozoo parásito *Trichomonas vaginalis* y de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. Se encontró que los oligonucleótidos utilizados son específicos para *E. histolytica*, ya que sólo se obtuvo amplificación con DNA de amibas y no con DNA de tricomonas o bacterias. Finalmente, se evaluaron extractos crudos de los trofozoítos de *E. histolytica* como fuente de templado, encontrando que técnicamente se puede detectar hasta una amiba. El sistema de detección implementado presenta una alta sensibilidad y es específico para *E. histolytica*. Una vez que se ha validado el sistema experimental, el siguiente paso sería usar muestras clínicas.

**Palabras clave:** *Entamoeba histolytica*; Diagnóstico molecular; PCR.

### Amibiasis

La amibiasis es una enfermedad causada por el protozoo parásito *Entamoeba histolytica*, el cual se transmite principalmente a través de la ingestión de alimentos y agua contaminada con quistes. <sup>1</sup> La enfermedad se distribuye por todo el mundo, siendo más frecuente en áreas tropicales y subtropicales. Se localiza principalmente en países menos desarrollados que tienen áreas con pobreza, bajo saneamiento y malos hábitos alimenticios, como son países de América Central y del Sur, África y Asia. <sup>1</sup> También se han reportado casos de infección por *E. histolytica* en viajeros e inmigrantes en países desarrollados de Europa y América del Norte, que regresaron de áreas expuestas. En México, más de 8.8 millones de casos de amibiasis fueron reportados por el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica entre 2000 y 2010. <sup>2</sup>

El ser humano es el principal hospedero de *E. histolytica* y puede conducir a una amibiasis intestinal y extraintestinal grave. Aproximadamente el 90% de los pacientes infectados son asintomáticos, pero la

---

<sup>1</sup> Li, J. et al., 2021

<sup>2</sup> Shirley, D. et al., 2019



## Diagnóstico de *E. histolytica*

### Directo

El examen directo con solución salina y lugol ha sido la primera línea para la visualización del parásito, tanto de trofozoítos como quistes.<sup>6</sup> Sin embargo, el examen directo de una preparación húmeda salina de muestra fresca (con o sin yodo como tinción temporal) bajo un microscopio no es un método sensible.<sup>7</sup>

En el examen directo de heces, el análisis morfológico de estructuras, inclusiones citoplasmáticas y elementos fagocitados como eritrocitos, junto con la movilidad del parásito son fuertes indicadores del potencial patogénico. Sin embargo, no se puede diferenciar al microscopio de luz a *E. histolytica* de *E. dispar*, por tanto, se requiere de otras pruebas para confirmar la especie. La infección puede ser causada por estas dos especies, pero la enfermedad o amebiasis propiamente dicha es causada por *E. histolytica*.<sup>6</sup> (Figura 2).

### Tinción

La elaboración de un frotis fecal para su posterior tinción constituye el método microscópico más certero de diagnóstico coproparasitológico, al permitir visualizar las características más relevantes para poder identificar los trofozoítos y los quistes.<sup>8</sup> Colorantes tales como azul de metileno, Giemsa, Wright y tricrómico de yodo pueden ser usados para la tinción, sin embargo, no tienen un uso rutinario.<sup>7,9</sup>

### Inmunológico

Las desventajas de las técnicas parasitológicas tradicionales han llevado al uso actual de ELISA de coproantígenos para el diagnóstico de laboratorio de la amebiasis intestinal.<sup>7</sup> Existen técnicas de ELISA de captura de antígenos que permiten la detección específica de *E. histolytica* en heces, diferenciándola de otras especies del género, fundamentalmente de *E. dispar*. Estas pruebas están basadas en el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la lectina Gal/GalNac o frente a un antígeno rico en serina de *E. histolytica*.<sup>8</sup> Las pruebas serológicas también son útiles para determinar si la persona está o estuvo infectada con *E. histolytica*. Estas pruebas son útiles en lugares donde las infecciones por amibas no son comunes, pero no son útiles en zonas endémicas.

### Por imágenes

En el caso de amebiasis extraintestinal, la evaluación por imagen como es el caso de ultrasonido, tomografía computarizada, y resonancia magnética presentan gran sensibilidad para la detección de abscesos causados por amebiasis. El ultrasonido, se prefiere para el diagnóstico de absceso hepático debido a su bajo costo, rapidez y ausencia de efectos adversos; los abscesos se pueden observar como una lesión de forma ovalada, en la parte superior del lóbulo del hígado, donde se presenta con mayor frecuencia, mientras que en la tomografía computarizada es de especial relevancia para el diagnóstico de colitis amebiana, ya que permite demostrar la presencia de colitis en el recto y cecum.<sup>10, 11</sup>

---

<sup>6</sup> Consuelo-López et al., 2008

<sup>7</sup> Saidin et al., 2019

<sup>8</sup> Gomila-Sard et al., 2011

<sup>9</sup> Anaya-Velázquez et al., 1989

<sup>10</sup> Dhawan et al., 2022

<sup>11</sup> Petri, W et al., 1999

## Molecular

A lo largo de las últimas décadas el diagnóstico que emplea técnicas moleculares ha adquirido relevancia para la detección de enfermedades infecciosas como es el caso de la amibiasis. Se tienen varias técnicas de amplificación de DNA para diferenciar y detectar las especies de *Entamoeba*, en muestras que incluyen heces, tejidos y lesiones hepáticas, las técnicas incluyen PCR convencional, PCR anidado, en tiempo real y multiplex.<sup>7</sup>



Figura 2. Diagnóstico de *Entamoeba histolytica* (Diseño de los autores).

## La PCR en el diagnóstico de *E. histolytica*

Actualmente se conoce una gran variedad de técnicas basadas en PCR convencional que permiten la diferenciación entre las 3 especies del “complejo *Entamoeba*” que se basan en la diversidad genética que presenta el gen 18S rDNA o de genes codificantes de una proteína rica en serina, quitinasa, cistein-proteasa o hemolisina.<sup>12</sup>

<sup>12</sup> Fotedar, R., 2007

La principal ventaja de la PCR es que permite generar millones de copias de la región de interés a partir de una o muy pocas copias del DNA molde.<sup>13</sup> (Figura 3). Es una técnica muy robusta debido, en gran medida, a la gran capacidad de los oligonucleótidos (iniciadores) de unirse firme y específicamente a sus secuencias complementarias de DNA discriminando fácilmente entre centenares de millares de sitios.<sup>14</sup>

La principal desventaja es la necesidad de estandarizar la técnica para el organismo o la técnica de interés, lo cual puede ser tardado y costoso. Esta técnica también es relativamente complicada; necesita experticia y se utilizan productos químicos peligrosos, por lo que el análisis rutinario de muchas muestras resulta poco práctico. Debido a la falta de protocolos estandarizados y a la calidad variable de reactivos y la necesidad de emplear equipo especializado.<sup>15</sup>

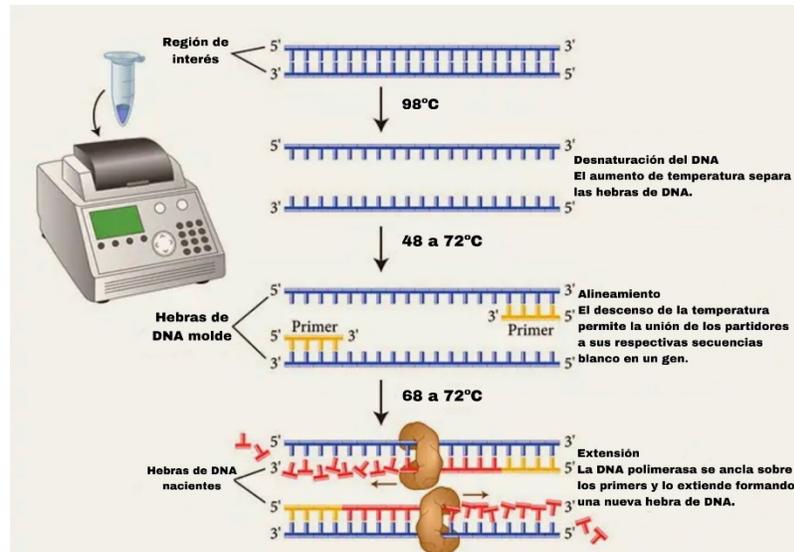


Figura 3. Esquema del proceso cíclico de amplificación de DNA por PCR. Tomado de: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-medica-clinica-las-condes-202-articulo-biologia-molecular-oncologia-lo-que-S0716864013701962><sup>16</sup>

## Estandarización y validación de la PCR para la detección de *E. histolytica*

### Cepas de *E. histolytica*

Para iniciar la estandarización del protocolo de detección por PCR de *E. histolytica*, se emplearon 5 diferentes cepas cultivadas en el laboratorio. La cepa HM1:IMSS es la cepa de referencia a nivel mundial obtenida de un paciente mexicano; la cepa 2411 es una variante de la HM1; la cepa G3 fue derivada de la cepa HM1 que tiene silenciado el gen del amebaporo; la cepa UG10 es una mutante avirulenta de la HM1 obtenida por el grupo de investigación en la Universidad de Guanajuato y la cepa Rahman que fue aislada de un paciente asintomático en Inglaterra. Las cepas G3 y UG10 fueron manipuladas genéticamente, mientras que la cepa Rahman tiene un fondo genético diferente (La información y las cepas fueron proporcionadas por el laboratorio de Patobiología Molecular de Protozoarios Parásitos y el de Biología del Parasitismo, del

<sup>13</sup> Shibata et al., 1988

<sup>14</sup> Mullis., 1990

<sup>15</sup> Pfaller., 2001

<sup>16</sup> Gonzalo, E., 2013

Departamento de Biología de la Universidad de Guanajuato). Las cepas fueron cultivadas en medio TYI-S-33.<sup>17</sup>

### Oligonucleótidos

El método molecular que se usó para la detección del parásito fue la PCR, para lo cual se utilizaron dos pares de oligonucleótidos reportados en la literatura que son específicos para *E. histolytica*. Estos oligonucleótidos se hibridan con el ADN de las amibas y acotan la región que se amplificará, obteniendo millones de copias. El oligonucleótido directo Eh-S26C (5'-GTACAAAATGGCCAATTCATTCAACG-3') y el reverso Eh-Ed-AS25 (5'-GAATTGATTTTACTCAACTCTAGAG-3') amplifican un fragmento de 307 pb del gen 18S del rRNA. El segundo par de oligonucleótidos está integrado por el directo DIF1 (5'-CTGGTTAGTATCTTCGCCTGT-3') y el reverso DIF2 (5'-CTTACACCCCATTAACAAT-3') que amplifican un fragmento de 402 pb y tienen como DNA blanco el Locus 1-2.<sup>12</sup>

### Extracción y purificación de DNA

Se extrajo y purificó DNA genómico de las 5 cepas de *E. histolytica* empleando el Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Este kit se basa en un proceso de cinco pasos: a) lisis de los trofozoítos y sus núcleos; b) digestión con RNasa; c) precipitación de proteínas; d) precipitación del ADN genómico con isopropanol y e) desalar y rehidratar la pastilla de ADN. El ADN purificado con este sistema es adecuado para diferentes métodos moleculares como amplificación por PCR, digestión con endonucleasas de restricción, hibridaciones, etc.<sup>18</sup>

El DNA genómico purificado de las 5 cepas fue cuantificado en un espectrofotómetro a 260 nm (GeneQuantAmersham) y ajustado a una concentración de 100 ng/μl. En la Figura 4 se observa el DNA genómico de cada cepa y separado mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Se observa una banda bien definida para todas las cepas de las amibas por arriba del marcador de 15000 pb (Tracklit 1 Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen) y no se observa degradación. Por lo anterior, tenemos DNA genómico de alta calidad de cada una de las cinco cepas de *E. histolytica*.

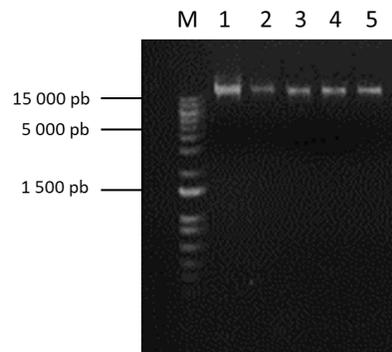


Figura 4. DNA genómico de diferentes cepas de *Entamoeba histolytica*. El DNA genómico purificado se separó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carril M, marcadores de tamaño; carril 1, cepa HM1; carril 2, cepa 2411; carril 3, cepa G3; carril 4, cepa UG10; carril 5, cepa Rahman.

<sup>17</sup> Diamond et al. 1978

<sup>18</sup> Promega Corporation, 2019

## Ensayos de sensibilidad

A partir de la muestra de DNA de 100 ng/μl se realizaron diluciones seriadas para tener las siguientes concentraciones de DNA: 100 ng/μl, 10 ng/μl, 1 ng/μl, 100 pg/μl, 10 pg/μl, 1 pg/μl, 100 fg/μl. Se utilizó 1 μl de cada dilución para la PCR en la siguiente mezcla de reacción: 1 μl de templado, 1 μl del oligonucleótido directo, 1 μl del oligo reverso, 7 μl de agua y 10 μl de GoTaq (Promega). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo a 94°C por 3 min; 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s; Tm de cada juego de oligos por 1 min y extensión a 72°C por 40 seg. Las muestras fueron cargadas en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y sometidas a electroforesis. El gel de agarosa fue expuesto a UV y las imágenes fueron fotodocumentadas (MiniBIS Pro). Los resultados se muestran en la Figura 5.

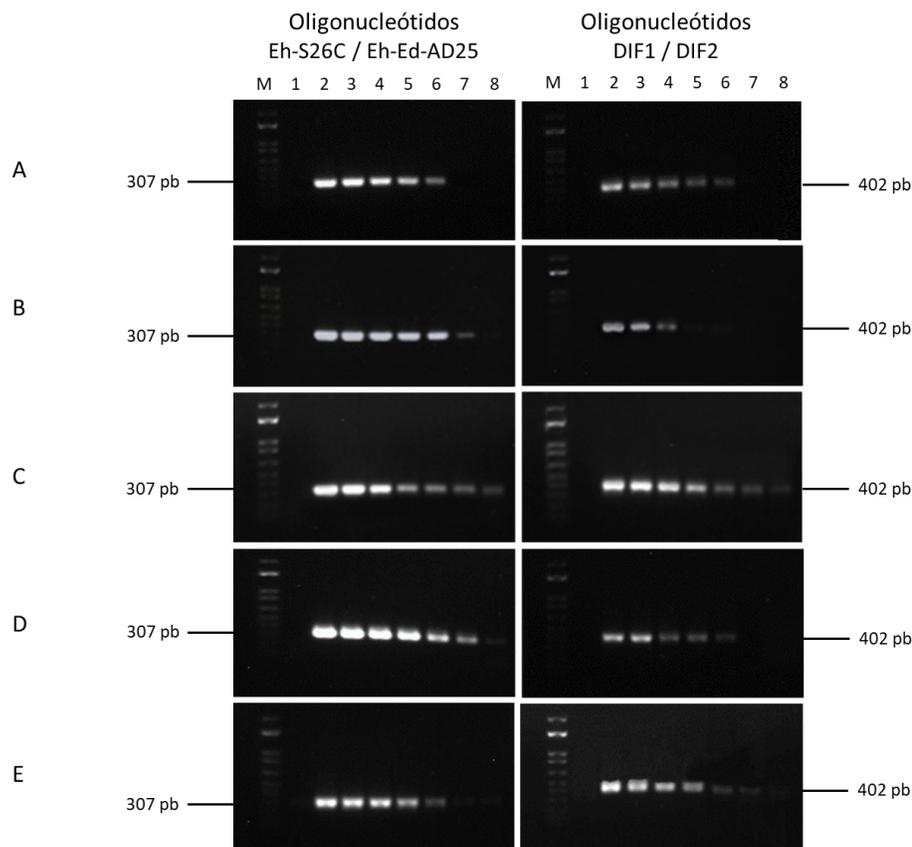


Figura 5. Sensibilidad del PCR con los oligonucleótidos Eh-S26C/Eh-Ed-AS25 y Dif 1/ Dif 2. Productos de amplificación por PCR empleando como templado el DNA de *E. histolytica* de diferentes concentraciones en un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de etidio. A, cepa HM1; B, cepa 2411; C, cepa G3; D, cepa UG10; E, cepa Rahman. M, marcado de tamaño; 1, control negativo; 2 templado de DNA de 100 ng/μl; 3, templado de DNA de 10 ng/μl; 4, templado de DNA de 1 ng/μl; 5, templado de DNA de 100 pg/μl; 6, templado de DNA de 10 pg/μl; 7, templado de DNA de 1 pg/μl; 8, templado de DNA de 100 fg/μl.

Con los dos pares de oligonucleótidos se obtuvieron los amplicones del tamaño esperado para cada una de las 5 cepas de *E. histolytica*. Se puede apreciar que existe una mayor sensibilidad con el par de oligonucleótidos EhS26C/ EhAS25, puesto que se alcanzó a visualizar una banda de amplificación para la mayoría de las diluciones realizadas para cada cepa. Se observó amplificación desde la concentración de 100 ng/μl hasta la de 10 pg/μl para todas las cepas. Para algunas cepas se alcanzó a observar una banda tenue con 100 fg/μl, lo que equivale al DNA de un trofozoíto de acuerdo con el número de amibas que se utilizó para la purificación del DNA.

Por otro lado, al usar el par de oligonucleótidos Dif1/Dif2, se observó una buena sensibilidad para las diluciones, sin embargo, hubo más variabilidad de amplificación de acuerdo con la cepa que se usara, por ejemplo, en el caso de la cepa 2411 únicamente se observó buena amplificación para la concentración de 100 ng/μl a 1 ng/μl, en comparación de la cepa G3 en la cual se observó amplificación para todas las diluciones.

Entre las cepas se observaron algunas diferencias, donde la cepa G3 mostró aparentemente mayor sensibilidad. Las cepas modificadas genéticamente y de fondo genético diferente presentaron resultados similares con respecto a la cepa HM1 de referencia.

### Ensayos de especificidad

Posterior a la evaluación de la sensibilidad de los oligonucleótidos seleccionados, se buscó verificar su especificidad para detectar y amplificar únicamente DNA procedente de *E. histolytica*. Se empleó DNA (100 ng/μl) de la cepa 2411 y G3 de *E. histolytica*, DNA del parásito *Trichomonas vaginalis* y DNA de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. El DNA de *T. vaginalis* fue positivo para la amplificación con oligos de B-tubulina y no amplificaron cuando se usó como templado DNA de amibas (datos no mostrados). Las muestras fueron sometidas a PCR, empleando el par de oligonucleótidos Eh-S26C/Eh-Ed AS25 y posteriormente cargadas en gels de agarosa al 1% (Fig. 6).

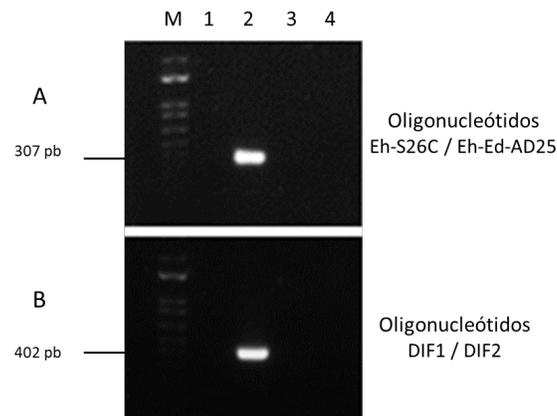


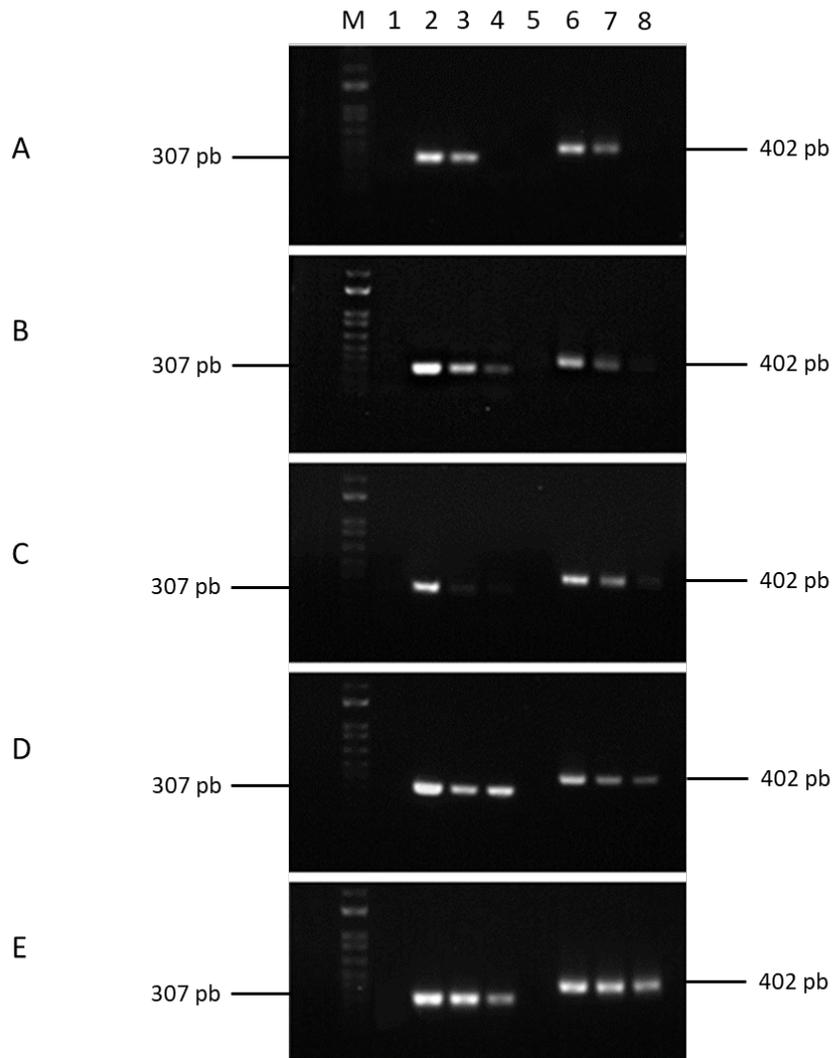
Figura 6. Especificidad de microorganismo blanco de los oligonucleótidos Eh-S26C/Eh-Ed-AS25 y Dif 1/ Dif 2. Productos de amplificación por PCR empleando como templado DNA de amibas, tricomonas y bacterias, en un gel de agarosa al 1% teñidos con Bromuro de etidio. A, cepa 2411. B, cepa G3. M, marcadores de tamaño; 1, control negativo; 2, templado de *E. histolytica*; 3, templado de *T. vaginalis* (GT-7); 4, templado de *P. aeruginosa*.

En la Figura 6 se observa que, con los dos pares de oligonucleótidos seleccionados, se obtiene un producto de amplificación del tamaño esperado cuando se usó DNA de amibas como templado, mientras que cuando se utilizó como templado DNA de tricomonas o de bacterias, no se obtuvo amplificación, lo que indica que los oligonucleótidos empleados son específicos para *E. histolytica*.

Al analizar el gel obtenido después de la electroforesis, se pudo observar solo una banda en ambos casos. En la Figura 5A la banda de 307 pb corresponde a la amplificación de la secuencia esperada con el DNA de la cepa 2411 y en la Figura 5B, la banda de 402 pb corresponde a la previamente obtenida en las diluciones. De igual manera se aprecia la ausencia de bandas en el carril del control negativo y en los carriles 3 y 4 donde se cargó el DNA de las tricomonas y bacterias.

### Extracto crudo

Una vez que se determinó la sensibilidad y especificidad en la detección de *E. histolytica* mediante PCR empleando DNA purificado de varias cepas, se evaluó la capacidad de este sistema para detectar el DNA en un extracto crudo del parásito de las diferentes cepas, empleando los dos pares de oligonucleótidos seleccionados. Se prepararon diferentes diluciones ( $1 \times 10^6$  amibas/mL, 10,000 amibas/mL, 100 amibas/mL) de los extractos crudos de las diferentes cepas de *E. histolytica* y se usaron como templados para la PCR.



**Figura 7. Detección de *E. histolytica* en extractos crudos de diferentes cepas.** Se usaron los dos pares de oligonucleótidos validados, Eh-S26C/Eh-Ed-AS25 (carriles 1-4) y Dif1/Dif2 (carriles 5-8). Los productos de amplificación se separaron en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. A cepa HM1; B cepa 2411; C cepa G3; D cepa UG10; E cepa Rahman. M marcadores de tamaño; 1 y 5, control negativo; 2 y 6, templado de extracto crudo de  $1 \times 10^6$  amibas/mL; 3 y 7, templado de extracto crudo de 10,000 amibas/mL; 4 y 8 templado de extracto crudo de 100 amibas/mL.

En la Figura 7, se observan los amplicones obtenidos a partir de los extractos crudos de las diferentes cepas de *E. histolytica*. En algunas cepas (UG10 y Rahman) se alcanzó a detectar amplificación usando como templado el DNA equivalente de 1 trofozoíto lo que demuestra la sensibilidad y especificidad del sistema de detección que hemos implementado, en donde las características de un extracto crudo se aproximan más a una muestra real de una persona infectada.

## Conclusiones

Se implementó un método molecular basado en la PCR para la detección de *E. histolytica*. Se establecieron las condiciones óptimas para la amplificación por PCR con dos pares de oligonucleótidos y el sistema fue validado empleando 5 cepas de *E. histolytica* de distinta virulencia y diferente fondo genético. El método presentó una alta sensibilidad y detectó hasta 1 pg de DNA purificado de cada cepa. Presentó especificidad con respecto a otros microorganismos ya que no se observó amplificación con *T. vaginalis* o *P. aeruginosa*. Una aproximación a muestras de pacientes se realizó con extractos crudos, alcanzando a detectar hasta un trofozoito. Debido a que la amebiasis humana representa un problema de salud pública y los métodos existentes de diagnóstico carecen de alta especificidad y sensibilidad, el establecer un método de diagnóstico molecular para el parásito posee gran importancia clínica, ya que podría brindar una correcta detección de *E. histolytica* y en consecuencia un tratamiento oportuno.

## Agradecimientos

Agradecemos al Dr. Luis Felipe Padilla Vaca por su dirección y la oportunidad de realizar este proyecto, así como a la Dra. Fátima Berenice Ramírez Montiel y a la Dra. Ángeles Rangel Serrano por su apoyo y guía. A los miembros del Laboratorio de Patobiología Molecular de Protozoarios Parásitos por formar parte de nuestro equipo de trabajo. A la Universidad de Guanajuato por la promoción del Verano de la Ciencia que cultiva vocaciones científicas y contribuye a la formación científica de los estudiantes. A nuestras familias por la motivación y apoyo en todo momento.

## Referencias

- <sup>1</sup> Li, J., Cui, Z., Li, X., & Zhang, L. (2021). Review of zoonotic amebiasis: Epidemiology, clinical signs, diagnosis, treatment, prevention and control. *Research in Veterinary Science*, 136, 174–181. doi:10.1016/j.rvsc.2021.02.021
- <sup>2</sup> Shirley, D., Watanabe, K., & Moonah, S. (2019). Significance of amebiasis: 10 reasons why neglecting amebiasis might come back to bite us in the gut. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(11), e0007744. doi:10.1371/journal.pntd.0007744
- <sup>3</sup> Chou, A., & Austin, R. L. (2022). *Entamoeba Histolytica*. In StatPearls. StatPearls Publishing.
- <sup>4</sup> Martínez-Palomo, A. (1982). *The biology of Entamoeba histolytica*. Research Studies Press (John Wiley & Sons Ltd.).
- <sup>5</sup> CDC - DPDx - Amebiasis. (2019, 15 octubre). Centers for Disease Control and Prevention. Recuperado 5 de julio de 2022, de <https://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/index.html>
- <sup>6</sup> Consuelo-López, M., Arnoldo-Quiroz, D., & Elizabeth-Pinilla, A. (2008). Diagnóstico de amebiasis intestinal y extraintestinal. *Acta Médica Colombiana*, 33(2), 75-83
- <sup>7</sup> Saidin, S., Othman, N., & Noordin, R. (2018). Update on laboratory diagnosis of amoebiasis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. doi:10.1007/s10096-018-3379-3
- <sup>8</sup> Gomila-Sard, B., Toledo-Navarro, R., & Esteban-Sanchis, J. (2011). Amebas intestinales no patógenas: una visión clinicoanalítica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(3), 20-28.
- <sup>9</sup> Anaya-Velázquez, F., Sabanero-López, G., & Arias-Negrete, S. (1989). *Entamoeba histolytica* trophozoites in faeces. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(2), 210. doi: 10.1016/0035-9203(89)90649-4. PMID: 2481895.
- <sup>10</sup> Dhawan, V. K., MD. (2022, 8 abril). Amebiasis Workup: Laboratory Studies, Radiography, Ultrasonography, CT, and MRI, Liver Aspiration. Medscape. Recuperado 4 de julio de 2022, de <https://emedicine.medscape.com/article/212029-workup#c6>

- <sup>11</sup> Petri, W., & Singh, U. (1999). Diagnosis and Management of Amebiasis. *Clinical Infectious Diseases*, 29(5), 1117–1125. doi:10.1086/313493
- <sup>12</sup> Fotedar, R., Stark, D., Beebe, N., Marriott, D., Ellis, J., & Harkness, J. (2007). *Laboratory Diagnostic Techniques for Entamoeba Species*. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3), 511–532. doi:10.1128/cmr.00004-07
- <sup>13</sup> Shibata D., W. J. Martin y N. Arnheim. (1988). Analysis of DNA Sequences in FortyYear-Old Paraffin-embedded Thin-Tissue. *Cancer Research* 48: 4564-4566.
- <sup>14</sup> Mullis K. B. (1990). Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Annales de Biologie Clinique* 48: 579-82.
- <sup>15</sup> Pfaller M. A. (2001). Molecular approaches to diagnosing and managing infectious diseases: practicality and costs. *Emerging infectious diseases*, 7(2), 312–318. <https://doi.org/10.3201/eid0702.010234>
- <sup>16</sup> Gonzalo, E. (2013). Biología molecular en oncología: lo que un clínico debiera saber. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(4), 563–570. doi:10.1016/s0716-8640(13)70196-2
- <sup>17</sup> Diamond, L.S, Harlow, D.R., & Cunnick, C.C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 72, 431-432.
- <sup>18</sup> Promega Corporation. (2019). Wizard® Genomic DNA Purification Kit Protocol. promega.com. Recuperado 6 de julio de 2022, de <https://nld.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol/>